



HAL
open science

Systèmes endosymbiotiques héritables chez les tiques

Marie Buysse

► **To cite this version:**

Marie Buysse. Systèmes endosymbiotiques héritables chez les tiques. Parasitologie. Université de Montpellier, 2022. Français. NNT : 2022UMONG085 . tel-04067062

HAL Id: tel-04067062

<https://theses.hal.science/tel-04067062v1>

Submitted on 13 Apr 2023

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 POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Mécanismes des Interactions Parasitaires Pathogènes et Symbiotiques

École doctorale GAIA

Unité de recherche MIVEGEC

Systemes endosymbiotiques héritables chez les tiques

Présentée par Marie Buysse

Le 6 décembre 2022

Sous la direction de Olivier DURON

Devant le jury composé de

Federica CALEVRO, DR INRAE, UMR BF2i

Didier BOUCHON, PU, Université de Poitiers

Sylvie HURTREZ-BOUSSES, PU, Université de Montpellier

Natacha KREMER, CR CNRS, UMR LBBE

Muriel VAYSSIER-TAUSSAT, INRAE, UMR BIPAR

Rapporteur

Rapporteur

Présidente du jury

Examineur

Examineur



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Remerciements

Je vais avoir « quelques » personnes à remercier, c'est parti. Je m'excuse par avance à toute personne que j'oublierai sous le coup du rendu de ce manuscrit.

Je commencerais par remercier l'Université de Montpellier et l'Ecole Doctorale de GAIA pour l'allocation de la bourse qui m'a permis de travailler sur ces différents projets. Des projets initiés au cours de cette thèse ont plus spécifiquement été financés par le Labex CeMEB et Montpellier Université d'Excellence que je remercie pour ces attributions. L'IRD a été une seconde résidence depuis pas loin de 6 ans, merci pour l'accueil et le logo d'ordinateur.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de thèse, Guillaume CHARRIERE, Karen McCOY, Thomas POLLET, Xavier BAILLY, Fabrice VAVRE, pour m'avoir suivi et conseillé pendant ces trois années, durant les comités mais également en dehors. J'ai apprécié vos retours, vos conseils et les discussions que nous avons pu avoir.

Un grand merci aux membres du jury, Federica CALEVRO, Didier BOUCHON, Natacha KREMER, Muriel VAYSSIRE-TAUSSAT, Sylvie HURTREZ, pour avoir accepté d'évaluer ce travail et au plaisir de pouvoir échanger avec chacun d'entre vous.

Je remercie l'unité MIVEGEC, son directeur Frédéric SIMARD, l'équipe du BAR qui a été une bouée de sauvetage et un phare dans la nuit pour bien des procédures administratives et bons de commande, merci pour votre disponibilité. A tous les collègues des laboratoires, impossible de tous vous nommer sans oublier quelqu'un donc je ne le ferai pas pour n'omettre personne, pensez bien qu'avec les heures partagées avec vous, les galères techniques, les arcs électriques, il est impossible de vous oublier, merci à tous pour votre soutien et bonne route à tous. Un grand merci au plateau i-trop et tous ses membres pour leur assistance et leurs différentes formations en bio-informatique, mon lancement dans ce domaine aurait été bien différent sans vous. Valérie, je te dois un remerciement spécial pour avoir été la première à me mettre le pied à l'étrier : au labo ou derrière un ordi je n'ai que des bons souvenirs de nos travaux ensemble. Merci à toutes les personnes avec qui j'ai partagé des pauses mentales, au labo ou en dehors (congrès inclus n'est-ce pas !), et cette liste est longue après 6 ans.

Je suis reconnaissante d'avoir eu l'opportunité d'encadrer et d'enseigner à des étudiants durant ces trois années dans le cadre de mes différentes missions complémentaires d'enseignement à la Faculté des Sciences de Montpellier. Le soutien des autres doctorants, mais aussi de toutes les différentes équipes d'enseignants responsables, n'ont fait qu'apporter à cette expérience une dimension encore plus positive.

Aux membres de l'équipe EVCO, qui sont allés et venus pendant ces dernières années (encore une fois ne m'en voulez pas mais j'ai peur d'oublier quelqu'un !), merci pour votre accueil, pour les discussions, pour le partage. Les projets c'est bien, se sentir dans un bon environnement pour les réaliser c'est mieux.

Rachid, cette année avec toi dans l'équipe aura été riche en manip, en combinaisons de paramètres à tester, en tiques vivantes que tu as appris à apprécier, mais surtout riche par ton entrain dans

tous les projets qui t'étaient proposés. Je te remercie pour ton aide et te souhaite de trouver dans ton nouveau poste un cadre et des opportunités pour te réaliser pleinement.

J'ai appris à chaque étape de mon parcours dans cette unité. Ana, Arnaud, Manon, vous avez fait partie de celui-ci. Ana merci pour ta confiance, m'avoir inclus dans tes projets et pour tes conseils et ton écoute. Karen, c'est grâce à toi que j'ai pu faire ma première sortie terrain, c'était un îlot peuplé de goélands mais ça compte quand même ! J'aurais appris à ton contact que les protocoles peuvent être colorés, littéralement. Je n'oublie pas évidemment nos sessions escalades mais surtout le soutien et ton expérience que tu as pu m'apporter au fil des années, merci. Christine, ta bienveillance me touche, merci pour toutes les attentions que tu as eu à mon égard, toutes ces discussions pleines d'expérience. Justine GRILLET et Julien AMOROS, vous avez été les preuves vivantes que les stagiaires déchirent ! Vous encadrez pendant vos stages respectifs n'a été que plaisir, je vous souhaite le meilleur pour la suite de vos projets. On reste en contact de toute façon !

A mes amies Lison et Justine, cette expérience n'aurait pas eu le même éclat, le même impact dans ma vie, sans vous. Vivre tout cela littéralement du début à la fin avec vous a été le plus beau contexte que je pouvais souhaiter. Je ne m'épancherai pas ici, vous savez ce que je ressens : c'est parti pour une soirée fromages ! A tous mes collègues et amis, merci d'avoir été présents.

Olivier, ces dernières années nous avons partagé bien des expériences et je ne pourrais pas être plus ravie du chemin parcouru ensemble. En tant que responsable de stage, tu m'as rapidement donné un cadre rassurant et une relation de confiance où je sentais le soutien de mener nos petits (forme affective, hein) projets pas à pas. Plus tard, tu m'as laissé prendre le temps de la réflexion, mais quand on a décidé que la thèse était un go, tu as été là et tu m'as soutenu dans les défis qui nous attendaient. Aujourd'hui, après 3 ans en tant que mon directeur de thèse, je te suis reconnaissante de la liberté que tu m'as donnée, pour réussir, pour me tromper, pour avancer, pour tester. Mais la liberté n'a jamais voulu dire que tu étais bien loin, au contraire, ton soutien et ta disponibilité n'ont rendu cette expérience qu'encore plus enrichissante de discussions et conseils. Je te dois beaucoup des opportunités et expériences que j'ai pu vivre pendant cette thèse. J'aime mon travail mais je peux surtout dire que j'ai aimé travaillé avec toi.

A mes amis, bien que répartis dans tout le pays, merci d'avoir été là, même si moi je pouvais faire un peu défaut par la présence, mais jamais par la pensée.

A ma famille, merci pour votre compréhension et votre soutien dans la conduite de mes études, de m'avoir laissé la liberté de trouver la voie qui me convenait, peu importe où elle se trouvait et ce qu'elle impliquait. Des choses sont encore à venir et je sais que vous serez présent ; vous savez que c'est réciproque. Je vous aime. A mon partenaire, je suis reconnaissante de t'avoir eu à mes côtés pour cette étape. Nous avançons désormais ensemble. Je t'aime.

La science est collective, elle ne peut se faire seul, ni pour soi-même. Mais ici elle n'a surtout pas pu se faire sans les tiques ! Merci à mon modèle biologique que j'apprécie plus que ce que je n'aurais pu penser. Un grand merci à toutes les personnes qui ont participé à établir la collection de tiques sur laquelle je me suis appuyée pour ces projets. Merci à tous mes collaborateurs.

Résumé

Les tiques sont les Arthropodes hématophages transmettant une grande diversité d'agents pathogènes aux Vertébrés. Les maladies qui en résultent ont un coût sanitaire, vétérinaire et économique non négligeable. Néanmoins, l'ensemble de leurs communautés microbiennes ne se limitent pas à ceux-ci. Leur microbiome se compose également de microorganismes acquis depuis l'environnement et de microorganismes transmis de générations en générations, que l'on qualifie d'héritables. Ces microorganismes sont importants pour la physiologie, l'écologie et l'évolution des tiques, et vont influencer leur succès reproducteur. Certaines bactéries sont obligatoires au cycle de vie des tiques, et d'autres sont facultatives mais pourraient conférer un avantage en cas de stress environnementaux. Dans ce contexte, cette thèse s'est centrée sur l'étude des mécanismes permettant aux symbiotes hérifiables de se répandre et se maintenir dans les populations de tiques.

Outre le fait d'être encore sous-étudiées, plusieurs bactéries hérifiables sont mal-identifiées, et souvent confondues avec des agents pathogènes phylogénétiquement proches. Nous avons démontré qu'à partir de métagénomés et grâce à des analyses phylogénétiques et génomiques, il était possible de détecter ces mal-identifications et d'identifier l'occurrence de deux bactéries obligatoires chez plusieurs espèces de tiques (Chapitre 1). Une assignation correcte des symbiotes de tiques est essentielle à la fois pour ne pas sur-estimer le risque épidémiologique lié aux tiques et sous-estimer l'implication des bactéries hérifiables dans la physiologie et l'évolution de leur hôte.

Les tiques sont des hématophages stricts, et ce régime alimentaire biaisé nécessite aux tiques une association avec des symbiotes obligatoires pour les compléter en composants nutritionnels essentiels. En étudiant les métagénomés de la tique *Hyalomma marginatum*, nous avons démontré que si les autres espèces de tiques abritent généralement une seule lignée de symbiotes nutritionnels, cette espèce possède un système unique à doubles partenaires bactériens. Nos analyses génomiques ont révélé l'érosion du génome d'un symbiote ancestral avec un risque de collapse de l'interaction nutritionnelle, et simultanément la compensation des voies manquantes grâce à la co-symbiose avec un symbiote acquis plus récemment (Chapitre 2). Ceci confirmerait que les tiques sont dépendantes de leurs partenaires nutritionnels et que leurs associations subissent des adaptations afin de persister.

L'effet des bactéries facultatives sont méconnues chez les tiques, contrairement à celles chez les Insectes où plusieurs phénotypes leur sont associés et des effecteurs génétiques sont identifiés. Nous avons alors cherché à explorer les caractéristiques symbiotiques de deux bactéries chez les tiques : *Rickettsia lusitaniae* chez les tiques molles (Chapitre 3) et *Spiroplasma ixodetis* chez les tiques dures (Chapitre 4). Pour *R. lusitaniae*, nos différentes expérimentations tendent à la définir

comme une bactérie facultative à transmission maternelle, avec un potentiel de transmission horizontale mais sans évidence de pathogénicité dans notre modèle expérimental, et ayant un effet positif sur la valeur sélective des tiques infectées. L'étude de génomes séquencés pourrait aider à émettre des hypothèses sur son phénotype chez les tiques molles. Pour *S. ixodetis*, nos investigations se focalisent sur l'obtention et l'analyse de plusieurs génomes de *Spiroplasma* provenant de différentes espèces de tiques et d'autres arthropodes. A partir de ces derniers, nous cherchons à étudier les relations phylogénétiques entre les différentes souches de *S. ixodetis* mais aussi à identifier dans ces génomes de potentiels effecteurs corrélés à leur phénotype, notamment la manipulation de la reproduction, chez leurs hôtes tiques.

Mots-clés

Tiques; endosymbiotes héréditaires; coévolution; symbiose nutritionnelle; symbiotes facultatifs ; réduction génomique; métagénomique; transmission

Abstract

Ticks are hematophagous Arthropods that transmit a wide variety of pathogens to Vertebrates. The resulting diseases have a significant sanitary, veterinary and economic cost. Nevertheless, their microbial communities are not limited to these. Their microbiome is also composed of microorganisms acquired from the environment and microorganisms transmitted from generation to generation, which are called heritable. These microorganisms are important for the physiology, ecology, and evolution of ticks, and will influence their reproductive success. Some bacteria are obligatory to the life cycle of ticks, and others are facultative but could confer an advantage under environmental stress. In this context, this thesis focused on the study of the mechanisms underlying the maintenance and spread of heritable symbionts in tick populations.

In addition to being understudied, many heritable bacteria are misidentified, and often confused with phylogenetically related pathogens. We have demonstrated that using metagenomes and phylogenetic and genomic analyses, it is possible to detect these misidentifications and identify the occurrence of two obligate bacteria in several tick species (Chapter 1). Correct assignment of tick symbionts is essential both to avoid overestimating the epidemiological risk associated with ticks and underestimating the involvement of heritable bacteria in the physiology and evolution of their hosts.

Ticks are strict hematophagous, and such biased diet requires ticks to associate with obligate symbionts to supplement them with essential nutritional components. By studying the metagenomes of the tick *Hyalomma marginatum*, we demonstrated that while other tick species typically harbor a single lineage of nutritional symbionts, this species has a unique dual bacterial partner system. Our genomic analyses revealed the erosion of the genome of an ancestral symbiont with a potential collapse of the nutritional interaction, and simultaneously the

compensation of missing pathways through co-symbiosis with a more recently acquired symbiont (Chapter 2). This would confirm that ticks are dependent on their nutritional partners and that their associations undergo adaptations in order to persist.

The effect of facultative bacteria is poorly understood in ticks, unlike those in Insects where several of their phenotypes have been documented and genetic effectors are identified. Thus, we investigated the symbiotic characteristics of two bacteria in ticks: *Rickettsia lusitaniae* in soft ticks (Chapter 3) and *Spiroplasma ixodetis* in hard ticks (Chapter 4). For *R. lusitaniae*, our different experiments tend to define it as a facultative bacterium maternally transmitted, with a potential of horizontal transmission but with no evidence of pathogenicity in our experimental model, and with a positive effect on the fitness of infected specimens. Our investigations on sequenced genomes could help to hypothesize its phenotype in soft ticks. For *S. ixodetis*, our investigations are focused on obtaining and analyzing several *Spiroplasma* genomes from different tick species and other arthropods. From these, we aim to study the phylogenetic relationships between the different strains of *S. ixodetis* but also to identify potential effectors correlated to their phenotype, including reproductive parasitism, in their tick hosts.

Key words

Ticks; heritable endosymbionts; coevolution; nutritional symbiosis; genomic reduction; bacterial metabarcoding; metagenomics

Résumé grand public

Les tiques sont essentiellement étudiées pour la transmission d'agents pathogènes, mais elles hébergent également une diversité de bactéries symbiotiques, obligatoires ou facultatives pour leur cycle de vie. Ma thèse vise à comprendre les mécanismes qui permettent à ces bactéries symbiotiques de persister chez les tiques de générations en générations. Nous avons démontré que des espèces de bactéries obligatoires sont encore mal-identifiées, et souvent confondues avec des bactéries pathogènes. D'autre part, nous avons identifié que les bactéries symbiotiques ont des génomes parfois extrêmement dégradés et que certaines s'associent en co-infection pour assurer les fonctions métaboliques nécessaires au maintien des interactions symbiotiques avec les tiques. Enfin, ce travail a permis d'élargir nos connaissances sur les interactions entre un genre de tiques et un partenaire facultatif, et sur la dynamique de transmission du microbiome des tiques d'une génération à l'autre.

Public abstract

Ticks are mainly studied as vectors of pathogens, but they also host a diversity of symbiotic bacteria, obligatory or facultative for their life cycle. My thesis aims to understand the mechanisms that allow these symbiotic bacteria to persist in ticks across generations. We demonstrated that some species of obligate bacteria are still misidentified, and often confused with pathogenic bacteria. We also identified that symbiotic bacteria have sometimes extremely degraded genomes and that some of them associate in co-infection to ensure the metabolic functions necessary to maintain symbiotic interactions with ticks. Finally, this work has expanded our knowledge of the interactions between a particular tick genus and a facultative partner, and of the transmission dynamics of the tick microbiome from one generation to the next.

Table des matières

Liste des figures	1
Liste des tableaux.....	2
Préambule.....	3
Listes des articles de la thèse et annexes :.....	5
Communications scientifiques réalisées durant la thèse :.....	6
Etat de l'art.....	7
1. Introduction aux concepts	7
1.1. Microorganismes, microbiome et interactions.....	8
1.2. Evolution des niveaux d'appréciation des interactions hôte-microorganismes	12
1.3. Continuum mutualisme-parasitisme	14
1.4. Endosymbioses	15
2. Notre modèle biologique : les systèmes endosymbiotiques chez les tiques.....	28
2.1. Les tiques.....	28
2.2. Le microbiome des tiques : diversité, rôle et structuration	36
Problématique de thèse et objectifs principaux.....	51
Chapitre 1.....	55
Tiques et symbiotes mutualistes : un système sujet à de récurrentes mal-identifications.....	55
Chapitre 2.....	74
Symbiose nutritionnelle et érosion génomique	74
Chapitre 3.....	97
Symbiotes facultatifs : Traits biologiques d'un symbiote répandu chez les tiques molles du genre <i>Ornithodoros</i>	97
Chapitre 4.....	173
Symbiotes facultatifs : Diversité de <i>Spiroplasma ixodetis</i> et interactions chez les tiques dures. 173	
1. Contexte de l'étude.....	174
2. Méthodologie.....	177
2.1. Collection de tiques.....	177
2.2. Isolation, mise en culture et confirmation d'infection.....	178
2.3. Prélèvement des cultures de <i>Spiroplasma</i>	181
2.4. Extraction ADN, dosage et séquençage.....	181
2.5. Typage moléculaire, analyses phylogénétiques et comparaison nucléotidiques.....	183
3. Résultats préliminaires.....	183

3.1. Inventaires des souches positives et séquencées.....	183
3.2. Première estimation de la diversité des souches séquencées.....	191
4. Perspectives.....	195
Annexes du Chapitre 3	199
Discussion et perspectives	205
Caractériser les membres du microbiome des tiques : un enjeu aux retombées multiples.....	205
Les symbioses nutritionnelles : des systèmes dynamiques chez les tiques	209
Les symbioses facultatives chez les tiques	215
Acquisition, sauts d'espèces et co-infections : quel rôle joue l'hôte vertébré pour les communautés d'endosymbiotes ?	218
Conclusion.....	225
Références.....	227
Annexes	259

Liste des figures

Figure 1. L'histoire de la recherche sur le microbiome depuis le XVIIème siècle jusqu'à nos jours (p.9)

Figure 2. Diagramme montrant les différents types d'interactions écologiques (p.9)

Figure 3. Étapes proposées dans le cadre d'un processus de réduction génomique et leurs caractéristiques biologiques associées (p.26)

Figure 4. La taille des génomes varie selon les groupes de bactéries symbiotiques (p.26)

Figure 5. Photographies d'exemples de tiques dures et de tiques molles et morphologie simplifiée des tiques sur l'exemple d'*Amblyomma geayi* et d'*Ornithodoros porcinus* (p.30)

Figure 6. Distribution des symbiotes bactériens héréditaires chez les tiques (p.39)

Figure 7. Matrice d'identité des séquences nucléiques entre les séquences du gène 16S rARN (709 bp) des souches de *S. ixodetis* séquencées, d'autres séquences de *S. ixodetis* et de *Spiroplasma* spp. (p. 190)

Figure 8. Arbre phylogénétique d'espèces du genre *Spiroplasma* basé sur les séquences concaténées des gènes *rpoB*, *dnaK*, *epsG* et *gyrA* (1934 bp) et construit par maximum de vraisemblance (modèle GTR+G, 1000 bootstraps) (p.192)

Figure 9. Méthodologie prévisionnelle dans le cadre de l'assemblage et l'analyse des génomes de *Spiroplasma* (p.194)

Figure 10. Les relations évolutives diverses et enchevêtrées de certaines symbioses mutualistes, leurs divers insectes hôtes et la gamme de tailles des génomes associés (p.212)

Liste des tableaux

Tableau 1. Liste des génomes d'endosymbiotes nutritionnels de tiques disponibles sur GenBank (p.45)

Tableau 2. Liste des génomes de *Spiroplasma* du clade Ixodetis disponibles sur GenBank (p.176)

Tableau 3. Inventaire des différentes espèces d'arthropodes utilisées dans le cadre de cette étude (p.184)

Tableau 4. Inventaire des lignées cellulaires de tiques et cultures de référence de *Spiroplasma* utilisées dans le cadre de cette étude (p.186)

Tableau 5. Tableau récapitulatif des échantillons envoyés au séquençage NGS, avec le détail des techniques utilisées (p.188)

Préambule

Les symbioses, que l'on peut décrire comme des associations étroites et durables entre deux organismes d'espèces différentes, jouent un rôle clé dans l'évolution du vivant. Que ce soient des associations bénéfiques pour les deux partenaires ou délétères pour l'un, elles s'accompagnent d'adaptations, résultats de leurs vies d'interaction, qui influencent leurs trajectoires évolutives. Les symbioses ont contribué à l'émergence des eucaryotes et des plantes, mais ont aussi participé à leur diversification, comme l'existence de ces vers marins vivants dans des tubes thermaux où les conditions de vie nous apparaissent comme extrêmes. Les associations symbiotiques ont également permis à des arthropodes d'exploiter le sang comme seule ressource alimentaire, pour leur avantage, mais apparemment pas pour le nôtre : la spécialisation des tiques pour le sang de vertébrés en est par exemple le résultat. Considérées comme nuisibles, des parasites et des vecteurs d'agents pathogènes, les tiques sont pourtant des modèles de choix pour l'étude des interactions interspécifiques. Elles parasitent un large spectre de vertébrés et sont infectées par une grande diversité de microorganismes qui peuvent interagir entre eux et avec leur hôte tique. Durant cette thèse de 3 ans, nous nous sommes intéressés à une catégorie de symbioses chez les tiques en particulier, des symbioses impliquant des bactéries intracellulaires héréditaires, mais en considérant toujours leurs imbrications dans ce réseau d'interactions. Mon implication dans des travaux de recherche sur ce modèle ont débuté il y a presque 6 ans, grâce à la réalisation d'un Master 2, débuté en janvier 2017, et de plusieurs contrats temporaires jusqu'au début de ma thèse en octobre 2019. Ainsi, durant cette période de thèse, je me suis attachée à répondre à des questions dont l'étude avait débuté un peu avant, et à engager des projets sur de nouvelles problématiques. Les travaux réalisés sous la supervision de mon directeur de thèse se sont portés sur différents modèles d'association tique-bactéries, permettant d'aborder plusieurs concepts entourant la persistance des associations symbiotiques chez les tiques. L'écriture de trois articles en premier auteur (dont deux publiés) s'inscrit dans le corps de cette thèse (en quatre chapitres) et les projets « parallèles », démarrés avant – et indépendamment de – la thèse, ont été valorisés par la publication de trois papiers en premier auteur. Ces travaux seront eux présentés dans l'état de l'art et en annexe.

Listes des articles de la thèse* et annexes** (par ordre chronologique) :

[1] ** **Marie Buysse** and Olivier Duron. Two novel *Rickettsia* species of soft ticks in North Africa: 'Candidatus *Rickettsia africanseptentrionalis*' and 'Candidatus *Rickettsia mauretanicus*'. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2020

[2] ** **Marie Buysse**, Maxime Duhayon, Franck Cantet, Matteo Bonazzi, Olivier Duron. Vector competence of the African argasid tick *Ornithodoros moubata* for the Q fever agent *Coxiella burnetii*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2021

[3] * **Marie Buysse** and Olivier Duron. Evidence that microbes identified as tick-borne pathogens are nutritional endosymbionts. *Cell*. 2021

[4] ** **Marie Buysse**, Florian Binetruy, Raz Leibson, Yuval Gottlieb and Olivier Duron. Ecological contacts and host specificity promote the replacement of nutritional endosymbionts in ticks. *Microbial Ecology*. 2021

[5] * **Marie Buysse**, Anna Maria Floriano, Yuval Gottlieb, Tiago Nardi, Francesco Comandatore, Emanuela Olivieri, Alessia Giannetto, Ana Palomar, Ben Makepeace, Chiara Bazzocchi, Alessandra Cafiso, Davide Sasseria and Olivier Duron. A dual endosymbiosis drives nutritional adaptation to hematophagy in the invasive tick *Hyalomma marginatum*. *eLife*. 2021

[6] * (en cours d'écriture) **Marie Buysse**, Emilie Talagrand-Reboul, Valérie Noël, Karen McCoy, Maxime Duhayon, Laurence Vial, Nathalie Boulanger, Sofian Ouass, Kevin Terretaz, Frédéric Landmann, Claudine Ménard, Olivier Duron. *Rickettsia lusitaniae*, a worldwide distributed maternally inherited endosymbiont of *Ornithodoros* soft ticks.

Communications scientifiques réalisées durant la thèse :

[1] Rencontres franco-israéliennes sur les tiques et maladies à tiques (EVOSYM) (par visioconférence, juillet 2020) – présentation orale « Genomic evolution of *Francisella*-based nutritional symbioses in ticks », [Marie Buysse](#), Yuval Gottlieb, Anna Maria Floriano, Davide Sassera and Olivier Duron

[2] Journée scientifique du Montpellier Ecology and Evolution of Disease Network (MEEDiN) (par visioconférence, octobre 2020) – présentation orale « Systèmes endosymbiotiques héréditaires chez les tiques : les tiques n'ont pas que des pathogènes », [Marie Buysse](#) and Olivier Duron

[3] Congrès Tiques et Maladies à Tiques (TMT) (par visioconférence, mars 2021) – présentation orale « Investigating the diversity of *Spiroplasma ixodetis* in ticks », [Marie Buysse](#) and Olivier Duron

[4] Journées des doctorants CIRAD-IRD Agadiades/PhDays (Montpellier, mai 2022) – présentation orale « Ticks, their nutritional partners and tick metagenomes », [Marie Buysse](#) and Olivier Duron

[5] Congrès de l'International Symbiosis Society / International Conference on Holobionts (ISS10/Holobiont3) (Lyon, juillet 2022) – présentation d'un poster « Ticks and their nutritional partners: When tick metagenomes do their bit », [Marie Buysse](#) and Olivier Duron

[6] Congrès Tick and Tick-Borne Pathogen Conference (TTP10) (Murighiol, Roumanie, août 2022) – présentation orale « *Rickettsia lusitaniae*, a widespread maternally inherited symbiont of *Ornithodoros* soft ticks », [Marie Buysse](#), Emilie Talagrand-Reboul, Valérie Noël, Karen McCoy, Maxime Duhayon, Laurence Vial, Nathalie Boulanger, Claudine Ménard and Olivier Duron

Etat de l'art

1. Introduction aux concepts

Les interactions interspécifiques régissent à de nombreux égards le devenir des individus et, à des échelles temporelles plus larges, le devenir des lignées évolutives. Ces interactions interspécifiques peuvent se manifester sous la forme de relations biotiques diverses, appelant des organismes d'origine similaire ou différente à interagir, des microorganismes aux eucaryotes multicellulaires. Les travaux de Charles Darwin introduisent très tôt le concept de sélection naturelle selon lequel les variations héréditaires portées par des individus impactent leurs capacités de survie et de compétition dans leur environnement, se répercutant sur leur reproduction et donc leur capacité à transmettre ces variations (Darwin, 1859). Des associations interspécifiques plus durables à l'échelle d'un individu que la prédation ou la compétition participent également à leur évolution : ce sont les interactions symbiotiques (Perru, 2006). Ces associations s'opèrent entre un hôte et un symbiote qui vivent ensemble de façon intime, parce qu'ils vivent soit l'un dans l'autre (le symbiote étant souvent défini comme vivant dans un organisme plus grand défini comme l'hôte), soit l'un sur l'autre. Leur symbiose peut alors bénéficier à chacun des partenaires (mutualisme), être délétère pour l'un au bénéfice de l'autre (parasitisme), ou bénéfique pour l'un tout en étant neutre pour l'autre (commensalisme). Deux organismes en symbioses vont donc influencer mutuellement leur valeur sélective (fitness) et par extension leur survie dans leur environnement. Les bénéfices apportés par des symbioses mutualistes vont alors déterminer de nouveaux traits phénotypiques qui peuvent être vus comme l'acquisition de nouvelles capacités biologiques permettant par exemple la colonisation de nouvelles niches écologiques, ou encore augmenter la valeur d'un trait déjà existant. L'origine symbiotique des eucaryotes, puis leur diversification ultérieure dans de multiples écosystèmes, résultent de ce type d'association (Gray, 1992; Kratz and others, 1991; Wernegreen, 2012). Nous allons nous focaliser par la suite sur les interactions symbiotiques impliquant au moins un microorganisme, souvent considéré par sa taille comme le symbiote. Il est cependant à noter que

les associations entre macroorganismes n'en sont pas pour autant négligeables. Par exemple, Claude Combes illustre dans ses œuvres qu'au-delà d'être des organismes vivant aux dépens d'autres, les parasites (pour beaucoup multicellulaires) sont engagés avec leurs hôtes dans une association où leurs intérêts antagonistes les entraînent dans une course aux armements, une course aux adaptations sur fond de coévolution (Combes, 2001, 1995).

1.1. Microorganismes, microbiome et interactions

Depuis leurs premières observations au XXVII^{ème} siècle par Antonie van Leeuwenhok, qui les appelaient alors des animalcules, nos connaissances et conceptions des microorganismes ont bien changé. Les différents paradigmes qu'a connu le champ disciplinaire de la microbiologie sont notamment dus aux innovations technologiques, supports de nombreuses découvertes : de la description d'organismes uniques liés au développement de pathologies à la certitude de l'existence de réseaux complexes d'organismes interagissant entre eux, et cela dans n'importe quel environnement (Berg et al., 2020) (Figure 1).

Le terme de microbiome, défini par Joshua Lederberg au début du XXI^{ème} siècle et qui est actuellement la définition la plus citée, désigne une communauté de microorganismes mutualistes, commensaux et pathogènes au sein d'un même environnement (Lederberg and McCray, 2001). Il est à noter que plusieurs définitions circulent et que le microbiome peut également être défini comme l'ensemble du microbiote (ensemble des communautés de microorganismes) et de leurs génomes (c'est la définition que nous utiliserons ici par la suite), ou encore l'ensemble des gènes, des génomes et produits du microbiote, toujours confiné au sein d'un même environnement (Berg et al., 2020). Les membres du microbiome peuvent être divers (bactéries, virus, champignons, protozoaires, levures) et interagissent entre eux, modulant leurs dynamiques et formant un réseau d'interactions. Plusieurs exemples de ces interactions et des détails sur les potentielles explications écologiques et évolutives seront données tout au long de la partie 1.2., mais la nature de ces interactions et leur répercussion sur la valeur sélective de

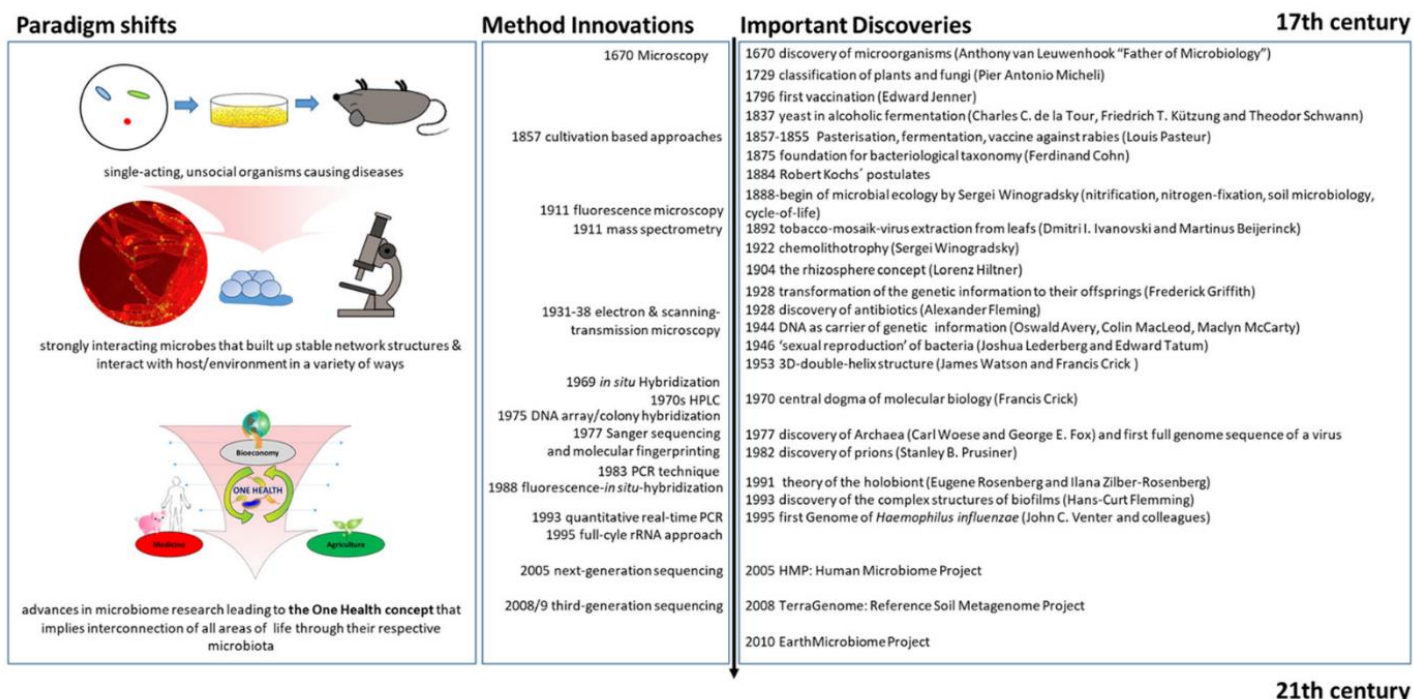


Figure 1. L'histoire de la recherche sur le microbiome depuis le XVII^{ème} siècle jusqu'à nos jours. Cette chronologie souligne le changement de paradigme des microbes en tant qu'organismes asociaux causant des maladies à la vision holistique des microorganismes étant le centre du concept One Health, interconnectant positivement tous les domaines de notre vie. D'aorès Berg et al. (2020).

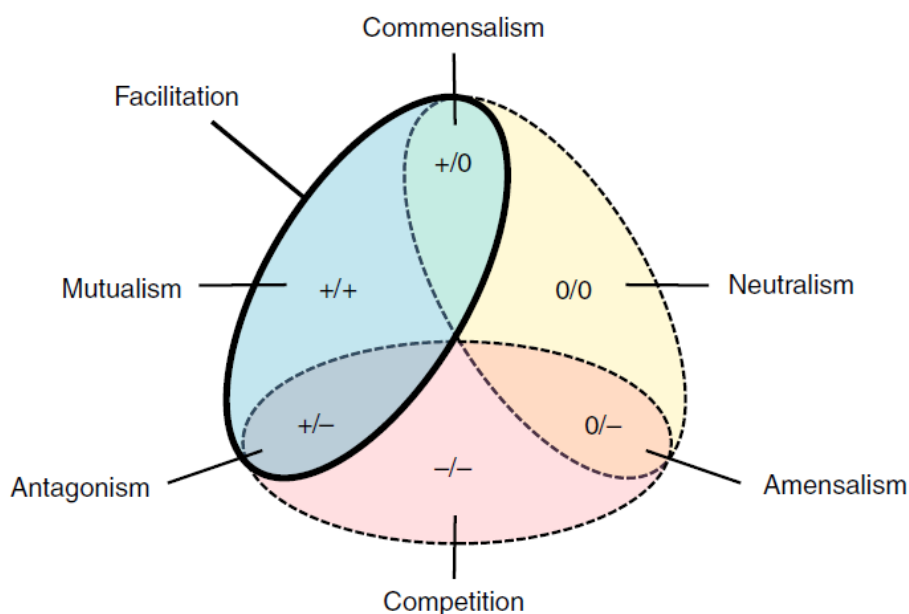


Figure 2. Diagramme montrant les différents types d'interactions écologiques. 0 : aucun effet ; - : effet négatif ; + : effet positif. D'après Zélé et al. (2018).

chaque organisme est résumée dans la Figure 2.

A l'intérieur d'un organisme hôte, la présence du microbiome peut se traduire comme l'acquisition de génomes accessoires, modifiant son phénotype « propre » en un phénotype étendu. Les interactions étroites qu'ils entretiennent au cours de la vie de l'hôte permettent de définir leur association comme symbiotique. Le microbiome humain et son incidence sont particulièrement étudiés. Nos tissus cutanés, organes et muqueuses sont tous colonisés par des communautés microbiennes, qui sont de surcroît différentes (Fierer et al., 2012). Des fonctions bénéfiques variées lui sont attribuées comme la production ou la digestion de métabolites particuliers, le développement du système immunitaire ou encore des tissus (Gill et al., 2006; Pflughoeft and Versalovic, 2012; Robinson et al., 2010). Il influencerait notre santé (Huttenhower et al., 2012; Mousa et al., 2022), mais aussi notre comportement et capacités cognitives (Cryan et al., 2019). Cependant, des effets négatifs, comme la modulation de la susceptibilité à des agents pathogènes ou l'occurrence de certaines maladies, sont reliés à des perturbations chez ce dernier (Amirkhanzadeh Barandouzi et al., 2020; Mousa et al., 2022; Pflughoeft and Versalovic, 2012). L'incidence de pathologies métaboliques et cognitives (e.g. obésité, dépression, maladie de Crohn) pourrait ainsi dépendre d'un facteur microbien, en plus de facteurs environnementaux et/ou génétiques. Comprendre le réseau complexe d'interactions du microbiome et les facteurs intrinsèques et extrinsèques qui l'influencent permettrait de cerner les déterminants de son état (sain, dégradé) et de sa stabilité (stable, transitoire). *In fine*, cette stratégie pourra être le support du développement des traitements de certaines pathologies associées au déséquilibre du microbiome (Lozupone et al., 2012; Mousa et al., 2022; Schwartz et al., 2020). Pour illustration, plusieurs études s'intéressent à la constitution du microbiome ; chez l'humain, celui-ci se développerait dès la gestation et se poursuivrait pendant l'enfance (Moore and Townsend, 2019), influencé par des facteurs environnementaux et maternels (Mueller et al., 2015), et où une altération dans son développement augmenterait le risque de problèmes de santé durant l'enfance et l'âge adulte (Healy et al., 2022). Le mode d'accouchement serait l'un de ses facteurs déterminants (Neu and Rushing, 2011) et cette réalisation induit maintenant des discussions

autour de potentiels effets bénéfiques d'ensemencements chez les nourrissons nés par césarienne à partir du microbiome vaginale de leur mère (Cunnington et al., 2016). Il semblerait bien que même si l'idée que les microbes sont associés à la maladie dans l'esprit collectif (à juste titre), la prise en compte des bactéries et leur utilisation comme support thérapeutique (Dery et al., 2020; Giles et al., 2019; MacConnachie et al., 2009; Rohde et al., 2018; Schwartz et al., 2020) ou encore la promotion de probiotiques (Watson and Preedy, 2016) s'inscrivent dans la continuité du changement d'appréhension du monde microbien.

Des communautés microbiennes sont identifiées dans des environnements variés (Flemming and Wuertz, 2019) et chez une grande diversité d'hôtes, des animaux (Hanning and Diaz-Sanchez, 2015), aux plantes (Turner et al., 2013; Vandenkoornhuyse et al., 2015), jusqu'aux protistes (Delafont et al., 2013). Chez ces organismes, le microbiome peut là encore être associé à de multiples effets phénotypiques. Chez les mammifères, les arthropodes ou les plantes, le microbiome est associé à des bénéfices métaboliques nutritionnels comme l'assimilation de composés, la digestion de composés complexes et l'apport de nutriments déficients dans leur alimentation (Bulgarelli et al., 2013). Il joue également un rôle direct ou indirect dans la réponse face à des agents pathogènes en influençant et stimulant le système immunitaire ou en rentrant en compétition avec ceux-ci (Flórez et al., 2015; McLaren and Callahan, 2020), un tout que l'on peut qualifier sous le terme de symbiose défensive. Les microorganismes pourraient également participer à la détoxification d'une ressource alimentaire (Adams et al., 2013). La composition du microbiome d'un hôte impacterait également sa perception par d'autres organismes intra- et interspécifiques (Adams and Six, 2008; Sharon et al., 2010), influençant alors les comportements sociaux et la communication chimique (Carthey et al., 2018; Ezenwa et al., 2012). Au-delà d'altérer leur perception, les symbiotes pourraient être des acteurs du développement du système cognitif de leur hôte (DeNieu et al., 2019; Heijtz et al., 2011; Stilling et al., 2014) et influenceraient le potentiel des capacités cognitives (Vuong et al., 2017). Cependant, des communautés microbiennes déséquilibrées, qu'elles soient stables ou transitoires, peuvent avoir des retombées négatives sur la valeur sélective de leur hôte, jusqu'au développement de pathologies, elles non

transitoires (Lozupone et al., 2012; McCarville et al., 2020; Mousa et al., 2022; Schwartz et al., 2020). Néanmoins, l'importance de plusieurs de ces fonctions, la complexité des interactions hôte-microbiome et la spécificité que des hôtes présentent pour des communautés microbiennes stables suggèrent l'existence de processus coévolutifs entre hôte et microbiome, pouvant impacter jusqu'à leur spéciation individuelle ou mutuelle (co-spéciation) (Brucker and Bordenstein, 2012; Fisher et al., 2017; Koskella and Bergelson, 2020; Miller et al., 2021; Vavre and Kremer, 2014).

Dans ce contexte, comprendre la structuration du microbiome demanderait une considération à la fois multifactorielle et multi-échelle. A une échelle intra-individuelle, l'éventail d'interactions interspécifiques entre microorganismes intervient dans l'établissement, le maintien ou l'élimination des taxons (Figure 2). A une échelle inter-individuelle, en poursuivant sur l'exemple du microbiome humain, plusieurs facteurs comme l'âge, la génétique, des pratiques culturelles ou médicales, l'environnement abiotique et biotique, et l'alimentation présentent un effet sur la composition des communautés microbiennes (Davenport, 2016; Huttenhower et al., 2012; Mousa et al., 2022; Schwartz et al., 2020). Si une échelle écologique supérieure est considérée (interspécifique), l'enjeu est de discerner si la structuration du microbiome relève de processus écologiques (e.g. régime alimentaire), de processus évolutifs (e.g. proximité phylogénétique) et/ou de leurs combinaisons (e.g. physiologie de l'intestin) (Groussin et al., 2017; Ley et al., 2008b, 2008a; Moran and Sloan, 2015; Muegge et al., 2011; Rojas et al., 2021).

1.2. Evolution des niveaux d'appréciation des interactions hôte-microorganismes

L'importance phénotypique du microbiome mise en évidence chez divers organismes et l'existence de processus coévolutifs entre hôte et microbiote ont amené à interroger la notion même d'individualité. Ont alors été proposés les concepts d'holobionte et hologénome. D'abord introduit en 1991 par Lynn Margulis, le terme holobionte renvoie à la considération d'un hôte et

de son symbiote héritable comme une unique entité biologique et écologique (Margulis, 1991); il a plus tard été étendu à son hôte et son microbiote. L'hologénome représente lui la considération de l'ensemble des génomes d'un holobionte (Rosenberg et al., 2007; Zilber-Rosenberg and Rosenberg, 2008). Si pour certains le concept ne peut que souligner l'importance de considération des interactions intriquées hôte-microbiote, d'autres s'interrogent sur l'utilité de son utilisation qui tendrait à la simplification aux vues de certains processus éco-évolutifs (Bordenstein and Theis, 2015; Douglas and Werren, 2016; Moran and Sloan, 2015; Theis et al., 2016), jusqu'à même la confusion avec la circulation de diverses formulations (Moran and Sloan, 2015). Une question encore très débattue est la considération de l'holobionte comme une unité de sélection et la considération d'échelles au sein de l'holobiome (Douglas and Werren, 2016; Koskella and Bergelson, 2020; Rosenberg and Zilber-Rosenberg, 2018). De plus, la généralisation du concept d'holobionte à tous les organismes diluerait selon certains la considération que la dépendance aux symbiotes microbiens d'un hôte est variable et l'existence d'organismes avec peu ou pas de microorganismes associés (Hammer et al., 2019). Ces challenges pointent la nécessité d'approches expérimentales multi-facettes (dont des approches OMICS) pour apprécier toutes les notions à l'œuvre dans ces concepts d'holobionte et hologénome, comme par exemple la transmission, la persistance des différentes associations hôte-microbiote, les interactions microbiote-microbiote, ou encore la nature des processus coévolutifs mis en évidence (Gerardo and Hurst, 2017; Moran and Sloan, 2015; Simon et al., 2019). Mais plusieurs de ces points d'attention sont évidemment tout aussi valables à l'échelle des symbioses mono-symbiotiques.

Les changements de paradigmes précédemment décrits ont également influencé la considération envers les agents pathogènes. La maladie n'est plus considérée nécessairement comme le produit d'un agent pathogène unique, vision découlant des postulats de Koch et critères de Hill en épidémiologie et médecine datant de la fin des XIX^{ème} et XX^{ème} siècles, respectivement. Plus haut, nous discutons que des déséquilibres du microbiome pouvaient impacter négativement son hôte, voire être corrélés au développement de pathologies. Les communautés déséquilibrées sont qualifiées en dysbiose (pour l'inverse d'eubiose, «en état de biose»). Un

nouveau terme est alors apparu, « pathobiome », pour définir les taxons formant ces communautés (Bass et al., 2019; Defazio et al., 2014). Ce concept ne supprime pour autant pas la notion qu'un agent pathogène cause une pathologie mais soulignerait que ses effets sont susceptibles d'être modulés par les autres membres du microbiome. Le terme pathobiome est d'ailleurs aussi défini comme l'intégration de l'agent pathogène dans son environnement biotique (Vayssier-Taussat et al., 2014). L'application de ce concept peut être particulièrement intéressante chez les vecteurs (i.e. hôte impliqué dans le cycle de développement et la transmission d'un agent pathogène). En effet, s'il est présumé que la grande majorité des organismes est associée à un microbiome, il existe de potentielles interactions au sein de ceux-ci, les agents infectieux qu'ils transmettent et d'autres microorganismes. Plusieurs études démontrent ainsi l'impact que leur microbiome ou des changements chez ce dernier ont sur l'acquisition et la virulence des agents pathogènes, se répercutant sur leur compétence vectorielle (Weiss and Aksoy, 2011). L'ajout du concept de pathobiome ne peut qu'inciter à l'intégration de multiples concepts et disciplines pour une meilleure compréhension de l'occurrence des pathologies et la mise en place de stratégies de prévention et de contrôle. Cependant, devant se reposer sur l'établissement de plusieurs caractéristiques relevant de compétences disciplinaires et capacités technologiques variées (e.g. définir une communauté microbienne et comprendre l'impact de ses membres sur la pathogénèse), son étude pourraient se heurter à de nombreux challenges (Vayssier-Taussat et al., 2014).

1.3. Continuum mutualisme-parasitisme

Nous avons présenté plus haut les associations symbiotiques comme mutualistes, commensalistes ou parasitaires d'après l'impact que le symbiote et l'hôte exercent l'un sur l'autre. Mais ces définitions gagnent à être considérées au regard du dynamisme et de la complexité d'une association symbiotique. Tout d'abord, la nature d'une association peut se définir par la balance coût-bénéfice d'un partenaire sur l'autre. En effet, toute infection d'un symbiote chez son hôte

entraîne des coûts physiologiques (e.g. exploitation d'un pôle de ressources limité, induction du système immunitaire) et c'est l'apport de bénéfices par le symbiote qui viendra ou non contrebalancer ces coûts (Keeler, 1985). A cela s'ajoute que de nombreux facteurs abiotiques ou biotiques peuvent venir influencer cette balance et donc la nature d'une même association pourrait varier d'un environnement à un autre (Saffo, 1992). Enfin, un même symbiote peut entretenir une relation mutualiste chez un hôte et une relation parasitaire chez un autre (Sicard et al., 2004). L'utilisation d'un continuum entre le mutualisme et le parasitisme, en passant par le commensalisme, permet d'appréhender la variabilité de la nature d'une symbiose, qui plus est dans un contexte d'holobionte.

1.4. Endosymbioses

Les endosymbioses sont une sous-catégorie symbiotique où le symbiote est hébergé au sein de son hôte, dans ses cellules ; le symbiote sera alors appelé endosymbiote. Dans le cas d'endosymbioses intracellulaires, hôte et endosymbiote sont engagés dans des interactions étroites et complexes qui façonnent leur histoire évolutive. L'émergence des eucaryotes et leur diversification écologique et évolutive ont par exemple été fortement influencés par ce type d'associations (Brucker and Bordenstein, 2012; Koskella and Bergelson, 2020; Wernegreen, 2012). Les mitochondries et les chloroplastes, organelles majeurs des eucaryotes hétérotrophes et autotrophes respectivement, sont les produits évolutifs d'endosymbioses impliquant des bactéries (Margulis, 1967; Wernegreen, 2012). Répertoirees chez des organismes hôtes de différentes branches du vivant, les endosymbioses auraient permis d'acquérir une diversité de nouvelles fonctions biochimiques permettant à des organismes de pouvoir coloniser différents environnements, ayant parfois des conditions extrêmes.

Il est important de considérer que les endosymbiotes sont des membres de l'holobionte et ainsi s'inscrivent dans les réseaux d'interaction précédemment discutés. Nous nous attarderons ici à décrire les processus évolutifs particuliers qui influencent les associations endosymbiotiques.

1.4.1. Phénotype étendu et convergence évolutive

Les exemples d'endosymbioses précédemment décrits illustrent l'impact fort de ce type d'association sur chaque partenaire. Le phénotype de l'hôte peut se retrouver totalement modifié par l'acquisition de nouvelles capacités biochimiques, comme par exemple le shift qu'ont vécu les cellules eucaryotes de l'hétérotrophie à l'autotrophie via une seconde endosymbiose primaire, se rendant indépendantes de l'acquisition de matière organique pour leur production d'énergie cellulaire et favorisant l'exploitation de nouvelles niches écologiques. Des endosymbioses plus récentes, chez des arthropodes (émergence au Cambrien, entre 538 et 485 millions d'années), sont également associées à la capacité d'exploiter des sources alimentaires déficientes en nutriments essentiels (Douglas, 2009). Par exemple, le phloème est riche en sucres mais pauvre en protéines et acides aminés, le sang est riche en protéines mais pauvre en sucres, lipides et vitamines, les produits d'origine végétale comme le bois contiennent des composés complexes difficilement dégradables (e.g. cellulose) (Douglas, 2006; Sterkel et al., 2017). Ces spécialisations trophiques extrêmes reposent alors pour beaucoup sur des associations endosymbiotiques : à plusieurs égards les arthropodes présentent des adaptations génomiques pour compenser plusieurs implications de leur régime biaisé (Douglas, 2006; Gulia-Nuss et al., 2016; Jia et al., 2020; Li et al., 2021), mais, comme la plupart des eucaryotes, ils ne peuvent pas assurer la synthèse *de novo* de certaines molécules, notamment les vitamines. Les endosymbiotes peuvent compléter leurs hôtes en acides aminés essentiels, vitamines B (Douglas, 2009; Tokuda et al., 2013), stéroïdes (Nasir and Noda, 2003; Noda and Koizumi, 2003) ou encore caroténoïdes (Sloan and Moran, 2012) selon le système endosymbiotique (Rio et al., 2016), et participer à la dégradation ou au transport d'autres composés (Calderón-Cortés et al., 2012; Husnik et al., 2020). De multiples espèces bactériennes sont impliquées dans ces endosymbioses nutritionnelles (Sachs et al., 2011), mais le rôle d'autres microorganismes comme des levures a également été mis en évidence (Nasir and Noda, 2003; Noda and Koizumi, 2003). Ce type de symbiose a été particulièrement étudié chez les pucerons, et ce par incidence historique (Buchner, 1965), mais son importance est désormais démontré chez plusieurs autres familles d'arthropodes comme des fourmis, des cafards

xylophages, des cicadelles, des cochenilles, des tiques, des poux, punaises de lits, mouches tsé-tsé, triatomes (Douglas, 2009; Duron and Gottlieb, 2020; Feldhaar et al., 2007; Sabree et al., 2009; Tokuda et al., 2013) (liste non-exhaustive), et même au-delà des arthropodes chez d'autres invertébrés (Brown et al., 2015; Gottlieb et al., 2012) et protistes (Graf et al., 2021).

D'autre part, alors que leurs hôtes sont engagés dans un réseau trophique où ils interagissent avec des ennemis naturels (prédateurs, parasitoïdes, agents pathogènes), les endosymbiotes peuvent leur apporter une protection contre ceux-ci. Ces modes de protection peuvent être indirects ou directs : une compétition pour les ressources de l'hôte (énergétique ou spatiale), la production de toxines et l'activation/stimulation du système immunitaire. Ces symbioses défensives commencent à être bien documentées chez plusieurs arthropodes (Flórez et al., 2015; Haine, 2008). Plusieurs souches de *Spiroplasma* d'insectes leur procurent une protection contre des nématodes, des guêpes parasitoïdes et des champignons, notamment via la production de toxines (RIP pour « ribosome-inactivating proteins ») (Ballinger et al., 2018a; Ballinger and Perlman, 2019). L'endosymbiote *Hamiltonella defensa* est impliqué dans la résistance contre des guêpes parasitoïdes chez des pucerons (Oliver et al., 2003), et une infection des bactéries par des bactériophages modulerait cette protection (Oliver and Higashi, 2019). Ces partenaires endosymbiotiques participent donc à la résistance de leurs hôtes à des stress biotiques, alors que d'autres permettent à l'hôte de s'adapter à des conditions abiotiques variables, voir délétères (e.g. chocs thermiques, exposition à des insecticides) (Liu and Guo, 2019; Montllor et al., 2002).

Les exemples précédemment présentés illustrent en général des associations mutualistes, mais les arthropodes peuvent également être infectés par des bactéries intracellulaires ayant un effet plus complexe sur leurs hôtes : ce sont les manipulateurs de la reproduction. Ces endosymbiotes parasitent la reproduction de leur hôte pour leur « propre intérêt », c'est-à-dire leur persistance dans les populations hôtes de générations en générations. Ces bactéries étant transmises maternellement, des mécanismes biaisant le sexe ratio de la progéniture des hôtes vers les femelles infectées ont ainsi été sélectionnés, allant jusqu'à même éliminer les mâles à

naître : le *male-killing*, la féminisation des mâles génétiques en femelles fonctionnelles, l'induction de parthénogénèse et l'incompatibilité cytoplasmique (forme de stérilité conditionnelle entre les individus non-infectés ou infectés par différentes souches bactériennes) (Hurst and Jiggins, 2000). Le mécanisme moléculaire de certains de ces mécanismes reste encore peu connus (Hamilton et al., 2018). *Wolbachia* est parmi la bactérie manipulatrice de la reproduction la plus connue mais aussi la plus répandue ; elle infecterait près de 60% des espèces d'arthropodes (Weinert et al., 2015). D'autres bactéries sont aujourd'hui identifiées comme utilisant au moins l'un de ses mécanismes (e.g. *Cardinium*, *Spiroplasma*, *Rickettsia*) (Duron et al., 2008). Ces effets phénotypiques soulignent particulièrement que la persistance dans les populations hôtes est une question centrale pour les membres des interactions symbiotiques. Nous avons vu qu'une infection par un symbiote apportait des coûts à son hôte et donc si ce coût n'est pas contrebalancé par des bénéfices, cet hôte infecté aura une valeur sélective moindre par rapport à un hôte non-infecté, le défavorisant aux yeux de la sélection naturelle. Caractériser l'impact d'un symbiote sur son hôte permet alors d'appréhender les stratégies évolutives de chacun et les différents mécanismes qui assuraient leurs interactions.

Deux grandes catégories phénotypiques ont été décrites pour apporter des premiers éléments à l'évaluation de ces stratégies évolutives. La première concerne les symbiotes obligatoires qui sont nécessaires pour le développement, la survie et la reproduction de leur hôte. Leur nature obligatoire se traduit par une infection quasi-parfaite au sein des espèces d'hôtes et au sein du cycle de vie de l'hôte. Les endosymbiotes nutritionnels sont pour beaucoup des symbiotes obligatoires. La seconde comprend les symbiotes facultatifs, leur présence n'étant pas nécessaire au cycle de vie de leur hôte. Leurs bénéfices pour leur hôte seront environnement-dépendant, ce qui se traduira par des prévalences variables entre populations d'une même espèce hôte. Une explication de cette variabilité résiderait encore une fois dans la balance coûts-bénéfices de l'interaction : en l'absence de pression de sélection qui favorise les individus infectés, l'infection n'est pas maintenue au cours des générations. Rentre dans cette catégorie tout endosymbiote apportant un avantage face à un environnement biotique ou abiotique challengeant l'hôte (e.g.

symbiotes défensifs) et les manipulateurs de la reproduction. Il est néanmoins à noter que ces catégories ne sont pas hermétiques (Keeling and McCutcheon, 2017). Il est proposé par exemple que l'établissement d'un endosymbiote mutualiste obligatoire peut s'établir à partir de l'acquisition d'endosymbiotes facultatifs ou même pathogènes (McCutcheon et al., 2019). Pour finir, il est à noter qu'un genre bactérien n'est pas assujéti à un effet phénotypique. Si *Wolbachia* est bien connue pour manipuler la reproduction de son hôte, certaines souches ont cependant été associées à des phénotypes nutritionnels (Brownlie et al., 2009) et défensifs (Hamilton and Perlman, 2013).

Les associations endosymbiotiques impliquent à la fois une diversité taxonomique d'hôtes et de microorganismes symbiotiques. Pourtant, pour l'apport d'un bénéfice similaire, le rôle de voies métaboliques proches peut être mis en lumière. Les arthropodes hématophages stricts, comme les punaises de lit, les poux, les tiques, ou encore les mouches tsétsé, sont associées avec des bactéries endosymbiotiques d'origines phylogénétiques diverses, tout comme les sangsues (embranchement des Annélides). Malgré la diversité de leurs origines phylogénétiques, ces systèmes ont tous évolué vers une supplémentation symbiotique obligatoire via des vitamines B (Duron and Gottlieb, 2020). La production de vitamines B n'est de surplus pas spécifique aux hématophages stricts, mais est identifiée aussi chez des insectes se nourrissant de sève (Ju et al., 2020; Wang et al., 2020) ou encore chez des endosymbiotes facultatifs (Su et al., 2014). Ce phénomène de convergence évolutive semble être réparti dans les différentes catégories d'endosymbioses (Chaston et al., 2011; Harumoto et al., 2018; H. Li et al., 2018; Manzano-Marín et al., 2016; Skidmore and Hansen, 2017).

1.4.2. Modes de transmission et dépendance

Pour continuer à explorer les mécanismes liés à la persistance d'un endosymbiote, il est essentiel d'étudier comment celui-ci s'acquiert de générations en générations chez son hôte, c'est-à-dire son mode de transmission. Fondamentalement, deux types de transmission existent :

horizontale (à partir de l'environnement ou d'un autre hôte non-apparenté) et verticale (transmission à la descendance par la mère ou les deux parents). Dans le cas d'une transmission verticale, le maintien entre générations du symbiote est lié à la valeur sélective de son hôte et dans ce cas, ce symbiote aurait un intérêt à favoriser le succès reproducteur de son hôte en lui apportant divers bénéfices. Nous avons vu une exception à cette hypothèse dans le cadre des manipulateurs de la reproduction. Dans le cas d'une transmission horizontale, la dispersion du symbiote ne dépend pas de la reproduction de son hôte et ainsi un impact délétère sur celle-ci n'est pas contre-sélectionné. D'après ces théories, les symbiotes bénéfiques, qui plus est mutualistes, seraient plus associés à une transmission verticale alors que les parasites seraient associés à une transmission horizontale. Les endosymbiotes mutualistes obligatoires (notamment chez les arthropodes) sont en effet majoritairement à transmission verticale (Moran et al., 2008). Néanmoins, il est difficile de généraliser qu'un mode de transmission prédise la dépendance d'un hôte à son symbiote (Fisher et al., 2017). Un exemple illustratif simple serait la dépendance variable d'un hôte pour son symbiote facultatif alors que ce dernier est transmis verticalement. Si Fisher et al. (2017) démontre par corrélation que la dépendance d'un hôte est plus forte en association avec des symbiotes à transmission verticale, qui plus est nutritionnels, il argumente également que ce résultat pourrait surtout être applicable aux espèces terrestres (mais non généralisable, avec des exemples de symbioses à transmission maternelle chez des éponges (Schmitt et al., 2008) et des bivalves (Krueger et al., 1996). En effet, dans plusieurs endosymbioses aquatiques mutualistes, l'espèce hôte acquiert ses symbiotes à chaque génération dans l'eau environnante (Dubilier et al., 2008; Hartmann et al., 2017). Pour exemple, la sépiole *Euprymna scolopes* acquiert à chaque génération, et maintient au cours de sa vie, la bactérie bioluminescente *Vibrio fischeri* (McFall-Ngai and Ruby, 1998). Dans le cadre de ces associations, des mécanismes de reconnaissance et de colonisation vont influencer l'entrée et l'établissement de ces symbiotes particuliers, mélangés aux autres microorganismes de la colonne d'eau (Bright and Bulgheresi, 2010; Nyholm and McFall-Ngai, 2021). Par exemple, la salamandre *Ambystoma maculatum* et l'algue verte *Oophila amblystomatis* entretiennent une relation mutualiste où cette

dernière va infecter son hôte au stade d'œufs quand ces derniers se développent dans un tapis mucus dans l'eau, puis migrer dans ses tissus et cellules (Kerney et al., 2017). Néanmoins l'entrée de cette algue n'est pas corrélée à une entrée massive d'autres bactéries (Bishop et al., 2021). Des processus coadaptatifs encadrent donc ces associations à transmission horizontale et maintiennent leur forte fidélité d'association, c'est-à-dire la tendance entre deux espèces à interagir partout où elles coexistent. Chez les endosymbioses à transmission verticale, cette fidélité est souvent le reflet de la stabilité d'une association, liée elle à la maintenance de l'alignement des intérêts reproducteurs des partenaires, mais pas exclusivement à des mécanismes d'infection des cellules germinales. Si la transmission verticale est un moyen d'assurer l'acquisition d'un symbiote jouant un rôle crucial chez l'hôte (et sa progniture *de facto*), celle-ci peut s'établir par plusieurs mécanismes de transmission internes ou externes (Funkhouser and Bordenstein, 2013; Nyholm, 2020). Le symbiote peut ainsi être transmis via le cytoplasme des œufs, l'ensemencement de l'extérieur de l'œuf (Kaltenpoth et al., 2009; Prado et al., 2006) et le dépôt de capsules symbiotiques (Hosokawa et al., 2010).

Ces modes de transmission horizontale et verticale ne sont pas pour autant exclusifs et des endosymbiotes mutualistes ou parasites arborent souvent des transmissions mixtes (36% de symbiotes à transmission mixte contre 21% et 43% à transmission strictement horizontale ou verticale d'après une méta-analyse de Russell (2019)). D'une part, les virus et parasites sont principalement associés à une transmission horizontale infectieuse, mais ceux-ci peuvent également se transmettre lors des soins parentaux ou à la naissance. Chez les symbiotes impactant négativement la valeur sélective de leur hôte, l'évolution du mode de transmission est souvent liée à l'évolution de leur virulence, où des agents pathogènes à transmission principalement horizontale tendent à une forte virulence et où ceux à transmission verticale tendent vers une virulence plus faible (Antonovics et al., 2017). Théoriquement, les agents pathogènes subissant un changement de stratégie horizontale à verticale, dépendant maintenant de la reproduction de leur hôte, pourraient donner émergence à des symbiotes bénéfiques (McCutcheon et al., 2019). Néanmoins, ce mode de transmission mixte peut également se traduire par la favorisation de la

maintenance d'agents pathogènes (Ebert, 2013; Sambado et al., 2020). D'autre part, ces stratégies de transmission mixte sont retrouvées chez des symbiotes mutualistes, qui ainsi peuvent occasionnellement être transmis entre individus d'une même espèce ou même d'une espèce différente. Ces évènements peuvent notamment se produire dans le cadre de symbiotes facultatifs, où ceux-ci pourraient être acquis de l'environnement ou d'une interaction avec un hôte infecté. A une échelle plus large, plusieurs études phylogénétiques comparant la congruence entre la phylogénie des hôtes et de leurs symbiotes à transmission verticale mettent en évidence que des hôtes phylogénétiquement distants partagent des symbiotes proches. Ces évènements de transmission entre espèces hôtes seraient fréquents chez plusieurs genres bactériens symbiotiques d'invertébrés majeurs (Siozios et al., 2018) (aussi appelés changements d'hôtes) et illustrent la complexité des histoires évolutives entre hôtes et symbiotes obligatoires.

Nous définirons ici (et étudierons par la suite) des symbiotes héréditaires comme des partenaires microbiens se transmettant verticalement dont des capacités de transferts horizontaux peuvent exister.

1.4.3. Processus adaptatifs hôte - symbiote et coévolution

La stabilité des associations entre endosymbiotes mutualistes et les arthropodes découle de mécanismes adaptatifs à la fois chez l'hôte et son symbiote (Wernegreen, 2017).

L'association avec un endosymbiote mutualiste s'accompagne très souvent de spécialisations cellulaires (les cellules hôtes, souvent géantes, hébergeant des endosymbiotes sont appelées des bactériocytes) et tissulaires (un bactériome est un organe spécialisé composé d'un regroupement de bactériocytes). Ces adaptations donnent un microenvironnement privilégié d'interactions entre les endosymbiotes et les cellules hôtes. Les cellules et tissus hôtes prodiguent aux endosymbiotes les composés nécessaires pour ses voies métaboliques mais également ceux dont ils nécessitent pour synthétiser les nutriments qu'ils fournissent à la cellule hôte (e.g. cas des endosymbioses nutritionnelles) (Heddi et al., 2005). La compartimentalisation

de l'interaction a également plusieurs autres avantages. Elle permet le contrôle de la dispersion et de la reproduction des endosymbiotes, dans un but de contrôle des coûts pour l'hôte, mais permet aussi d'assurer sa transmission à la génération suivante (Chomicki et al., 2020). Face à la diversité du microbiome et à la complexité de systèmes symbiotiques (i.e. multi-partenaires), le contrôle de l'infection chez l'hôte permet aussi de réduire les conflits intra-hôtes qui pourraient impacter négativement l'hôte. La compartimentalisation n'est pas uniquement un moyen de contrôle pour l'hôte mais joue également le rôle de barrière physique contre des réponses immunitaires de ce dernier (Ferrarini et al., 2022; Login et al., 2011). Il est cependant à noter qu'un bactériocyte peut être un lieu de co-infection, abritant deux ou plus endosymbiotes, tout comme un bactériome. Chez des aleurodes (Hémiptères), le bactériocyte où se trouve l'endosymbiote mutualiste obligatoire *Portiera* peut également héberger différents endosymbiotes facultatifs, mais ceux-ci ne partageront pas les mêmes niches cellulaires (Gottlieb et al., 2008). Dans ce cadre d'hébergement privilégié, notamment pour des endosymbiotes facultatifs, les associations endosymbiotiques reposent également sur des mécanismes de reconnaissance et spécificité hôte-symbiote (Hillman and Goodrich-Blair, 2016).

L'existence même d'une endosymbiose repose sur la présence d'un organisme dans une cellule hôte et donc suppose l'existence de mécanismes permettant l'infection cellulaire, tout du moins au début de leur interaction. Plusieurs hypothèses sont couramment proposées pour expliquer l'origine évolutive des endosymbiotes nutritionnel : un agent pathogène de l'hôte ou d'un autre organisme (dont l'hôte aurait été vecteur) ou encore d'un endosymbiote mais pour lequel une capacité de transmission horizontale persiste (liée à une spécialisation récente) (McCutcheon et al., 2019). Sous l'hypothèse où l'endosymbiote serait issu d'un ancêtre pathogène, l'hôte infecté subirait un coût de l'infection mais ce coût serait neutralisé par un changement phénotypique du symbiote. Ces nouvelles interactions, souvent accompagnées de changements de mode de transmission, vont générer de nouvelles pressions de sélection et vont se traduire par différentes modifications génomiques. Le confinement dans les bactériocytes et les goulots d'étranglement au moment de la transmission à la génération suivante imposent l'existence de

populations endosymbiotiques de taille restreintes, avec peu d'opportunité de recombinaison : dans ce contexte, l'impact de la sélection est typiquement limité, alors que les effets de la dérive génétique sont renforcés, entraînant la fixation de mutations délétères (cliquet de Müller) (Moran, 1996). Dans les génomes endosymbiotiques, ce phénomène se traduira par une augmentation du taux de pseudogénération et la perte de gènes, c'est-à-dire une réduction génomique (Figure 3). Cependant, il est à discuter si ces pertes ne résulteraient pas à la fois de processus adaptatifs et stochastiques. Certaines fonctions perdues pouvaient être redondantes entre l'hôte et le symbiote (ce dernier devenant certes dépendant de la participation de son hôte à la fonction ou même la production de son produit) et dont la perte diminuerait la demande en ressources du symbiote (D'Souza and Kost, 2016) ; d'autres pertes de fonction pourraient permettre de réduire l'intensité de la réponse immunitaire de l'hôte par la perte de molécules de reconnaissance à la surface du symbiote. Il est intéressant également de constater que les gènes de virulence d'anciens agents pathogènes peuvent être transitoirement maintenus (Flórez et al., 2017; Hrusa et al., 2015). Les différentes voies métaboliques impliquées dans l'apport bénéfique du symbiote sont, elles, conservées par une forte pression sélective étant donné la nature obligatoire de l'interaction du symbiote avec son hôte (Moran et al., 2008).

A la suite de ce processus de dégénération, les génomes des endosymbiotes sont certes plus réduits en taille tout en présentant une densité codante plus forte et également un taux élevé en bases nucléotidiques A et T à cause des biais de mutations (Latorre and Manzano-Marín, 2017; Manzano-Marín and Latorre, 2016; McCutcheon et al., 2019), indépendamment de leur origine phylogénétique (Gil et al., 2003; Manzano-Marín et al., 2022) (Figure 4). Cette réduction génomique peut atteindre des extrêmes où le génome symbiotique n'encode plus que très peu de gènes dont ceux codant pour les fonctions essentielles aux interactions symbiotiques, et est donc devenu dépendant de son hôte pour son propre métabolisme, contraint à une vie intracellulaire stricte. Les bactéries endosymbiotiques obligatoires mutualistes encodent parmi les plus petits génomes bactériens identifiés (Moran and Bennett, 2014), pouvant atteindre 112 kb pour l'un des plus petits chez *Candidatus* *Nasuia deltocephalinicola* infectant la cicadelle *Macrostelus*

quadrilineatus (Bennett and Moran, 2013). Les associations impliquant ces génomes réduits (même extrêmes) seraient néanmoins à un état stable qui pourrait se maintenir sur une longue période (Degnan et al., 2005).

Ces différentes coadaptations peuvent influencer l'évolution de chacun des partenaires qui, dépendant de la stabilité de leur association, peut se traduire par des phénomènes de co-spéciation et co-diversification (Brucker and Bordenstein, 2012; Koskella and Bergelson, 2020). Ces processus peuvent notamment être mis en avant par la phylogénie des partenaires et l'observation de schémas de co-cladogénèse (Coimbra-Dores et al., 2020; Lo et al., 2003; Takiya et al., 2006; Wernegreen, 2002).

1.4.4. Erosion génomique et conséquences

La coévolution entre partenaires symbiotiques n'est pas obligatoirement synonyme de stabilité ou de pérennisation de l'interaction. Tout d'abord, si le processus d'érosion génomique impacte le génome des symbiotes, il affecte également le génome des hôtes. En effet, la fixation des mutations aléatoires peut être bénéfique pour le symbiote mais délétère pour l'hôte qui subira alors une pression de sélection pour réduire ce coût. Ces influences entre impacts et compensations vont entraîner les partenaires dans un cercle vicieux évolutif appelé *evolutionary rabbit hole*, semblable à la course aux armements entre un parasite et son hôte et la « théorie de la Reine Rouge » (Bennett and Moran, 2015). Par exemple, la perte d'efficacité d'une fonction essentielle par dérive pourrait contraindre l'hôte à compenser le manque nutritionnel par une supplémentation via un autre endosymbiote. Le puceron *Cinara cedri* possède par exemple deux bactéries *Buchnera* et *Serratia symbiotica*, et cette co-infection coïncide avec la perte de certaines fonctions chez *Buchnera* mais leur prise en charge par *Serratia* (Lamelas et al., 2011). Le coût associé au maintien de multiples symbiotes étant en théorie plus élevé que celui associé à un système monosymbiotique, si le second symbiote possède les fonctions requises pour maintenir

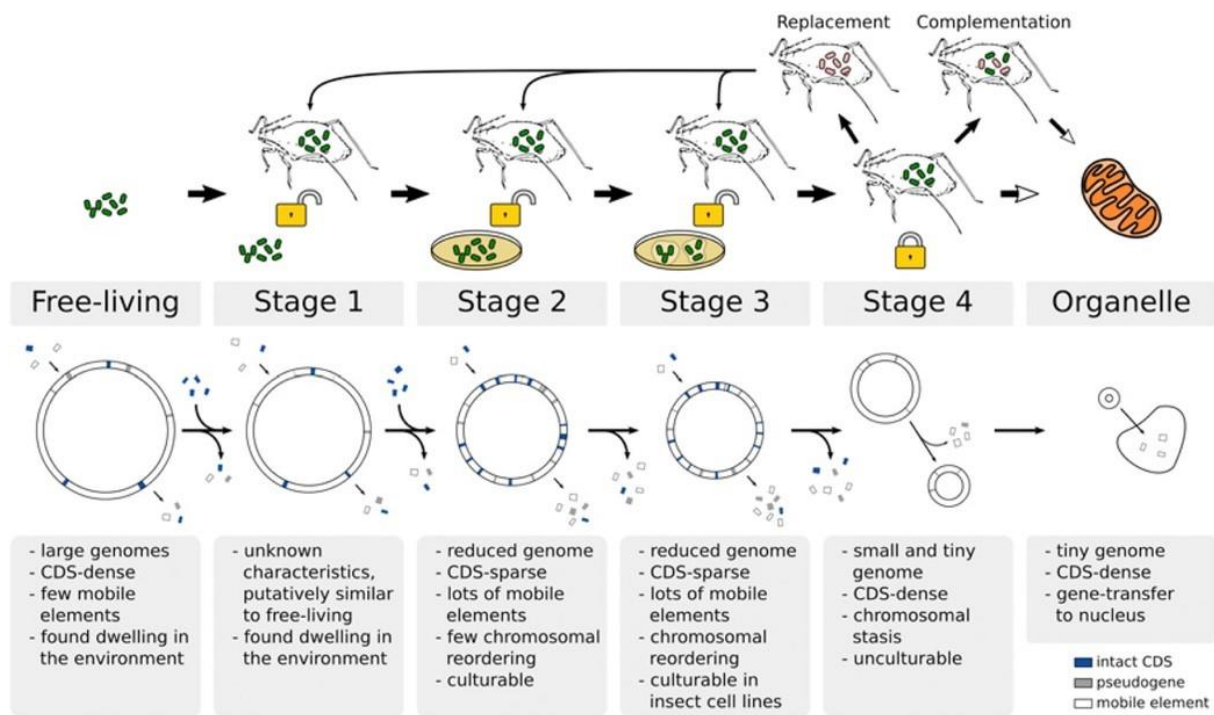


Figure 3. Étapes proposées dans le cadre d'un processus de réduction génomique et leurs caractéristiques biologiques associées. Bien que le remplacement puisse se produire à n'importe quel stade, il est représenté au stade 4 pour être en accord avec le texte et faciliter l'interprétation de la figure. Les verrous ouverts représentent des associations flexibles et les verrous fermés des associations profondément dépendantes. Les flèches non remplies pointant vers l'étape de l'organelle représentent l'absence d'une lignée endosymbiotique d'insectes identifiée donnant lieu à un organelle. D'après Latorre and Manzano-Marín (2017).

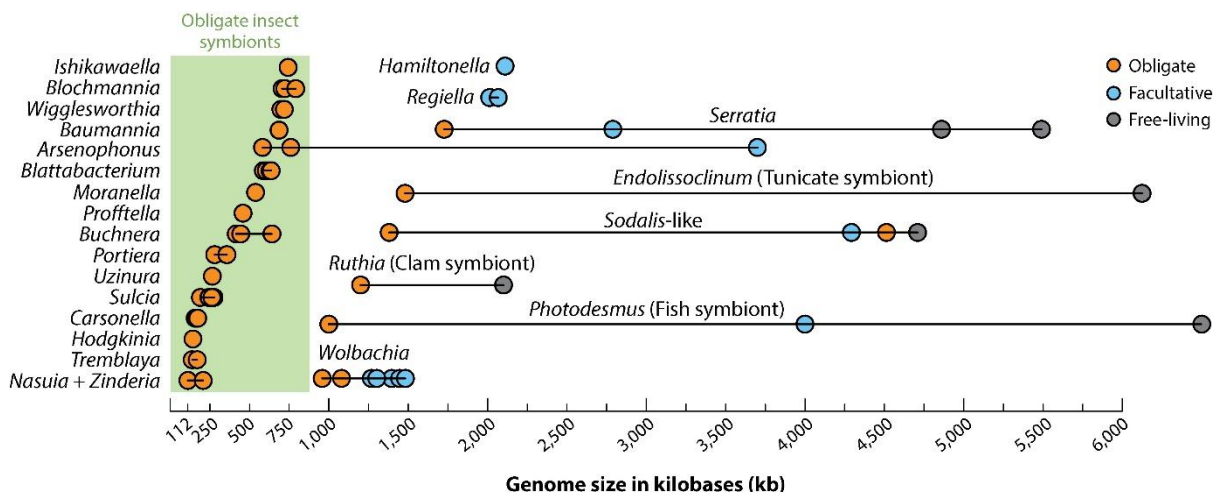


Figure 4. La taille des génomes varie selon les groupes de bactéries symbiotiques. Les symbiotes obligatoires sont représentés en orange, les symbiotes facultatifs en bleu et les bactéries libres en gris. Les symbiotes obligatoires présentent les génomes les plus petits ; ceux qui figurent dans la case verte sont des symbiotes obligatoires d'insectes et comprennent les génomes les plus petits connus dans les organismes cellulaires. D'après Moran and Bennett (2014).

seul la symbiose, la supplémentation de fonctions peut se solder par un remplacement du symbiote ancestral (Husnik and Mccutcheon, 2016; Monnin et al., 2020).

Néanmoins, plusieurs systèmes multi-symbiotes ont été mis en évidence et maintenus, possiblement par modulation des interactions inter-symbiotes (e.g. compartimentalisation dans différents bactériocytes ou niches cellulaires) (Renoz et al., 2022), un contrôle de l'hôte, ou encore d'une répartition fonctionnelle originelle (Douglas, 2016; Monnin et al., 2020). Cette dynamique de remplacement de symbiotes et de complémentation a été abondamment décrite récemment chez les insectes se nourrissant de sève appartenant à des groupes phylogénétiquement distants (Bennett and Moran, 2015).

L'objectif de cette thèse est d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes permettant le maintien des endosymbioses héritables chez un modèle arthropode : les tiques. Comme d'autres hématophages strictes, les tiques sont associées à des endosymbiotes obligatoires mutualistes qui ont à ce titre un effet fort sur leur valeur sélective et leurs processus éco-évolutifs. Pourtant, en comparaison avec d'autres modèles d'arthropodes à alimentation biaisée, peu d'études et d'expérimentations leur sont dédiées. Les tiques ne sont pas sous-étudiées pour autant mais ce modèle est généralement abordé avec une vision anthropo-centrée en raison de leurs retombées sanitaires, vétérinaires et économiques. Les tiques sont des parasites et des vecteurs : durant leur prise de sang, elles peuvent transmettre à leur hôte des agents pathogènes. Infectées par une importante diversité d'agents pathogènes bactériens, viraux, protozoaires et filaires, une attention particulière se porte sur plusieurs espèces vectrices majeures, de différentes familles de tiques, sur différents continents. Néanmoins, les différentes avancées technologiques de ces 30 dernières années et la diversité d'analyses associées ont été un tremplin pour l'appréciation de la diversité du microbiome de multiples organismes (Galloway-Peña and Hanson, 2020; Mousa et al., 2022; Tsilimigras and Fodor, 2016). Par incidence, les études chez les tiques se sont multipliées et se multiplient encore, permettant de démontrer que leur microbiome

ne se limite pas aux agents pathogènes à transmission horizontale infectieuse. La prochaine partie de cette introduction s'attachera à décrire ce modèle biologique et le contexte biologique, écologique et évolutif dans lequel s'intègre nos études.

2. Notre modèle biologique : les systèmes endosymbiotiques chez les tiques

2.1. Les tiques

2.1.1. Caractéristiques morphologiques et écologiques

Les tiques (super-ordre des Parasitiformes, ordre des Ixodida) sont des arthropodes hématophages stricts, c'est-à-dire que ce sont des parasites qui vont se nourrir exclusivement de sang de vertébrés. Les tiques sont distinguées en trois familles de taille spécifique inégale. Par ordre croissant, la famille des Nuttalliellidae comporte une espèce (*Nuttalia namaqua*), celle des Argasidae (aussi appelées tiques molles) compte environ 200 espèces et celle des Ixodidae (aussi appelées tiques dures) compte environ 700 espèces (Bowman and Nuttall, 2008; Klompen et al., 1996). Les tiques, en tant que Chélicérates, n'ont pas d'antennes ou de mandibules et elles se reposent alors sur leurs pédipalpes, leurs chélicères et leur hypostome pour la détection de leurs hôtes et la prise de leur repas sanguin. Les chélicères font principalement permettre la dilacération de la peau, lorsque l'hypostome lui permettra l'ancrage physique de la tique dans la peau ; le tout formant le rostre. Les organes de Haller jouent un rôle également important dans l'appréhension de leur environnement et la recherche d'hôtes par la détection de CO₂, de molécules (phénols et lactones) et de la vapeur d'eau (Bowman and Nuttall, 2008; Klompen and Oliver, 1993). Ceux-ci se situent sur la première paire de pattes et sont la raison de la célèbre représentation des tiques « pattes dans les airs, en chasse dans la végétation » (Figure 5). Elles comptent quatre paires de pattes articulées et leur corps est segmenté en deux parties : le capitulum (qui porte les pièces buccales) et l'idiosome (qui porte les pattes locomotrices et les différents pores génitaux et anus) (Figure 5). Ces caractéristiques morphologiques majeures sont

partagées par les tiques dures et molles (la famille des Nuttalliellidae, rare et limitée à une seule espèce, ne sera pas discutée ici) même si chaque famille présente des variations. L'utilisation des adjectifs « dures » et « molles » fait référence à la plus flagrante. Chez les tiques dures, le tégument du capitulum et idiosome est fortement chitinisé, contrairement aux tiques molles. Le capitulum des tiques dures est en position antérieure du corps alors qu'il est ventral chez les molles, souvent masqué par un bourrelet de l'idiosome. Les tiques molles sont dépourvues de scotum (plaque fortement chitinisée en position dorsale antérieure chez les tiques dures, dont la morphologie permet de distinguer les femelles et mâles adultes).

Les tiques ont un cycle de vie qui comporte 4 stades majeurs : œuf, larve, nymphe et adulte (avec dimorphisme sexuel). En tant que parasites, les tiques dépendent de la prise de repas sanguins sur leur hôte vertébré pour réaliser leur cycle de vie. Ceux-ci doivent être au moins au nombre de trois : un de larve à nymphe, un de nymphe à adulte, un de femelle à femelle gorgée (fécondée) qui produira des œufs. Un gorgement s'accompagne d'une période de digestion et de mue, qui est très souvent libre (au sol). Ce sont pendant ces phases libres que les tiques effectuent leur recherche d'hôte, via différentes stratégies selon les espèces. Les espèces endophiles vivront dans l'environnement proche de leurs hôtes, comme un nid, un terrier, des crevasses rocheuses proches d'un lieu de repos des hôtes. Celles-ci auront ainsi tendance à se dissimuler puis à être actives dans la rencontre d'hôtes. Les espèces exophiles rencontrent leurs hôtes dans des milieux ouverts. Certaines restent alors à l'affût dans la végétation jusqu'à une rencontre physique avec leurs hôtes, et d'autres exercent une « chasse » plus active en se déplaçant. Trois types de cycle de vie se distinguent chez les tiques selon le nombre d'hôtes sur lesquels elles prennent leurs repas sanguins : le cycle triphasique (trois hôtes différents), biphasique (deux hôtes) et monophasique (un hôte). Enfin, les tiques présentent différentes préférences trophiques. Elles sont retrouvées sur des mammifères, des reptiles, des oiseaux, des amphibiens mais nous distinguerons les espèces spécialistes (qui sont affiliées à une espèce ou type d'hôtes précis) des espèces généralistes (qui peuvent se gorger à partir de différentes espèces appartenant à une ou des familles de vertébrés). A chaque stade, le spectre d'hôtes peut varier au sein d'une même espèce

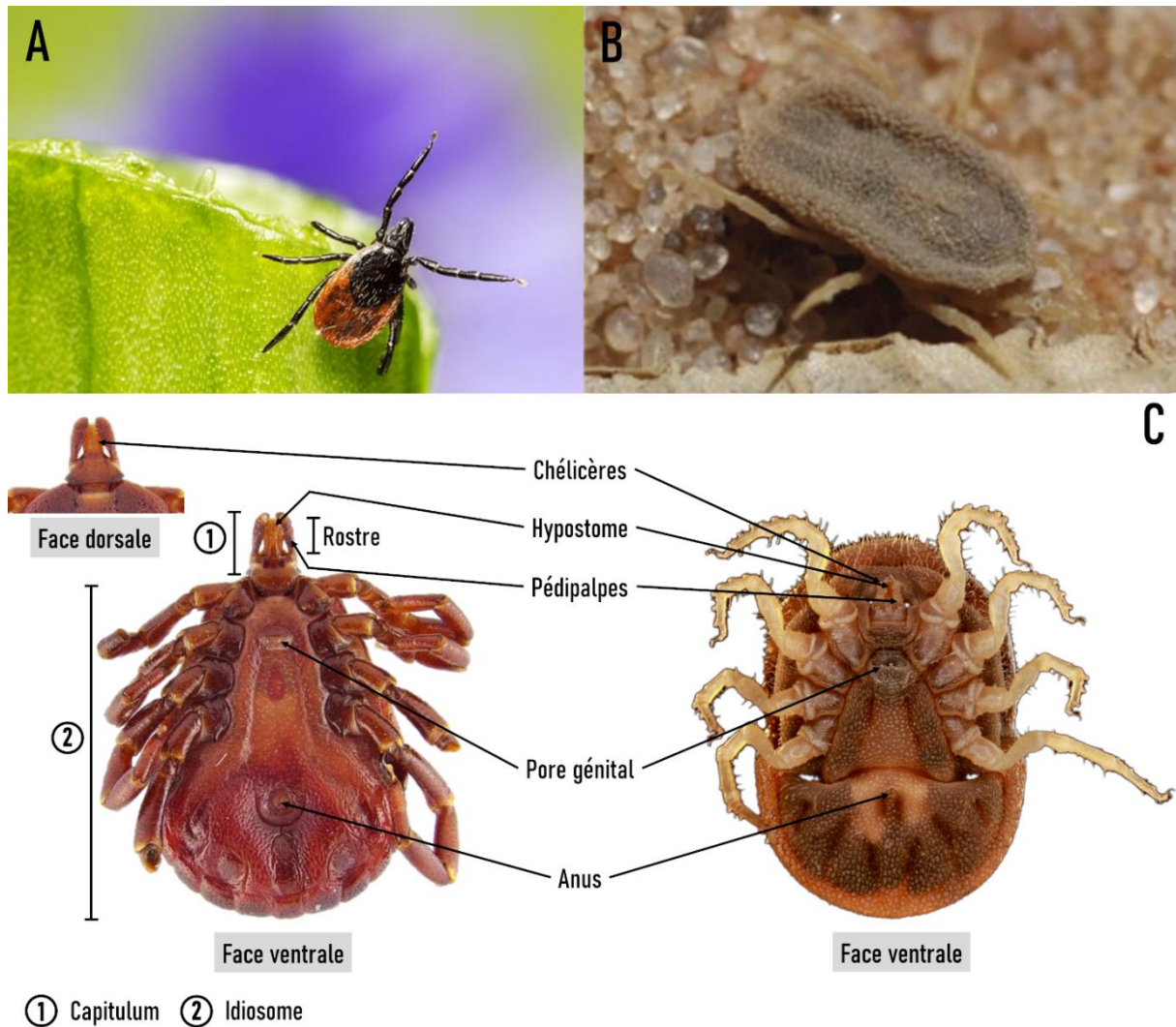


Figure 5. Photographies d'exemples de tiques dures (A : *Ixodes scapularis*) et de tiques molles (B : *Ornithodoros sonrai*) et morphologie simplifiée des tiques (C) sur l'exemple d'*Amblyomma geayi* (à gauche, tique dure) et d'*Ornithodoros porcinus* (à droite, tique molle). La photographie d'*O. sonrai* est tirée de Cutler et al. (2009), celle d'*A. geayi* de Binetruy et al. (2019) et celle d'*O. porcinus* est attribuée à InfraVec2.

(e.g. *Ixodes ricinus*, l'espèce vectrice principale de la Borréliose de Lyme en Europe, se gorge à l'état de larve et nymphe principalement sur des oiseaux et petits mammifères (voir grands mammifères pour les nymphes), alors que les adultes principalement sur des grands mammifères comme des cervidés).

Au-delà de se distinguer par leur morphologie, les tiques dures et molles ont des caractéristiques écologiques, comportementales différentes, ainsi que des cycles de vie distincts :

- (i) Les tiques dures sont généralement exophiles, peuvent avoir des cycles tri-, bi- et monophasiques selon les espèces et ont souvent des cycles de vie longs de plusieurs années (e.g. le cycle de vie d'*I. ricinus* a une durée de 2 à 6 ans) (malgré qu'elles ne possèdent qu'un stade nymphal). Ces espèces prennent des repas sanguins longs (plusieurs jours à semaines), durant lesquels elles augmentent considérablement en taille par une augmentation cuticulaire de l'idiosome. La ponte d'une femelle gorgée est généralement suivie de sa mort, cependant ces dernières se composent de plusieurs centaines d'œufs (voir milliers). Pour les tiques dures, les meilleures chances de capture sont lors d'un repas sanguin sur un hôte ou bien dans la végétation quand elles sont en quête de leur prochain hôte. Dans la végétation, les tiques peuvent être échantillonnées via la technique du passage de drapeau (i.e. l'utilisation d'un drapeau en coton blanc de 1m sur 1m, sur un transect de l'habitat puis la recherche visuelle sur ledit drapeau) ou encore la recherche visuelle directement.
- (ii) Les tiques molles sont endophiles. Leur temps de gorgement est rapide (quelques minutes, voir heures), moins volumineux mais plus nombreux. En effet, leur cycle de vie se compose de plusieurs stades nymphaux consécutifs et les femelles adultes peuvent réaliser plusieurs cycles de gorgement-ponte (mais avec des tailles de ponte inférieures à celles des tiques dures, des dizaines à quelques centaines d'œufs). Malgré ces stades supplémentaires, leur cycle de vie sont plus courts que les tiques dures (e.g. chez l'espèce *Argas persicus*, vectrice de plusieurs agents pathogènes de vertébrés, les femelles peuvent pondre à partir de 2 mois environ après l'éclosion). Plusieurs de ces caractéristiques

participent à ce que ces espèces soient plus difficilement « repérables ». Elles sont moins souvent retrouvées sur hôtes, si l'on établit une comparaison avec les tiques dures, et leur échantillonnage impliquera souvent d'aller à proximité / d'inspecter le lieu de repos de leur hôte.

Les tiques sont présentes dans tous les écotypes terrestres, de l'équateur aux cercles polaires, et ont donc su s'adapter à des conditions environnementales variables, parfois extrêmes. Néanmoins, les tiques dures et molles sont souvent sensibles aux taux d'humidité faibles et températures. Des variations de température influencent par exemple leur temps de développement (Gray et al., 2016). Les modifications de température dues au changement climatique influencent les aires de distribution des espèces de tiques (Alkishe et al., 2021, 2017).

2.1.2. Les tiques en tant que parasites, vecteurs, proies et hôtes

Chez les tiques, leur mode de vie parasitaire se retrouve dans plusieurs adaptations morphologiques et physiologiques. Lors d'un contact avec l'hôte, les tiques vont se déplacer vers des zones particulières du corps de l'hôte où la peau peut être plus fine et où le déparasitage par l'hôte peut être difficile (e.g. des espèces de tiques spécialistes des oiseaux se retrouvent à proximité du contour des yeux). Le rostre va permettre de pénétrer la peau, puis de pouvoir s'y ancrer, et ce de par des adaptations morphologiques (i.e. des pics sur l'hypostome orienté dans le sens inverse de l'entrée dans la peau) et par un phénomène biochimique. En effet, au moment de la piqûre, les glandes salivaires de la tique vont sécréter le ciment, un composé qui va favoriser son ancrage par la création d'une liaison tissus-rostre. A plusieurs égards, les glandes salivaires jouent un rôle majeur dans le gorgement. Elles vont sécréter de la salive au point de fixation qui va lyser les tissus, créant un puits hémorragique qui sera une zone privilégiée pour l'aspiration du sang, déversé par les microcapillaires. La salive favorise également la prise de sang via ses propriétés anticoagulantes, vasodilatatrices, anti-inflammatoires et immunosuppressives (Francischetti et al., 2009; Ribeiro et al., 1985; Šimo et al., 2017). Ces aspects sont particulièrement

importants pour les tiques dures qui se gorgent sur des temps longs. Par exemple, le développement d'une résistance immunitaire contre la salive chez l'hôte vertébré peut entraîner une diminution de la durée du gorgement, ce qui se traduit par un volume assimilé réduit impliquant une diminution de la valeur sélective des femelles (i.e. diminution de la production d'œufs et une augmentation de la mortalité, Bonnet et al. (2015)). Pour l'hôte vertébré, les piqûres de tiques ne sont pas sans conséquence. Même si le volume sanguin prélevé est relativement minime (2 à 8mL, Bonnet et al. (2015)), les tendances d'agrégation de certaines espèces de tiques au moment du gorgement (Harrison and Bennett, 2012; Nuttall, 2019) pourraient conduire à une infestation importante chez un hôte. Les lésions cutanées entraînées par les piqûres de tiques sont une porte d'entrée pour d'autres microorganismes ; une anémie induite par une sur-infestation augmenterait les risques d'infections opportunistes. De plus, la sécrétion de toxines ou protéines dans la salive de tiques ont été reliées à des cas d'envenimation (causant notamment des paralysies chez des animaux, cas rares chez l'humain) et d'allergies (van Nunen, 2018; Weckesser et al., 2010). Enfin, une récente étude a démontré que l'activité de gorgement de la tique *Haemaphysalis longicornis* pouvait être modulée par l'interaction avec l'endosymbiote nutritionnel *Coxiella* de par son implication dans la voie de biosynthèse du chorismate et la production *in fine* de sérotonine (Zhong et al., 2021).

Les tiques font partie des vecteurs majeurs d'agents infectieux pour les vertébrés, animaux et humains (de la Fuente et al., 2008; Piesman and Eisen, 2008). Il est à noter qu'aucune espèce de tiques n'est spécialiste de l'humain, les cas d'infection humains se déroulant donc dans un contexte de partage d'environnement avec des animaux et leurs tiques associées. En se basant sur la distribution de 5 agents pathogènes majeurs et de leurs espèces de tiques vectrices, de la Fuente et al. (2017) illustre que la quasi-totalité des régions mondiales sont concernées par la transmission potentielle d'au moins un agent pathogène, mais surtout que certains pays pouvaient l'être par plusieurs simultanément (jusqu'à quatre). Les coûts liés aux maladies sont sanitaires, vétérinaires et économiques et prennent diverses formes : multiples maladies (mortalité variée selon les maladies, curables à mortelle) pouvant être chroniques voir

invalidantes, impacts dans les élevages, répercussion pour des industries basées sur le cuir (liste non-exhaustive). En 2019, aux Etats-Unis d'Amérique, 50 865 cas de maladies induites par des agents pathogènes transmis par des tiques ont été recensés par Centers for Disease Control and Prevention (CDC), dont 69% sont attribués à la Borréliose de Lyme (CDC, 2021). Toutes les tiques ne sont pas compétentes pour la transmission d'agents pathogènes, surtout étant donné la diversité décrite chez les tiques. Les tiques sont associées à la transmission de virus, bactéries, protozoaires et filaires ; une liste importante d'agents pathogènes, des maladies induites et les espèces vectrices associées sont décrites dans le Tableau 1 de l'article de de la Fuente et al. (2008). Une précision sur les filaires qui sont peu décrites dans ledit tableau : des filaires ont été détectées dans quelques espèces de tiques dures et molles (*Amblyomma americanum* (Zhang et al., 2011), *Rhipicephalus sanguineus*, *Ixodes dammini* (Beaver and Burgdorfer, 1984) et *Ornithodoros tartakowskyi* (Londoño, 1976a)) et des facteurs de compétence ont été établis chez *R. sanguineus* (Brianti et al., 2012) et *O. tartakowskyi* (Londoño, 1976b, 1976c, 1976a) (e.g. changement de stade parasitaire dans l'hôte tique, migrations dans les tissus et transmission). Plusieurs critères sont d'ailleurs d'importance pour caractériser la compétence vectorielle des tiques, comme la transmission trans-stadiale notamment parce que les tiques dures ne se gorgent qu'une fois par stade. Si la transmission est exclusivement horizontale, la tique ne pourra s'infecter qu'à partir du stade larvaire et donc n'infecter un autre hôte qu'aux stades suivants. Les capacités de s'infecter à partir d'un repas sanguin, la réplication et la transmission sont également des facteurs déterminants. En plus de cette compétence, il est important de considérer la capacité vectorielle d'une tique infectée. Cette fois-ci le filtre de rencontre hôte-tique, la densité de tiques, la susceptibilité de l'hôte sont par exemple à considérer. En tant qu'arthropodes vecteurs, le moment du gorgement est déterminant lors de la transmission d'agents infectieux. A ce titre les tiques ont des attitudes de gorgement qui favorisent l'échange des agents pathogènes avec l'hôte vertébré, soit des repas longs dans la durée pour les tiques dures, soit des repas répétés pour les tiques molles. De plus, la tendance d'agrégation des tiques décrite plus haut crée un contexte où des tiques non-infectées et infectées se gorgeraient à proximité l'une de l'autre (i.e. co-feeding). Celles-

ci pourraient alors se « passer » les agents infectieux en l'absence d'infection établie chez l'hôte, participant à la transmission horizontale de l'agent entre individus d'une même espèce ou d'espèces différentes (Randolph, 2011; Randolph et al., 1996). D'autre part, plusieurs agents pathogènes infectent les glandes salivaires des tiques et peuvent ainsi être transmis leur de la sécrétion de la salive. Cependant, pour les microorganismes pathogènes présents dans le tube digestif, l'ingurgitation de sang modifierait des modifications biochimiques et/ou leur migration dans les glandes salivaires, permettant leur transmission. La salive contiendrait également des protéines qui participent à l'efficacité de la transmission (Šimo et al., 2017; Tirloni et al., 2021), soulignant que la compétence vectorielle des tiques reposerait sur une coadaptation vecteur-agent pathogène.

Comme pour beaucoup d'autres organismes, les populations de tiques sont régulées par un phénomène de prédation. Les tiques sont prédatées par différents arthropodes (araignées, fourmis, insectes divers) (Samish and Alekseev, 2001), mais peuvent également être consommées par des mammifères, oiseaux, reptiles et amphibiens (Kok and Petney, 1993; Petney and Kok, 1993; Samish and Rehacek, 1999). De plus, il a été démontré que plusieurs genres de tiques (notamment *Ornithodoros*, *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* et *Rhipicephalus*) peuvent également être infectés par des guêpes parasitoïdes du genre *Ixodiphagus* (Davis, 1986; Gaye et al., 2020). Les tiques sont également sensibles à plusieurs microorganismes, impactant négativement leur valeur sélective, comme des champignons entomopathogènes, des protozoaires et des bactéries (Samish and Rehacek, 1999). Tous ces organismes représentent des ennemis naturels des tiques. Mais avec une vision anthrope-centrée dans le cadre d'une lutte antivectorielle, ceux-ci sont évoqués comme des candidats potentiels pour des actions de biocontrôle bactérien (Samish and Rehacek, 1999), même si aucune action n'est pour l'instant en place via cette voie.

2.2. Le microbiome des tiques : diversité, rôle et structuration

2.2.1. Diversité du microbiome

Depuis un près d'une décennie, différentes études de la diversité microbiennes des tiques via des techniques de métabarcodes, pour la grande majorité focalisée sur les communautés bactériennes (régions du 16S rRNA), ont souligné que les tiques n'étaient pas uniquement infectées par des agents pathogènes de vertébrés. Comme d'autres arthropodes et métazoaires, les tiques hébergent des communautés microbiennes variées, aussi bien à une échelle taxonomique qu'écologique. Tout d'abord, les tiques sont infectées par une grande diversité de bactéries intracellulaires, où près de 10 genres bactériens endosymbiotiques phylogénétiquement distants sont recensés (Ahantarig et al., 2013; Duron et al., 2017b; Zhang and Liu, 2019) : *Coxiella*, *Rickettsiella*, *Arsenophonus*, *Francisella*, *Rickettsia*, *Midichloria*, *Lariskella*, *Wolbachia*, *Spiroplasma* et *Cardinium* (Figure 6). Plusieurs de ces bactéries (*Coxiella*, *Francisella*, *Midichloria*, *Rickettsia* ; voir détails dans 2.2.2) sont fortement prévalentes dans les populations des espèces infectées, et au moins un de ces genres bactériens est détecté chez la majorité des espèces de tiques. Cette forte prévalence serait liée à la nature mutualiste obligatoire de leur association avec les tiques. En effet, comme d'autres arthropodes se nourrissant sur une ressource alimentaire biaisée nutritionnellement, les tiques sont supplémentées en plusieurs nutriments essentiels par des bactéries symbiotiques. Le microbiome des tiques comprend également une diversité d'espèces bactériennes dont la présence et la prévalence au sein des espèces hôtes sont variables spatialement et temporellement. Dans cette catégorie sont inclus les agents pathogènes de vertébrés mais aussi plusieurs des genres de bactéries intracellulaires précédemment citées qui pourraient représenter des bactéries facultatives des tiques. Cependant pour beaucoup de ces espèces intracellulaires facultatives, leur rôle n'est pas encore bien défini chez les tiques (voir 2.2.3). Leur microbiome inclut également une diversité d'espèces microbiennes extracellulaires, dont des bactéries commensalistes (Andreotti et al., 2011; Carpi et al., 2011; Nakao et al., 2013; Qiu et al., 2014; Williams-Newkirk et al., 2014). De plus en plus d'études se sont focalisées à établir la diversité des membres viraux, protozoaires et eucaryotes du microbiome des tiques, même si

évidemment la présence de plusieurs est déjà établie de par l'existence de représentants pathogènes à transmission vectorielle par les tiques (e.g. virus, protozoaires intracellulaires, extracellulaires et nématodes). La diversité de ces partenaires se traduit donc par une diversité d'interactions avec leurs hôtes arthropodes, qui se placeraient sur un continuum mutualisme-parasitisme.

La composition du microbiome des tiques est déterminée via plusieurs modes d'acquisition. Une part de celui-ci est acquise par transmission horizontale via un hôte vertébré infectieux. Plusieurs microorganismes seraient également acquis par les tiques via une transmission environnementale. Les connaissances sur leur diversité et mécanismes d'interaction avec les tiques sont peu étudiés mais ceux-ci pourraient provenir du microbiome cuticulaire de leurs hôtes vertébrés, du sol ou encore de la végétation (Bonnet et al., 2017; Narasimhan and Fikrig, 2015). Enfin, leur microbiome se compose de bactéries à transmission verticale transovarienne. La transmission des agents pathogènes de vertébrés aux tiques est fortement liée à une acquisition horizontale. Néanmoins les tiques peuvent également être infectées par transmission verticale ; plusieurs cas de transmission mixte ont été mis en évidence pour des bactéries et des virus par exemple (Harris et al., 2017; Raney et al., 2022; Sambado et al., 2020). D'autre part, si les endosymbiotes mutualistes (obligatoires et facultatifs) sont acquis via une transmission transovarienne, différents cas soulignent le maintien d'une capacité de transmission horizontale chez plusieurs d'entre eux (i.e. cas d'infections opportunistes chez des vertébrés (Angelakis et al., 2016; Edouard et al., 2013; Shivaprasad et al., 2008; Vapniarsky et al., 2012; Woc-colburn et al., 2008), transferts d'hôtes phylogénétiquement distants (Binetruy et al., 2019a)).

2.2.2. Structuration du microbiome

La composition du microbiome des tiques semble variable selon plusieurs facteurs structurants et les échelles de considération. Tout d'abord, à une échelle intra-spécifique, la prévalence des plusieurs taxons semble influencée par des facteurs physiologiques (Pollet et al.,

2020; Wu-Chuang et al., 2021), comme le stade de développement de la tique (Zolnik et al., 2016) ou le sexe des adultes (Obregón et al., 2019). L'impact du type d'hôtes et de l'état de gorgement reste encore débattu (Hawlena et al., 2013; Rynkiewicz et al., 2015; Swei and Kwan, 2017; Wu-Chuang et al., 2021). Cependant, la grande majorité des études de microbiome des tiques ont été réalisées sur des tiques entières. Si celles-ci apportent une grande quantité d'informations et de possibilités de comparaison interindividuelle, la considération de l'échelle intra-individuelle est négligée. Les études réalisées à cette échelle nous apportent pourtant la certitude d'une structuration différente du microbiome entre organes. La récente publication de Zhang et al. (2022) démontre notamment que si la bactérie endosymbiotique de cette espèce est détectée dans tous les organes, son abondance relative est plus forte dans les ovaires et les tubes de Malpighi, et plus faible voire nulle dans les glandes salivaires et l'intestin où divers genres bactériens sont abondants. D'autres études soulignent encore des contrastes entre ces organes (Guizzo et al., 2020; Kumar et al., 2022; Wang et al., 2018), illustrant sûrement les dynamiques de transmission différentes entre endosymbiotes mutualistes et agents pathogènes (souvent absents des ovaires, mais présents dans les glandes salivaires et intestin). Plusieurs facteurs abiotiques temporels et spatiaux sont également à considérer. La saisonnalité des tiques et leur cycle de développement peut, par exemple, influencer leur contact avec leurs hôtes (surtout chez les tiques bi- et triphasiques), hôtes qui eux-mêmes peuvent être infectés ou non par des agents pathogènes. La présence d'un agent pathogène à transmission horizontale chez les tiques serait alors ainsi un indice de la coexistence de populations de tiques et d'hôtes compétentes (et infectées) (dans le cas où la compétence/capacité de l'espèce de tique a été établi au préalable) (Pollet et al., 2020).

A une échelle interspécifique, les communautés symbiotiques varient en fonction des espèces de tiques (Lalzar et al., 2012; Pollet et al., 2020; Portillo et al., 2019; Wang et al., 2018; Wu-Chuang et al., 2021; Zhang et al., 2019). La relation entre la phylogénie des tiques et leur microbiome est encore peu étudiée mais quelques études nous apportent des éléments de débats. Tout d'abord, l'étude de Binetruy et al. (2020b) montre que des espèces phylogénétiquement proches du genre de tiques dures *Amblyomma* peuvent présenter des taxons communs mais que

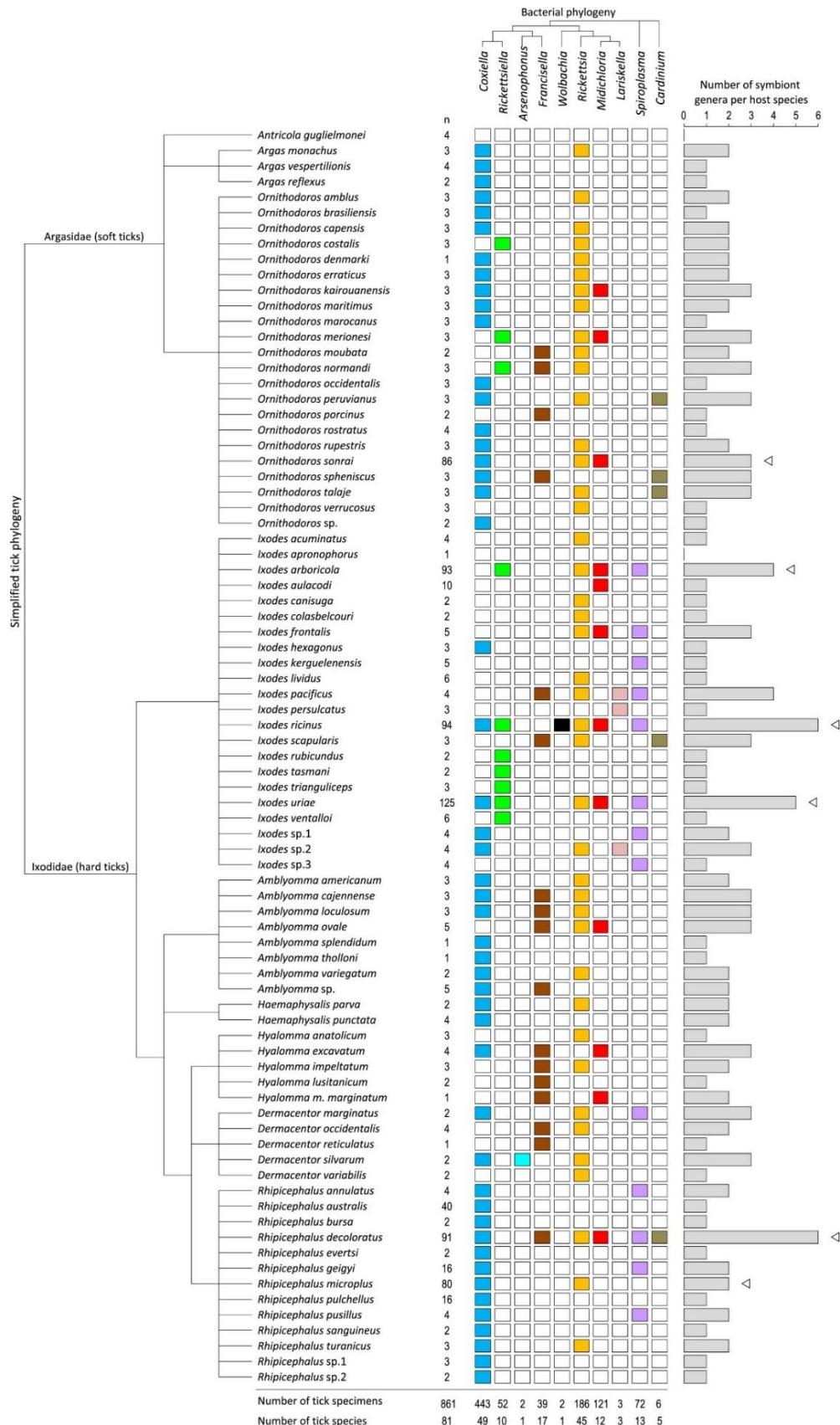


Figure 6. Distribution des symbiotes bactériens héréditaires chez les tiques. La partie gauche de la figure montre une phylogénie simplifiée des genres de tiques pour les 81 espèces de tiques étudiées (avec n, le nombre d'individus examinés dans chaque espèce de tiques). La partie supérieure de la figure montre une phylogénie bactérienne simplifiée des dix symbiotes bactériens examinés dans cette étude. Les cases représentant la présence d'infections sont colorées différemment selon les symbiotes. La partie droite de la figure montre le nombre de genres de symbiotes observés chez chaque espèce de tique. Les triangles indiquent les espèces de tiques pour lesquelles cinq populations ont été examinées. D'après Duron et al. (2017).

d'autres non, et ainsi que si une incidence de la phylogénie pourrait être détectée à une échelle fine, celle-ci n'est pas généralisable à l'ensemble d'un genre. Une autre étude par Díaz-Sánchez et al. (2019) rapporte qu'au sein du genre de tiques dures *Ixodes* la composition des communautés bactériennes serait au moins en partie influencée par la phylogénie des tiques, soulignant que certains des mécanismes de filtration et d'acquisition des microorganismes sont dépendants de l'évolution des génomes.

Parmi les membres du microbiome des tiques, nous nous intéresserons particulièrement à décrire les bactéries intracellulaires hérissables identifiées chez les tiques, leur distribution et leurs interactions avec leurs hôtes tiques.

2.2.3. Les endosymbiotes hérissables obligatoires

Dans le cadre de leur symbiose nutritionnelle, la plupart des tiques abritent généralement une seule lignée de symbiote nutritionnel, mais différentes lignées et espèces de symbiotes existent chez les différentes espèces de tiques comme nous allons le voir ici (Figure 6).

Les endosymbiotes du genre *Coxiella*, appelés par la suite *Coxiella*-LE (ou encore CLE, pour « *Coxiella*-like endosymbionts », qui sont les termes utilisés dans la littérature), sont les bactéries les plus communes chez les tiques ; environ 2/3 des espèces de tiques (dures et molles confondues) sont infectées. Malgré leur importante distribution chez les tiques et leurs prévalences fortes, leur rôle au sein des tiques a pendant longtemps été sous-estimé, voir mal-interprété. En effet, les *Coxiella*-LE appartiennent au genre *Coxiella* (classe des Gammaproteobactéries, ordre des Legionellales, famille des Coxiellaceae), qui compte des espèces mutualistes mais aussi au moins une espèce d'agent pathogène de vertébrés, l'agent de la fièvre Q *Coxiella burnetii*. Une première description incorrecte des *Coxiella*-LE en tant qu'agents pathogènes, puis des mal-identifications liées aux méthodes de détection et d'assignation ont entraîné une confusion entre l'occurrence des *Coxiella*-LE et *C. burnetii* (Duron, 2015; Körner et al., 2021). Si ces bactéries sont phylogénétiques proches, mais distinctes, leurs phénotypes sont désormais différenciés. *Coxiella burnetii* est détectée chez différents animaux sauvages et

domestiques (bétail ovin et bovin), qui constituent ses différents réservoirs biologiques. Les cas sont souvent asymptomatiques, sauf chez les ruminants où l'infection peut causer différents symptômes pulmonaires et cardiaques, voire des troubles de la reproduction allant jusqu'à des fausses couches. Des cas humains sont recensés chaque année. Sa transmission est généralement l'inhalation de spores provenant d'excrétions animales contaminées, les cas de transmission d'humain à humain étant rares. Le rôle épidémiologique des tiques est fortement suspecté, les tiques pouvant s'infecter et maintenir l'infection trans-stadialement, mais leur capacité vectorielle est à réévaluer en raison de la mise en évidence des mal-identifications évoquées ci-dessus. Dans le cadre d'un projet annexe de ma thèse, nous nous sommes d'ailleurs intéressés à cet aspect chez la tique molle *Ornithodoros moubata*. Dans ce but, nous avons examiné expérimentalement la capacité d'*O. moubata* à acquérir *C. burnetii* à partir d'un repas de sang infecté, la transmission trans-stadiale de l'infection des nymphes aux adultes et la capacité à transmettre ensuite une forme infectieuse de *C. burnetii* par les fèces et les morsures. Nous avons également examiné les taux de mue et de mortalité des tiques pour évaluer si l'infection par *C. burnetii* est délétère pour leurs vecteurs. Nous avons en outre caractérisé l'abondance de *C. burnetii* dans les tissus des tiques, et cherché à savoir si l'infection pouvait être transmise de manière transovarienne à travers les générations de tiques. Les résultats de cette étude ont donné lieu à une publication acceptée en janvier 2021 (« Vector competence of the African argasid tick *Ornithodoros moubata* for the Q fever agent *Coxiella burnetii* ») et disponible en annexe de cette thèse.

Les interactions entre *Coxiella*-LE et les tiques sont elles aussi maintenant mieux définies et notamment le rôle des *Coxiella*-LE en tant qu'endosymbiotes nutritionnels obligatoires. Plusieurs études ont démontré que leur élimination via des traitements antibiotiques impactait négativement le développement, la survie et la reproduction des individus (Ben-Yosef et al., 2020; Gottlieb et al., 2015; Guizzo et al., 2017; L.-H. Li et al., 2018; Smith et al., 2015; Zhong et al., 2007). Alors que chez d'autres hématophages stricts, les voies métaboliques impliquées dans la symbiose nutritionnelle étaient déjà identifiées et reposaient notamment sur la biosynthèse de vitamines B et de cofacteurs (Duron and Gottlieb, 2020), ces mêmes voies ont été recherchées dans les

génomomes de différents génomes de *Coxiella*-LE. Leurs génomes ont bien conservé les voies complètes de biosynthèse de trois vitamines B en particulier : la biotine (B₇), la riboflavine (B₂) et l'acide folique (B₉) (Gottlieb et al., 2015; Guizzo et al., 2017; Nardi et al., 2021; Smith et al., 2015). Les *Coxiella*-LE sont particulièrement abondantes dans les ovaires et les tubes de Malpighi (organes impliqués dans l'osmorégulation des tiques et la gestion des déchets organiques) (Buysse et al., 2019; Guizzo et al., 2017; Klyachko et al., 2007; Lalzar et al., 2014; Wang et al., 2018; Zhang et al., 2022). Leur présence serait ainsi cohérente avec leur transmission maternelle trans-ovarienne (Cibichakravarthy et al., 2022; Lalzar et al., 2014; Machado-Ferreira et al., 2011) et nous permet aussi de suspecter que les tubes de Malpighi pourraient jouer le rôle de bactériome et ainsi être un organe privilégié dans la synthèse de vitamines B ou autres composés supplémentés par les *Coxiella*-LE. L'une des principales fonctions des tubules de Malpighi est d'agir comme des organes excréteurs ; les déchets azotés s'y accumulent avant d'être éliminés à la suite d'un repas sanguin. Ces organes seraient ainsi une source pour les symbiotes qui y tireraient des composés nécessaires à la production des vitamines B notamment ou à recycler pour la tique (e.g. l'hème) (Gottlieb et al., 2015; Hamdy, 1977; Olivieri et al., 2019; Sonenshine and Roe, 2014). Chez la plupart des espèces infectées, ces bactéries sont hautement prévalentes, voir fixées (Duron et al., 2017a; Machado-Ferreira et al., 2016). Cependant, chez certaines espèces leur prévalence est bien plus basse : une hypothèse expliquant ces valeurs faibles pourrait être que ces bactéries ne sont pas obligatoires mais facultatives chez ces espèces, comme par exemple chez *I. ricinus* où un autre endosymbiote, *Midichloria* (décrite plus bas), pourrait jouer le rôle de symbiote nutritionnel (d'après Duron et al. (2017)). Néanmoins, la présence de *Coxiella*-LE endosymbiotiques obligatoires est à fortement considérer chez plusieurs genres de tiques dures et molles : *Amblyomma*, *Rhipicephalus*, *Hyalomma*, *Amblyomma*, *Ixodes*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ornithodoros* et *Argas* (Duron et al., 2017b).

Un second endosymbiote nutritionnel est reconnu chez les tiques, des bactéries du genre *Francisella* (classe des Gammaproteobactéries, ordre des Thiotrichales, famille des Francisellaceae), aussi appelées *Francisella*-LE (pour « *Francisella*-like endosymbionts »). Ces

bactéries sont communément identifiées chez des espèces ne possédant pas de *Coxiella*-LE, dessinant comme un patron d'exclusion entre ces deux endosymbiotes chez les espèces de tiques (Duron et al., 2017b). Les *Francisella*-LE partagent plusieurs des caractéristiques majeures des *Coxiella*-LE en tant que symbiotes nutritionnels : un rôle établi pour la réalisation du cycle de vie des tiques (Duron et al., 2018; Zhong et al., 2007), des génomes encodant des voies de biosynthèse des vitamines B (Duron et al., 2018; Gerhart et al., 2018, 2016), une tropisme tissulaire similaire (Azagi et al., 2017; Duron et al., 2018; Kumar et al., 2022) et des prévalences fortes dans les espèces infectées (Azagi et al., 2017; Binetruy et al., 2020b; Duron et al., 2017a). C'est notamment chez le modèle *Francisella*-LE – tique molle *O. moubata* qu'a pu être établi empiriquement le rôle essentiel de la supplémentation en vitamines B pour le développement et la reproduction des tiques (Duron et al., 2018). Là encore il est à constater que les *Francisella*-LE appartiennent à un genre regroupant différentes espèces d'agents pathogènes (Michelet et al., 2013), comme *F. tularensis*, l'agent étiologique de la tularémie (137 cas en France déclarés en 2021 (Figoni et al., 2022)).

Enfin, d'autres bactéries sont fortement suspectées d'interagir chez les tiques en tant qu'endosymbiotes nutritionnels obligatoires : des bactéries appartenant à l'ordre des Rickettsiales (classe des Alphaproteobactéries), et plus particulièrement aux familles des Midichloriaceae et des Rickettsiaceae. Plusieurs de ces bactéries chez des espèces spécifiques de tiques, *Midichloria mitochondrii* chez *I. ricinus*, *Rickettsia buchneri* chez *I. scapularis* et *I. pacificus*, sont particulièrement concentrées dans les ovaires et dans les tubes de Malpighi, notamment au moment de l'oogénèse (Epis et al., 2013, 2008; Oliver et al., 2021; Olivieri et al., 2019) et leurs prévalences et taux de transmission sont comparables à ceux des *Coxiella*-LE et *Francisella*-LE (Cafiso et al., 2016; Oliver et al., 2021; Olivieri et al., 2019; Sassera et al., 2006). Les génomes disponibles mettent en lumière la présence des voies de biosynthèse de la biotine et de l'acide folique (Hunter et al., 2015; Olivieri et al., 2019), ce qui aide à explorer leurs potentiels effets phénotypiques. Les preuves empiriques sont encore à étoffer pour ces systèmes endosymbiotiques (Kurlovs et al., 2014; Ninio et al., 2015; Oliver et al., 2021) mais un article

récent de Militzer et al. (2021) démontre que l'ajout de vitamines B dans du sang lors d'un protocole de gorgement artificiel d'*I. ricinus* a un effet bénéfique sur la valeurs sélective des tiques (d'autant plus que le sang utilisé avait été traité à la gentamicine et a surement impacté la composition du microbiome des individus), soulignant encore que la supplémentation en vitamines B est nécessaire à la survie des tiques.

L'importance des voies de biosynthèse des vitamines B dans les différents systèmes endosymbiotiques nutritionnels, impliquant des bactéries phylogénétiquement distantes, souligne l'existence d'une convergence évolutive envers ce type de mutualisme, non seulement chez les tiques mais avec d'autres arthropodes hématophages stricts (Duron and Gottlieb, 2020). D'autre part, il est intéressant d'observer la conservation de ces voies dans les génomes de ces bactéries (en tout cas ceux disponibles, Tableau 1). Car en effet, si les génomes de *Francisella*-LE présentent une taille similaire entre 1,54 et 1,56 Mbp, ceux des *Coxiella*-LE sont plus hétérogènes en taille allant de 0,6 Mbp à 1,73 Mb, les plus petits génomes étant tous identifiés chez des symbiotes du genre *Amblyomma*. Comme vu précédemment, les symbiotes héréditaires peuvent connaître des pertes de gènes, ce qui peut se traduire *in fine* par une taille génomique réduite dans le cadre de la coévolution symbiote-hôte. Cependant, par mutation et dérive génétique, des pertes affectant des fonctions essentielles pour la symbiose peuvent se produire et cette évolution des génomes par érosion génomique pourrait venir déstabiliser l'association symbiotique. Dans ce contexte, les génomes de *Coxiella*-LE semblent expérimenter à des niveaux différents une réduction génomique, mais pas d'érosion génomique. D'un autre côté, si on suit ce raisonnement, les associations entre les *Francisella*-LE et les tiques pourraient être plus récentes pour ne pas identifier (dans la limite des génomes disponibles) des phénomènes de réduction génomique marqués. La considération des schémas de co-diversification entre les tiques et les *Coxiella*-LE, d'un côté, et les *Francisella*-LE, d'un autre, pourrait soutenir ces hypothèses. Plusieurs études démontrent l'existence de patrons de co-cladogénèse entre les *Coxiella*-LE et leurs hôtes (e.g. chez des espèces d'*Amblyomma* (Binetruy et al., 2020b), chez des espèces de *Rhipicephalus* (Coimbra-Dores et al., 2020) et entre genres de tiques (Tian et al., 2021)), soulignant une acquisition

Espèce hôte	Symbiote nutritionnel	Souche	GenBank/dryad Accession number	Reference
1 Hard tick, <i>Ixodes ricinus</i>	<i>Cand. Midichloria mitochondrii</i>	IricVA	CP002130	Sassera et al. (2011)
1 Hard tick, <i>Ixodes scapularis</i>	<i>Rickettsia buchneri</i>	ISO7	JFKF00000000	Kurtti et al. (2015)
Hard tick, <i>Ixodes scapularis</i>	<i>Rickettsia buchneri</i>	REIS	ACL000000000	Gillespie et al. (2012)
1 Soft tick, <i>Ornithodoros amblus</i>	<i>Coxiella</i> -LE	CLEOA	VFIV00000000	Brenner et al. (2020)
1 Hard tick, <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	<i>Coxiella</i> -LE	CRS-CAT	CP024961	Tsementzi et al. (2018)
1 Hard tick, <i>Rhipicephalus turanicus</i>	<i>Coxiella</i> -LE	CRT	CP011126	Gottlieb et al. (2015)
1 Hard tick, <i>Rhipicephalus microplus</i>	<i>Coxiella</i> -LE	CERM	NSHJ01000000	Guizzo et al. (2017)
Hard tick, <i>Rhipicephalus microplus</i>	<i>Coxiella</i> -LE	CLE-RmD	DLUJ00000000	Ramaiah and Dasch (2018)
1 Hard tick, <i>Amblyomma nuttali</i>	<i>Coxiella</i> -LE	Craf2019	CP064834	Nardi et al. (2021)
1 Hard tick, <i>Amblyomma americanum</i>	<i>Coxiella</i> -LE	CLEAA	CP007541	Smith et al. (2015)
Hard tick, <i>Amblyomma americanum</i>	<i>Coxiella</i> -LE	CLE-AaGA	CP021379	Direct submission on GenBank (Ramaiah et al.)
1 Hard tick, <i>Amblyomma sculptum</i>	<i>Coxiella</i> -LE	CeAS-UFV	CP033868	Direct submission on GenBank (Vidigal et al.)
1 Hard tick, <i>Amblyomma maculatum</i>	<i>Francisella</i> -LE	FLEAm	LNCT00000000	Gerhart et al. (2018)
1 Soft tick, <i>Ornithodoros moubata</i>	<i>Francisella</i> -LE	FLEOm	LVCE00000000	Gerhart et al. (2018)
Soft tick, <i>Ornithodoros moubata</i>	<i>Francisella</i> -LE	F0m	QAPC00000000	Duron et al. (2018)
1 Soft tick, <i>Argas arboreus</i>	<i>Francisella</i> -LE	<i>F. persica</i> ATCC VR-331	CP013022	Sjödin et al. (2012)

12

Tableau 1. Liste des génomes d'endosymbiotes nutritionnels de tiques disponibles sur GenBank

ancienne suivie d'une co-diversification reposant sur une association stable avec des *Coxiella*-LE par transmission verticale. Pour les *Francisella*-LE, leur répartition chez des espèces phylogénétiquement distantes et avec des signaux moindres de co-diversification sous-entend l'occurrence fréquente de changements d'hôtes (Azagi et al., 2017; Binetruy et al., 2020b). Même si la répartition à l'échelle d'un genre de tiques pour les *Coxiella*-LE semble aussi découler d'acquisition à partir d'hôtes phylogénétiquement distants (i.e. pas de co-cladogénèse à l'échelle inter-générique), ces transferts semblent plus fréquents dans le cas des *Francisella*-LE. Ceux-ci auraient ainsi une origine évolutive plus récente chez les tiques, ce qui expliquerait la conservation de facteurs génomiques permettant ces sauts d'espèces ; les *Coxiella*-LE plus coadaptées avec leurs hôtes ayant perdu progressivement ces capacités. De façon intéressante certains de ces sauts d'hôtes se seraient accompagnés de remplacement d'hôtes, en faveur de *Francisella*-LE, comme discuté par Binetruy et al. (2020) chez le genre *Amblyomma*. C'est notamment chez ce genre que sont détectés les génomes les plus réduits de *Coxiella*-LE.

Dans le cadre d'un projet annexe à ma thèse, en nous basant sur l'étude des relations phylogénétiques entre les *Francisella*-like de différents genres de tiques, nous avons mis en évidence que ces sauts d'hôte, *in fine* remplacements d'hôtes, pouvaient être favorisés selon la possibilité de contact entre hôtes et la spécificité d'hôtes des *Francisella*-LE (i.e. via des contextes écologiques favorisants). Les résultats de cette étude ont donné lieu à une publication acceptée en mai 2021 (« Ecological contacts and host specificity promote the replacement of nutritional endosymbionts in ticks ») et disponible en annexe de cette thèse.

2.2.4. Les endosymbiotes hérissables facultatifs : qu'en est-il chez les tiques ?

Plusieurs symbiotes appartenant à des genres et espèces de bactéries intracellulaires hérissables sont détectés chez les tiques, mais ceux-ci ne sont pas non nécessaires à la réalisation de leur cycle de vie. Leur prévalence chez les espèces de tiques est alors variable. L'étude de Duron et al. (2017) a recherché via des techniques homogènes la présence des 10 genres bactériens

intracellulaires précédemment énoncés parmi des espèces de tiques dures et molles, pour un total de 81 espèces. Si plusieurs espèces de tiques n'ont pu être étudiées qu'à travers des individus d'une population, l'étude de ces 861 individus a permis d'établir que ces endosymbiotes étaient présents dans une diversité d'espèces de tiques (Figure 6), mais aussi de comparer leurs prévalences entre plusieurs populations. Par exemple, chez l'espèce de tiques dures *Ixodes arboricola*, la présence de *Rickettsiella* a été reportée dans les cinq localités testées mais avec des prévalences allant de moins de 10% à environ 50%. Pour une autre espèce, *Rhipicephalus decoloratus*, la présence de *Spiroplasma* n'a été détectée que dans deux populations parmi cinq testées, pour une prévalence de 10% et 50%. Dans ces mêmes populations, des infections sporadiques de *Cardinium*, *Rickettsia*, *Midichloria* et *Francisella* ont également été relevées. Cette étude met alors en lumière plusieurs aspects chez ces bactéries. Le premier est que pour un même genre bactérien, sa distribution au sein des espèces dépend d'une composante populationnelle ce qui pourrait refléter une présence environnement-dépendante. D'autre part, les prévalences de ces bactéries peuvent atteindre des prévalences fortes (supérieures à 30%), mais leur présence peut également être représentée par des événements plus sporadiques. Cette étude, parmi d'autres (Moutailler et al., 2016), met aussi en lumière que des co-infections entre endosymbiotes obligatoires et facultatifs (qui plus est plusieurs espèces en même temps) occurrent régulièrement. Une autre caractéristique de ces endosymbiotes est que leur héritabilité maternelle est variable selon les espèces et individus infectés, mais aussi selon le type de symbiotes.

Malgré des taux d'infection forts dans certaines populations et espèces, peu d'information permet aujourd'hui de définir les effets phénotypiques de ces différentes bactéries et par extension les mécanismes expliquant leur distribution chez les espèces de tiques. Certaines des espèces sont décrites comme des agents pathogènes de vertébrés possédant une transmission mixte ; c'est notamment le cas pour plusieurs espèces du genre *Rickettsia* (mais pas toutes), des bactéries intracellulaires obligatoires transmises maternellement par les tiques et d'autres arthropodes (Perlman et al., 2006). Cependant, pour la majorité des autres bactéries

intracellulaires, leurs effets phénotypiques chez leur hôte tique et vertébrés sont méconnus. Leur proximité phylogénétique avec des agents pathogènes de vertébrés tend à ce que ces bactéries soient considérées comme potentiellement pathogènes, mais leur compétence vectorielle chez les tiques et leur pathogénicité chez un hôte vertébré restent pour plusieurs à éclaircir. Si plusieurs influences sur leurs hôtes tiques ont été recherchées, comme des perturbations du sex-ratio (Van Oosten et al., 2018), un impact sur la mobilité (Benelli, 2020)), une résistance aux changements de températures (Neelakanta et al., 2010) ou un effet protecteur contre l'infection par des agents pathogènes (Burgdorfer et al., 1981; Gall et al., 2016), nos connaissances à leurs sujets restent encore limitées. Pourtant, si on considère une dichotomie simplifiée du microbiome des tiques, d'un côté des endosymbiotes à transmission maternelle et de l'autre des agents pathogènes de vertébrés à transmission majoritairement horizontale, l'antagonisme de leurs stratégies évolutives offre un cadre attendu d'interactions (Bonnet et al., 2017). La localisation intracellulaire d'un grand nombre de membres du microbiome des tiques favoriserait les contacts entre différentes espèces bactériennes et donc leurs interactions (Ahantarig et al., 2013); l'intestin serait également un lieu privilégié de rencontre et d'interactions, notamment entre membres microbiens mais également avec le système immunitaire de l'hôte (Narasimhan and Fikrig, 2015). Dans le cadre de cette thèse nous nous sommes intéressés à deux genres bactériens qui pourraient compter des espèces de symbiotes facultatifs de tiques : *Rickettsia* et *Spiroplasma*. Ces espèces sont identifiées chez une diversité d'espèces de tiques (45 et 13, respectivement, d'après l'étude de Duron et al. (2017)). Nous allons les décrire plus spécifiquement ci-dessous, puis dans les Chapitre 3 et Chapitre 4. Plusieurs informations sur les autres genres bactériens sont présentées dans les articles suivants : Ahantarig et al., (2013), Bonnet and Pollet (2020). Pour certaines bactéries comme *Wolbachia* et *Arsenophonus*, il est à noter que leur identité même d'endosymbiotes est remise en question au moins chez certaines espèces de tique. Plusieurs études ont en effet établi que leur présence chez *I. ricinus* était associée à la présence de de larves ou œufs de guêpes parasitoïdes (infectées par ces endosymbiotes) dont les larves se développent dans le corps des tiques (Bohacsova et al., 2016; Plantard et al., 2012).

Les *Rickettsia* sont des bactéries intracellulaires obligatoires dont de multiples espèces sont détectées à la fois chez les tiques dures et les tiques molles. Leur transmission chez l'humain et d'autres animaux peut provoquer des pathologies appelées rickettsioses (e.g. *R. japonica* (Uchida et al., 1992), *R. rickettsii* qui est l'agent de la Fièvre Pourprée des Montagnes Rocheuses transmis par des tiques (Parker and Spencer, 1926)). Une diversité spécifique, phylogénétique et phénotypique des *Rickettsia* est associée aux tiques. De nombreuses espèces sont caractérisées comme des agents pathogènes de vertébrés dont les tiques sont les vecteurs, pouvant provoquer des rickettsioses modérées à sévères, et de façon intéressante, certaines de ces *Rickettsia* se maintiennent au sein des populations de tiques via une transmission maternelle (Burgdorfer and Brinton, 1975). D'autres impactent négativement la valeur sélective de leurs hôtes tiques, comme *R. rickettsii* chez sa tique vectrice *Dermacentor andersoni* (Niebylski et al., 1999), une espèce qui possède d'ailleurs un mode de transmission mixte (Burgdorfer and Brinton, 1975). D'autres espèces de *Rickettsia* ne présentent néanmoins pas de pathogénicité pour les vertébrés et pourraient se maintenir chez les tiques par transmission verticale (avec un taux fort mais variable selon les individus), comme *R. peacockii* chez la tique *D. andersoni* (Mattila et al., 2007; Niebylski et al., 1997), *R. vini* chez *I. arboricola* (Novakova et al., 2016) et *R. buchneri* chez *I. scapularis* et *I. pacificus* (Kurtti et al., 2015). Leurs phénotypes chez les tiques ne sont pas encore formellement caractérisés mais de premiers éléments tendent à faire penser que ces espèces pourraient être liées à des bénéfices nutritionnels (comme argumenté précédemment) et/ou défensifs (Burgdorfer et al., 1981; Cull et al., 2022; Hunter et al., 2015). Par exemple, chez la tique dure *Dermacentor andersoni* une étude a montré que la densité d'infection d'*Anaplasma marginale*, un agent pathogène de vertébré, était négativement corrélée à la densité d'infection d'un symbiote héritable, *Rickettsia belli* (Gall et al., 2016). Toujours chez la même espèce, une autre espèce de *Rickettsia*, *R. peacockii*, la transmission maternelle inhiberait la multiplication et la transmission de l'espèce pathogène *R. rickettsii* (Burgdorfer et al., 1981). Il ne semble pas exister de patrons de co-phylogénie entre les *Rickettsia* et les tiques, un genre de tiques pouvant être infecté par des bactéries phylogénétiquement distantes (Binetruy et al., 2020a; Tian et al., 2021). Les *Rickettsia*

n'infectent pas exclusivement les tiques. Elles sont identifiées chez une vaste diversité d'hôtes (plantes, invertébrés, protistes), et chez les arthropodes elles pourraient infecter jusqu'à 42% des espèces (Weinert et al., 2015). Si d'autres espèces d'agents pathogènes de vertébrés sont transmises par des puces, mites et poux, la plupart des espèces de *Rickettsia* présentent une transmission verticale, où leur dépendance à la reproduction à leur hôtes se traduit par l'évolution de différents mécanismes comme la manipulation de la reproduction ou encore des formes de mutualisme et commensalisme (Perlman et al., 2006).

A ce jour, deux espèces de *Spiroplasma* ont été détectées chez les tiques : *S. ixodetis* (Duron et al., 2017b) et *S. mirum* (Duron et al., 2008; Tully et al., 1982). *Spiroplasma mirum* reste une espèce rarement détectée chez les tiques et est considéré comme un agent pathogène occasionnel (Tully et al., 1982). En opposition, *S. ixodetis* est beaucoup plus commune : cette espèce a été identifiée chez plusieurs genres et espèces de tiques dures (*Ixodes* spp., *Dermacentor* spp., *Rhipicephalus* spp.) mais également chez diverses autres familles d'Arthropodes. Les membres de l'espèce sont associés à des phénotypes divers chez leurs hôtes arthropodes : *male-killing* (e.g. chez des papillons, coccinelles drosophiles), incompatibilité cytoplasmique (chez des guêpes parasitoïdes) et protection contre des guêpes parasitoïdes et champignons (e.g. chez des pucerons) (Ballinger and Perlman, 2019; Jiggins et al., 2000; Pollmann et al., 2022; Sanada-Morimura et al., 2013; Tabata et al., 2011; Tinsley and Majerus, 2006). La présence de *S. ixodetis* chez des nourrissons immunodépressifs a également été associée à des pathologies oculaires, définissant ainsi la première observation d'un phénotype pathogénique de cette espèce (Eimer et al., 2022; Farassat et al., 2021; Matet et al., 2020). Or, chez les tiques, aucun de ces effets, aucun biais de sex-ratio n'a été observé et cela malgré la diversité d'espèces infectées (Binetruy et al., 2019a). Nous connaissons très peu les autres aspects de sa biologie (distribution tissulaire) et la nature de ses interactions avec les tiques. Tout du moins, plusieurs études montrent que *S. ixodetis* est un symbiote héritable maternellement. De plus la répartition de *S. ixodetis* chez les tiques et d'autres arthropodes reposerait sur l'existence de plusieurs changements d'hôtes, ce qui impliquerait une potentielle transmission horizontale de *S. ixodetis* (Binetruy et al., 2019a).

Problématique de thèse et objectifs principaux

De plus en plus d'études s'intéressent à l'impact du microbiome des tiques (ou d'une espèce en particulier) sur la compétence vectorielle des tiques pour les agents pathogènes de vertébrés (Bonnet and Pollet, 2020; de la Fuente et al., 2017; Narasimhan et al., 2014), où comme chez l'humain, la considération du microbiome pourrait permettre une meilleure stratégie de prévention et de contrôle des maladies. Cependant, pour espérer utiliser cette influence dans une optique de prévention sanitaire et anticiper ces effets, il est important de comprendre au préalable la nature des relations que les tiques entretiennent avec les différents membres de leur microbiome, pas uniquement leurs agents pathogènes associés, et aussi les processus éco-évolutifs qui peuvent les lier. Des membres majeurs du microbiome des tiques sont notamment leurs endosymbiotes, qui plus est nutritionnels. Pourtant, malgré leur présence obligatoire pour les tiques au regard de leur régime hématophage strict, il est intéressant de comparer que par rapport à d'autres arthropodes à régime alimentaire restreint, leur rôle et les différentes voies métaboliques et génomiques impliquées dans celui-ci n'ont été mis en évidence que récemment. Concernant les endosymbiotes facultatifs, malgré leur diversité et le fait que ceux-ci peuvent participer à des adaptations locales des populations de tiques comme chez d'autres arthropodes, leur impact chez les tiques est méconnu. Dans ce contexte, cette thèse aborde alors la problématique suivante : quels sont les mécanismes qui permettent le maintien des systèmes endosymbiotiques héréditaires chez les tiques ? Ainsi, nous nous intéresserons à plusieurs partenaires bactériens à transmission maternelle, certains pour lesquels l'impact chez les tiques est établi, d'autres pour lesquels peu d'information fonctionnelle est disponible. Cette diversité de systèmes nous permettra d'aborder deux thématiques autour desquelles plusieurs questions principales restaient en suspens:

- (i) L'écologie et évolution des symbioses nutritionnelles chez les tiques. Pourquoi la proximité phylogénétique entre certains symbiotes nutritionnels et des agents pathogènes de vertébrés pose-t-elle parfois question sur la fiabilité des études

épidémiologiques ? Une fois l'interaction symbiotique mise en place, comment celle-ci peut-elle évoluer ? Quels sont notamment les répercussions de l'érosion génomique sur l'association entre les tiques et leurs endosymbiotiques obligatoires ?

- (ii) L'écologie et évolution des symbioses facultatives chez les tiques. S'il existe des endosymbiotes facultatifs chez les tiques, quels sont les caractéristiques biologiques majeures de ces associations ? Quels mécanismes (transmission, phénotypes, etc) permettraient leur maintien au sein des populations de tiques ? Existe-il des risques infectieux, occasionnels ou non, pour les animaux et l'Humain ?

Les travaux de cette thèse sont répartis en quatre chapitres. Le premier chapitre s'articule d'abord autour d'une problématique encore persistante lié au microbiome des tiques : la mal-identification des endosymbiotes mutualistes nutritionnels en tant qu'agents pathogènes. A partir de la ré-analyse d'un jeu de données produit dans le cadre d'une étude de métagénomique publiée par Jia et al. (2020), nous allons démontrer que ces mal-identifications peuvent encore être communes, et cela malgré l'utilisation d'une méthode de détection basée sur des données de séquençage haut-débit et des outils de bio-informatiques. Ces « nouvelles » techniques de séquençage et d'analyse sont pourtant déterminantes pour la récupération et l'étude des génomes d'endosymbiotes de tiques. Par exemple, les métagénomes de tiques (séquençage de l'intégralité des génomes présents au sein d'un organisme) sont pour l'instant l'alternative la plus simple à mettre en place pour obtenir les génomes d'endosymbiotes intracellulaires obligatoires (i.e. non cultivables sans cellules, donc toujours présence de l'ADN hôte). Dans le deuxième chapitre, nous nous sommes basés sur cette technique pour obtenir et étudier les génomes de deux endosymbiotes co-infectant les individus de l'espèce *Hyalomma marginatum*. Les résultats de cette étude mettent en évidence l'existence d'une symbiose tripartite entre la tique et ces deux endosymbiotes nutritionnels mais surtout les causes de cette nécessité. En effet, par érosion génomique, des fonctions essentielles à la symbiose encodées dans le génome d'un partenaire ne sont plus présentes et c'est la co-infection qui permet l'apport des trois vitamines à l'hôte tique. C'est également grâce à des analyses bio-informatiques et phylogénétiques que nous avons pu

retracer l'histoire évolutive d'un opéron sur lequel repose la voie métabolique déficiente. La multiplicité des analyses a été primordiale dans nos approches d'études génomiques, que ce soit dans le Chapitre 1 et Chapitre 2. Nous avons poursuivi cette volonté d'approches multi-analyses dans le Chapitre 3 dans lequel nous cherchons à apporter des éléments à la caractérisation des *Rickettsia* chez les tiques molles, sous étudiées par rapport à celles infectant les tiques dures. Nous nous sommes notamment basés sur la détermination de plusieurs facteurs biologiques, évolutifs et génomiques d'une espèce en particulier, *R. lusitaniae*, pour laquelle nous montrons qu'il s'agit d'un endosymbiote facultatif particulièrement répandu chez les tiques molles. Dans le Chapitre 4, nous présentons la démarche méthodologique que nous avons mise en place dans le but d'obtenir une diversité de génomes du symbiote facultatif *S. ixodetis* communément détecté chez les tiques dures mais aussi chez d'autres arthropodes. Une fois assemblés, nous pourrions comparer ces génomes et définir leurs caractéristiques génomiques, mais aussi rechercher de potentiels déterminants génomiques impliqués dans différents phénotypes déjà décrits pour d'autres clades de *Spiroplasma*. La diversité et la complémentarité des approches méthodologiques a été une envie et un fil conducteur dans cette thèse, tout comme la nécessité de considérer des échelles intra-individuelles, inter-populationnelles et interspécifiques pour la compréhension des mécanismes de persistance des endosymbiotes chez leurs hôtes.

Chapitre 1

Tiques et symbiotes mutualistes : un système sujet à de récurrentes mal-identifications

Article publié

Titre : Evidence that microbes identified as tick-borne pathogens are nutritional endosymbionts

Auteurs : Marie Buysse and Olivier Duron

Journal et année : Cell 184, 2021

Les premières descriptions de pathologies associées aux tiques remontent au début du XIX^{ème} siècle, même si les agents pathogènes impliqués sont souvent eux identifiés *a posteriori*. Des symptômes de la médiatique Maladie de Lyme auraient, par exemple, été décrits dès 1883 (Burgdorfer, 1993) mais la bactérie *Borrelia burgdorferi* n'a été taxonomiquement identifiée qu'en 1984 (Johnson et al., 1984). Depuis des décennies, les études sur le microbiome des tiques se sont principalement focalisées sur ces microorganismes pouvant être transmis aux Vertébrés, ce qui s'accompagne de l'augmentation du nombre de caractérisations d'agents pathogènes avérés et potentiels (Tokarz and Lipkin, 2021). Dans ce contexte, les microorganismes non-pathogènes ont pendant longtemps été relayés à un rang secondaire, ignorés ou encore supposés pathogènes mais sans preuve d'infection et/ou pathogénicité. Le rôle des symbiotes nutritionnels n'a par exemple été mis en évidence chez les tiques que récemment, malgré leur prévalence importante chez de nombreuses espèces de tiques et leur caractère adaptatif essentiel

dans l'exploitation d'une ressource alimentaire biaisée. La mise en évidence de ces partenaires symbiotiques est profondément liée aux avancées technologiques.

Historiquement, les microorganismes étaient décrits et détectés via des observations morphologiques et des techniques de culture, de marquage et d'immuno-détection. L'invention en 1983 de la technique de réaction de polymérase en chaîne (PCR) et sa démocratisation dans les années 1990 a été la porte ouverte à de nouveaux moyens de détection, qui peuvent notamment détecter de façon spécifique des organismes jusqu'alors non-cultivables ou difficiles d'observation. Couplée à du séquençage, la PCR a également permis d'obtenir et de comparer des séquences nucléiques et ainsi d'établir des distinctions entre organismes morphologiquement proches mais phylogénétiquement divergents. Depuis le début du XXI^{ème} siècle et le développement des technologies de séquençage haut-débit (NGS), la diversité des microorganismes présents chez un hôte peut être déterminée sans *a priori* nécessaire, comme par exemple avec la technique de métabarcodage. Aujourd'hui, la production de génomes entiers de microorganismes est accessible, permettant de mieux comprendre leurs capacités métaboliques. Les techniques de biologie moléculaire et de séquençage sont d'autant plus utiles dans le cadre de l'étude de bactéries intracellulaires obligatoires non-cultivables.

Chez les tiques, ces avancées ont permis d'appréhender la diversité, la complexité et le dynamisme de leur microbiome (Cabezas-cruz et al., 2019; Greay et al., 2018; Wu-Chuang et al., 2021) jusque-là sous-estimés. Notamment, comme précédemment évoqué, l'un des facteurs de cette sous-estimation a été la mal-identification de symbiotes nutritionnels de tiques comme agents pathogènes de Vertébrés. Les avancées en biologie moléculaire et en séquençage ont permis de mettre en évidence que les tiques étaient en réalité (i) communément infectées par des bactéries très proches mais distinctes des agents pathogènes formellement décrits et (ii) que ces bactéries n'étaient retrouvées que chez les tiques. Les exemples les plus emblématiques de ces mal-identifications seraient ceux concernant les endosymbiotes nutritionnels *Coxiella*-LE et *Francisella*-LE, qui sont phylogénétiquement proches des agents de la fièvre Q (*C. burnetii*) et de la tularémie (*F. tularensis*), respectivement. Ces endosymbiotes nutritionnels sont désormais

reconnus comme largement distribués au sein des différentes espèces de tiques (Duron et al., 2017b; Machado-Ferreira et al., 2016) montrant bien que des associations complexes entre les tiques, des agents pathogènes et des microorganismes non-pathogènes sont répandues (Bonnet et al., 2017).

Néanmoins, la vigilance doit rester de rigueur lors du développement et de l'utilisation d'outils moléculaires pour la détection de microorganismes spécifiques. Tout d'abord, les agents pathogènes et non-pathogènes phylogénétiquement proches peuvent co-occurrencer dans une même espèce de tiques, impliquant que même s'il existe des mutations spécifiques à chacun, ils partagent des similitudes génétiques. Des PCR visant des gènes à la fois présents chez les deux organismes et peu divergents pourraient ainsi amplifier non-spécifiquement leur cible et surestimer le nombre de vrais positifs. Ainsi, il a été montré qu'un protocole basé sur l'amplification de l'élément d'insertion IS1111 pour la détection de *C. burnetii* chez les tiques révélait également sa présence chez les *Coxiella*-LE, induisant plusieurs cas de mal-identification (Duron et al., 2015a, 2015b).

Les nouveaux outils de bio-informatique qui accompagnent l'analyse des données de NGS ne sont pas exempts de ces biais d'interprétation. L'article de ce chapitre reprend l'exemple d'un cas de mal-identification que nous avons démontré à la suite de la parution de l'article de Jia et al. (2020). Cette étude s'appuyait sur de nombreux métagénomés de 6 espèces de tiques pour obtenir les génomes de ces tiques et ainsi étudier leur diversité génétique et leur structuration. Les auteurs ont poursuivi leur analyse en cherchant à définir l'occurrence des agents pathogènes bactériens et protozoaires présents, toujours à partir de ces métagénomés. En se basant sur une assignation taxonomique des *reads*, les auteurs reportent de fortes prévalences de *C. burnetii* et *F. tularensis* et pas ou peu d'endosymbiotes nutritionnels. Cette surprenante observation nous a conduit à ré-analyser leur jeu de données, partant des métagénomés bruts et choisissant une approche analytique différente. En effet, nous avons assemblé les génomes complets de *Coxiella* sp. et *Francisella* sp. afin d'assigner phylogénétiquement ces bactéries. Nous avons complété nos analyses avec la recherche des voies de biosynthèse de vitamines B essentiellement identifiées

dans le cadre de symbiose nutritionnelle chez les tiques et des facteurs de virulence associées à chaque agent pathogène (système de sécrétion dot/Icm pour *C. burnetii* et ilot de pathogénicité FPI pour *F. tularensis*). Notre ré-analyse a permis de révéler des mal-identifications puisque seules quelques *C. burnetii* et aucune *F. tularensis* ont été mises en évidence. Par contre, nous avons obtenu plusieurs génomes de *Coxiella*-LE et *Francisella*-LE chez lesquels les gènes de virulence étaient pseudogénisés ou absents mais les voies de biosynthèse des vitamines B étaient conservées et potentiellement fonctionnelles.

Cette étude permet de soulever plusieurs points de réflexion. Lors d'études sur la diversité du microbiome des tiques, par métabarcodage par exemple, les endosymbiotes nutritionnels (et au-delà, les microorganismes non-pathogènes) occupent une place prépondérante dans les communautés microbiennes décrites. Néanmoins, ceux-ci semblent négligés lors d'analyses ayant pour but l'identification d'espèces pathogènes. Dans ce contexte, ce manque de considération pourrait être une des raisons de la persistance des cas de mal-identifications, et ce malgré la publication de différentes études incitant à la vigilance (Körner et al., 2021). D'autre part, les analyses bio-informatiques sont des outils puissants permettant d'obtenir de nombreux résultats à partir d'un même jeu de données. Cependant, leur utilisation, au même titre que d'autres protocoles méthodologiques, ne peut se soustraire à la compréhension des sorties informatiques qu'ils fournissent, où la place de l'interprétation biologique doit persister. Ici, des prévalences très fortes d'agents pathogènes mais aucun report de symbiotes reconnus comme obligatoires auraient pu soulever des interrogations sur la spécificité de l'outil utilisé et dans quelle mesure sa sortie peut être utilisée sans vérification supplémentaire.

Letter

Evidence that microbes identified as tick-borne pathogens are nutritional endosymbionts

Marie Buysse^{1,2,*} and Olivier Duron^{1,2,*}

¹Maladies Infectieuses et Vecteurs: Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle (MIVEGEC), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut pour la Recherche et le Développement (IRD), Université de Montpellier (UM), Montpellier, France

²Centre de Recherche en Écologie et Évolution de la Santé (CREES), Montpellier, France

*Correspondence: marie.buysse@ird.fr (M.B.), olivier.duron@ird.fr (O.D.)

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.053>

Jia et al. (Jia et al., 2020) reported major discoveries on genetic basis of hematophagy and vector capacities in ticks. Our re-examination of the tick metagenomic datasets shows that nutritional endosymbionts required for hematophagy were also widely present. They were misidentified as tick-borne pathogens, indicating that the risk of infection associated with ticks was lower than initially stated.

Ticks harbor nutritional endosymbionts

Ticks do not use other food sources than blood, and as such, they ingest low levels of vitamins: they need a vitamin supplementation through associations with nutritional bacterial partners, usually *Coxiella*-like endosymbionts (*Coxiella*-LE hereafter) or *Francisella*-like endosymbionts (*Francisella*-LE) (Duron and Gottlieb, 2020). The sequencing of *Coxiella*-LE and *Francisella*-LE genomes indicated that they produce the same three B vitamin types: biotin (vitamin B7), riboflavin (B2), and folate (B9) (Duron and Gottlieb, 2020). Further experiments confirmed that this B vitamin supplementation is critical for growth, reproduction, and survival of ticks (Zhong et al., 2007; Ben-Yosef et al., 2020; Duron et al., 2018; Guizzo et al., 2017; Li et al., 2018).

We found that nutritional endosymbionts have been misidentified as pathogens

Coxiella-LE and *Francisella*-LE belong to bacterial genera dominated by virulent pathogens, including the agent of Q fever, *Coxiella burnetii*, and the agent of tularemia, *Francisella tularensis*, respectively. High abundance of *C. burnetii* and *F. tularensis*, but no nutritional endosymbiont (except once in the cattle tick *Rhipicephalus microplus*), were primarily re-

ported from tick metagenomes (Jia et al., 2020). However, our re-analyses of metagenomic datasets (supplemental information) is indicative of misidentifications since we rarely detected the presence of *C. burnetii* and never that of *F. tularensis* (Tables S1 and S2). We rather showed that *Coxiella*-LE and *Francisella*-LE are widely present in samples of five of the six tick species examined (Tables S1 and S2).

Indeed, *Hyalomma asiaticum* tick specimens (n = 19) were early reported as infected by *C. burnetii* or *F. tularensis* (Jia et al., 2020). However, phylogenetic analyses of the *Francisella* multilocus typing system (MLST) genes (supplemental information) showed that *Francisella*-LE, and not *F. tularensis* or other pathogenic *Francisella* species, are present in these 19 specimens of *Hy. asiaticum* (Figure S1A). We further reconstructed these *Francisella*-LE genomes (Table S2) and confirmed that they are divergent from *F. tularensis* (Figure S1B). The *Francisella*-LE genomes (1.55 Mb) of *Hy. asiaticum* are similar in size and organization to other *Francisella*-LE genomes with a substantial level of genome reduction and rearrangement compared to *F. tularensis* (2 Mb) (Figure S1B). Most of the *Francisella* virulence genes, including the *Francisella* Pathogenicity Island (FPI), have been pseudogenized or are completely absent (Figure S1C). In contrast, complete pathways for biotin, riboflavin, and folate synthesis are conserved, as observed in other *Francisella*-LE (Figure S1D). This suggests that the *Francisella* of *Hy. asiaticum* are not pathogens but nutritional endosymbionts.

Further examination confirmed the presence of *C. burnetii* in 5 of the 19 *Hy. Asiaticum* specimens. Phylogenetic analyses of *Coxiella* genomes found in *Hy. Asiaticum*

(Table S2; Figure S1E) and their genomes' size and organization (Figure S1F) revealed that they belong to the *C. burnetii* species. They also harbor the *Dot/Icm* (defect in organelle trafficking/intracellular multiplication) system, which is used by *C. burnetii* to secrete a range of virulence factors into vertebrate cells (Figure S1G).

However, we did not observe *C. burnetii* in the five other tick species, while it was early reported in each of them (Jia et al., 2020). We have re-examined randomly sampled metagenomes of the ticks *Ixodes persulcatus* (n = 5), *Haemaphysalis longicornis* (n = 5), *Dermacentor silvarum* (n = 4), *R. sanguineus* (n = 3), and *R. microplus* (n = 3), and we systematically obtained large *Coxiella*-LE contigs (and never *C. burnetii*) from each examined metagenomes (but not in *I. persulcatus*; Table S2). These *Coxiella*-LE are well divergent from *C. burnetii* (Figure S1E). In tick species for which we obtained complete genomes (*R. sanguineus* and *R. microplus*), *Coxiella*-LE show a large-scale genome streamlining compared to *C. burnetii*: their genomes range from 0.81 to 1.55 Mb, as observed in other *Coxiella*-LE, while the *C. burnetii* genome size is typically 2 Mb (Figure S1F). In all *Coxiella*-LE genomes, the virulence genes encoding the *Dot/Icm* secretion system have been pseudogenized or are completely absent (Figure S1G). In the (complete) *Coxiella*-LE genomes of *R. sanguineus* and *R. microplus*, the genes of biotin, riboflavin, and folate synthesis have been found all intact (Figure S1F). In the (partial) *Coxiella*-LE genomes of *Hae. longicornis* and *D. silvarum*, most of these B vitamin synthesis genes are also present and intact, but we only detected partial sequences for a few of them (Figure S1F). These partial gene sequences never contain internal codon stop disrupting their



coding sequences but are always located at the end of unassembled contigs, suggesting that incomplete gene sequences are due to low sequencing quality. Overall, this indicates that the *Coxiella* of *Hae. longicornis*, *D. silvarum*, *R. sanguineus*, and *R. microplus* are also nutritional endosymbionts.

In *I. persulcatus*, *Coxiella* and *Francisella* are absent (Table S1), but we detected the presence of *Lariskella* (Rickettsiales: Midichloriaceae) that are uncommon bacterial endosymbionts of arthropods (Duron et al., 2017; Matsuura et al., 2012). *Lariskella* contigs were largely incomplete, and we have not found B vitamin biosynthesis pathways. However, partial 16S rRNA gene sequences showed that *Lariskella* are related to an intra-mitochondrial bacterium, *Midichloria mitochondrii* (Figure S11), which is known to encode complete synthesis pathways for biotin, riboflavin, and folate (Sassera et al., 2011). If these pathways have been conserved intact in *Lariskella*, it may suggest that they are nutritional endosymbionts of *I. persulcatus*.

Overall, these metagenomic re-analyses confirm that nutritional endosymbionts are common in ticks

The absence of functional virulence genes indicates their non-pathogenic nature, while the presence of B vitamin synthesis pathways confirms their pivotal nutritional role in ticks. These observations highlight that mutualism with microbes is one of the keys to the origins of hematophagy in ticks (Duron and Gottlieb, 2020). Another important conclusion is that ticks only occasionally carry *C. burnetti* and *F. tularensis*.

The current opinion on tick-borne microbes has a strong anthropocentric bias

This paradigm needs to be changed. Further studies should take into account the fact that tick microbial communities are largely dominated by non-pathogenic microorganisms. The inclusion of this neglected microbial diversity is now necessary to change our understanding of ticks, tick-borne microbes, and hematophagy (Duron and Gottlieb, 2020).

Accession codes

The bacterial genomes obtained in this study have been deposited in Dryad (10.5061/dryad.t76_hdr80p) and in GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) with accession numbers GenBank: MW648737–MW648739.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.053>.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by 'Investissements d'Avenir' managed by the Agence Nationale de la Recherche (ANR, France, Laboratoire d'Excellence CEBA, ref. ANR-10-LABX-25-01).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.B. and O.D. conceived and designed the study; M.B. performed the bioinformatics analyses; M.B. and O.D. wrote the manuscript.

REFERENCES

Ben-Yosef, M., Rot, A., Mahagna, M., Kapri, E., Behar, A., and Gottlieb, Y. (2020). *Coxiella*-Like endosymbiont of *Rhipicephalus sanguineus* is

required for physiological processes during ontogeny. *Front. Microbiol.* 11, 493.

Duron, O., and Gottlieb, Y. (2020). Convergence of nutritional symbioses in obligate blood feeders. *Trends Parasitol.* 36, 816–825.

Duron, O., Binetruy, F., Noël, V., Cremaschi, J., McCoy, K.D., Arnathau, C., Plantard, O., Goolsby, J., Pérez de León, A.A., Heylen, D.J.A., et al. (2017). Evolutionary changes in symbiont community structure in ticks. *Mol. Ecol.* 26, 2905–2921.

Duron, O., Morel, O., Noël, V., Buysse, M., Binetruy, F., Lancelot, R., Loire, E., Ménard, C., Bouchez, O., Vavre, F., and Vial, L. (2018). Tick-bacteria mutualism depends on B vitamin synthesis pathways. *Curr. Biol.* 28, 1896–1902.e5.

Guizzo, M.G., Parizi, L.F., Nunes, R.D., Schama, R., Albano, R.M., Tirloni, L., Oldiges, D.P., Vieira, R.P., Oliveira, W.H.C., Leite, M.S., et al. (2017). A *Coxiella* mutualist symbiont is essential to the development of *Rhipicephalus microplus*. *Sci. Rep.* 7, 17554.

Jia, N., Wang, J., Shi, W., Du, L., Sun, Y., Zhan, W., Jiang, J.F., Wang, Q., Zhang, B., Ji, P., et al.; Tick Genome and Microbiome Consortium (TIGMIC) (2020). Large-scale comparative analyses of tick genomes elucidate their genetic diversity and vector capacities. *Cell* 182, 1328–1340.e13.

Li, L.H., Zhang, Y., and Zhu, D. (2018). Effects of antibiotic treatment on the fecundity of *Rhipicephalus haemaphysaloides* ticks. *Parasit. Vectors* 11, 242.

Matsuura, Y., Kikuchi, Y., Meng, X.Y., Koga, R., and Fukatsu, T. (2012). Novel clade of alphaproteobacterial endosymbionts associated with stinkbugs and other arthropods. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4149–4156.

Sassera, D., Lo, N., Epis, S., D'Auria, G., Montagna, M., Comandatore, F., Horner, D., Peretó, J., Luciano, A.M., Franciosi, F., et al. (2011). Phylogenomic evidence for the presence of a flagellum and *cbb(3)* oxidase in the free-living mitochondrial ancestor. *Mol. Biol. Evol.* 28, 3285–3296.

Zhong, J., Jasinskas, A., and Barbour, A.G. (2007). Antibiotic treatment of the tick vector *Amblyomma americanum* reduced reproductive fitness. *PLoS ONE* 2, e405.

Supplementary information

Evidence that microbes identified as tick-borne pathogens are nutritional endosymbionts

Marie Buysse and Olivier Duron

Supplementary information

Materials and methods

Genome assembly, quality assessment and genome annotation of *Coxiella* and

Francisella bacteria. Metagenomes were downloaded from the Genome Sequence Archive database (<https://bigd.big.ac.cn/gsa/>) (CRA002715 project). Metagenomes examined in our study are presented in the Table S1. Reads of *Coxiella* and *Francisella* were filtered by mapping on reference genomes (listed in Table S1) with BWA (option mem) and SAMtools (Li and Durbin, 2009). Mapped reads of *Coxiella* and *Francisella* were further assembled using SPAdes (v3.11.1) (Bankevich et al., 2012) and Megahit (v1.2.9) (Li et al., 2015). The best assembly was selected according (1) to the N50 and L50 criteria, estimated with QUAST (v4.6.3) (Gurevich et al., 2013), and (2) the mapping rate and coverage of reads on the assembled genomes. The assembled scaffolds (“raw” assembly) were compared to the reference genome to discard unspecific scaffolds using RaGOO (v1.02) (Alonge et al., 2019), and the assignation of the remaining scaffolds (“filtered” assembly) was confirmed using the online NCBI BLAST tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The quality assessment and the completeness of the “filtered” assembly were estimated using QUAST (v4.6.3) (Gurevich et al., 2013) and BUSCO (v3.0.2) (Seppey et al., 2019), respectively. The quality

assessments and the completeness of “raw” and “filtered” assemblies are presented in the Table S2. “Filtered” assemblies were annotated using Prokka (v1.13.1) (Seemann, 2014). *Francisella* and *Coxiella* whole-genome alignments were done using Mauve (Darling et al., 2004). The gene sequences of the *Francisella* pathogenicity island, the *Coxiella dot/Icm* secretion system and B vitamin biosynthesis pathways were retrieved using BLASTn, BLASTp and tBLASTx (Altschul et al., 1990).

Identification of *Lariskella in Ixodes persulcatus*. Reads of the metagenomes of *Ixodes persulcatus* were filtered by mapping on *Midichloria mitochondrii* (CP002130) and *Rickettsia buchneri* (JFKF000000000) reference genomes with BWA (option mem) and SAMtools (Li and Durbin, 2009). Considering that no reference genome is available for this genera these genomes were selected as the closest relatives to *Lariskella*. Mapped reads were further assembled using SPAdes (v3.11.1) (Bankevich et al., 2012). All 16S rRNA gene sequences were retrieved from the “raw” assemblies using BLASTn (Altschul et al., 1990). First, obtained sequences were first phylogenetically assigned through ML analysis with MEGA X (Kumar et al., 2018). Then, identified *Lariskella* 16S rRNA gene sequences were further analyzed and compared to others Rickettsiales members through ML analysis with MEGA X (Kumar et al., 2018).

Phylogenetic analysis. Phylogenomic analyses have been performed using the newly assembled whole genomes and complete genomes obtained from GenBank (Table S3). Single-copy orthologs (SCO) were identified using OrthoFinder (v2.3.11) (Emms and Kelly, 2015). SCO were individually aligned with MAFFT (v7.450) (Katoh et al., 2002) and ambiguous positions were removed using trimAl (v1.2rev59) (Capella-Gutiérrez et al., 2009) prior to individual alignments concatenation using Amas 1.0 (Borowiec, 2016). Finally, the appropriate substitution models were determined using modeltest (v0.1.5) (Darriba et al.,

2020) and maximum likelihood (ML) trees were computed using RAxML (v8.2.9) (Stamatakis, 2014) with 1,000 bootstrap replicates to assess the robustness of the topology. Complementary single-gene phylogenetics for *Coxiella* (Duron et al., 2015) and *Francisella* (Binetruy et al., 2020) MLST were further conducted using ML analyses with MEGA X (Kumar et al., 2018).

Data availability. We deposited on GenBank all the genomes of *Coxiella* and *Francisella* obtained in this study under accession numbers XXX-XXX (pending). Command lines used for the metagenomes analyses are available on GitHub (https://github.com/mariebuysse/CELL2021_analyses).

Supplementary references

Alonge, M., Soyk, S., Ramakrishnan, S., Wang, X., Goodwin, S., Sedlazeck, F.J., Lippman, Z.B., and Schatz, M.C. (2019). RaGOO: Fast and accurate reference-guided scaffolding of draft genomes. *Genome Biol.* *20*, 1–17.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* *215*, 403–410.

Beare, P.A., Unsworth, N., Andoh, M., Voth, D.E., Omsland, A., Gilk, S.D., Williams, K.P., Sobral, B.W., Kupko, J.J., Porcella, S.F., et al. (2009). Comparative genomics reveal extensive transposon-mediated genomic plasticity and diversity among potential effector proteins within the genus *Coxiella*. *Infect. Immun.* *77*, 642–656.

Binetruy, F., Buysse, M., Lejarre, Q., Barosi, R., Villa, M., Rahola, N., Paupy, C., Ayala, D., and Duron, O. (2020). Microbial community structure reveals instability of nutritional symbiosis during the evolutionary radiation of *Amblyomma* ticks. *Mol. Ecol.* *29*, 1016–1029.

Borowiec, M.L. (2016). AMAS: A fast tool for alignment manipulation and computing of summary statistics. *PeerJ* *2016*.

Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J.M., and Gabaldón, T. (2009). trimAl: A tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* *25*, 1972–1973.

Darling, A.C.E., Mau, B., Blattner, F.R., and Perna, N.T. (2004). Mauve: Multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res.* *14*, 1394–1403.

Darriba, Di., Posada, D., Kozlov, A.M., Stamatakis, A., Morel, B., and Flouri, T. (2020).

ModelTest-NG: A new and scalable tool for the selection of DNA and protein evolutionary models. *Mol. Biol. Evol.* *37*, 291–294.

Duron, O., Morel, O., Noël, V., Buysse, M., Binetruy, F., Lancelot, R., Loire, E., Ménard, C., Bouchez, O., Vavre, F., et al. (2018). Tick-bacteria mutualism depends on B vitamin

synthesis pathways. *Curr. Biol.* 28, 1–7.

Duron, O., Noël, V., McCoy, K.D., Bonazzi, M., Sidi-Boumedine, K., Morel, O., Vavre, F., et al. (2015). The recent evolution of a maternally-inherited endosymbiont of ticks led to the emergence of the Q fever pathogen, *Coxiella burnetii*. *PLOS Path.* 11, e1004892.

Emms, D.M., and Kelly, S. (2015). OrthoFinder: solving fundamental biases in whole genome comparisons dramatically improves orthogroup inference accuracy. *Genome Biol.* 16, 1–14.

Gerhart, J.G., Moses, A.S., and Raghavan, R. (2016). A *Francisella*-like endosymbiont in the Gulf Coast tick evolved from a mammalian pathogen. *Sci. Rep.* 6, 1–6.

Gerhart, J.G., Auguste Dutcher, H., Brenner, A.E., Moses, A.S., Grubhoffer, L., and Raghavan, R. (2018). Multiple acquisitions of pathogen-derived *Francisella* endosymbionts in soft ticks. *Genome Biol. Evol.* 10, 607–615.

Gottlieb, Y., Lalzar, I., and Klasson, L. (2015). Distinctive genome reduction rates revealed by genomic analyses of two *Coxiella*-like endosymbionts in ticks. *Genome Biol. Evol.* 7, 1779–1796.

Guizzo, M.G., Parizi, L.F., Nunes, R.D., Schama, R., Albano, R.M., Tirloni, L., Oldiges, D.P., Vieira, R.P., Henrique, W., Oliveira, C., et al. (2017). A *Coxiella* mutualist symbiont is essential to the development of *Rhipicephalus microplus*. *Sci. Rep.* 7, 1–10.

Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., and Tesler, G. (2013). QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29, 1072–1075.

Johnson, S.L., Daligault, H.E., Davenport, K.W., Coyne, S.R., Frey, K.G., Korolev, G.I., Broomall, S.M., Bishop-Lilly, K.A., Bruce, D.C., Chertkov, O., et al. (2016). Genome sequencing of 18 *Francisella* strains to aid in assay development and testing. *Genome Announc.* 3.

Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K.I., and Miyata, T. (2002). MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 30,

3059–3066.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* *35*, 1547–1549.

Larsson, P., Oyston, P.C.F., Chain, P., Chu, M.C., Duffield, M., Fuxelius, H.H., Garcia, E., Hälltorp, G., Johansson, D., Isherwood, K.E., et al. (2005). The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. *Nat. Genet.* *37*, 153–159.

Li, H., and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* *25*, 1754–1760.

Ramaiah, A., and Dasch, G.A. (2018). Genome sequence of *Coxiella*-like endosymbiont strain CLERmD, a bacterial agent in the cattle tick (*Rhipicephalus microplus*) Deutsch Strain. *Genome Announc.* *6*, 18–19.

Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* *30*, 2068–2069.

Seshadri, R., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Nelson, K.E., Nelson, W.C., Ward, N.L., Tettelin, H., Davidsen, T.M., Beanan, M.J., et al. (2003). Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 5455–5460.

Smith, T.A., Driscoll, T., Gillespie, J.J., and Raghavan, R. (2015). A *Coxiella*-like endosymbiont is a potential vitamin source for the lone star tick. *Genome Biol. Evol.* *7*, 831–838.

Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* *30*, 1312–1313.

Sutor, E.C., and Weiss, E. (1961). Isolation of a Rickettsialike microorganism (*Wolbachia persica*, n. sp.) from *Argas persicus* (Oken). *J. Infect. Dis.* *108*, 95–106.

Tsementzi, D., Castro Gordillo, J., Mahagna, M., Gottlieb, Y., and Konstantinidis, K.T. (2018). Comparison of closely related, uncultivated *Coxiella* tick endosymbiont population genomes reveals clues about the mechanisms of symbiosis. *Environ. Microbiol.* *20*.

1 Supplementary tables

Specimen details		Mapping information (% of raw reads mapped)			
Tick species	Sample reference	With the <i>C. burnetii</i> RSA-493 genome	With the <i>Coxiella</i> -LE of <i>R. turanicus</i> genome	With the <i>F. tularensis</i> SCHU-S4 genome	With the <i>Francisella</i> -LE of <i>O. moubata</i>
<i>Hyalomma asiaticum</i>	Xjha.180	-	-	-	0,1
	Xjha.179	-	-	-	0,57
	Xjha.178	-	-	-	0,49
	Xjha.177	-	-	-	0,42
	XJHA.503	-	-	-	0,68
	XJHA.502	-	-	-	0,22
	XJHA.501	0,05	-	-	0,04
	XJHA.500	1,38	-	-	0,16
	XJHA.499	12,33	-	-	0,22
	XJHA.498	0,34	-	-	0,17
	XJHA.497	-	-	-	0,09
	XJHA.496	28,67	-	-	0,15
	XJHA.432	-	-	-	0,76
	NMGha.322	-	-	-	0,55
	NMGha.314	-	-	-	0,66
	NMGha.313	-	-	-	0,41
	XJHA.312	-	-	-	0,92
	NMGha.311	-	-	-	1,09
	NMGha.310	-	-	-	0,81
	<i>Rhipicephalus microplus</i>	Ynbm.454	-	0,46	-
Gzbn.458		-	0,51	-	-
HbRm.536		-	0,81	-	-
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	GXR.865	-	0,58	-	-
	GXR.444	-	0,86	-	-
	GXR.837	-	0,72	-	-
<i>Dermacentor silvarum</i>	Sxds.774	-	0,51	-	-
	ShXds.131	-	0,92	-	-
	JLds.763	-	0,26	-	-
	NMGds.52	-	0,15	-	-
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	ZJHI.565	-	0,36	-	-
	JSHI.509	-	0,2	-	-
	HBHI.468	-	0,08	-	-
	SDhl.43	-	0,07	-	-
	LNhl.46	-	0,06	-	-
<i>Ixodes persulcatus</i>	HLJip.809	-	-	-	-
	HLJip.159	-	-	-	-
	HLJip.264	-	-	-	-
	JLlp.591	-	-	-	-
	JLlp.622	-	-	-	-

2 **Table S1. Summary of the mapping results of the examined metagenomes from Jia et al.**
3 **2020 on the *Coxiella* and *Francisella* reference genomes.** Non-specific reads mapping on
4 reference genomes have been discarded.

Specimen details		Assembling informations															
Tick species	Sample reference	From mapped reads on a <i>Coxiella</i> genome								From mapped reads on a <i>Francisella</i> genome							
		Assembling tool	Scaffolds total lenght (bp)	Number of contigs	Genome final lenght (bp)	Number of final contigs	N50	L50	BUSCO completeness (%)	Assembling tool	Scaffolds total lenght (bp)	Number of contigs	Genome final lenght (bp)	Number of final contigs	N50	L50	BUSCO completeness (%)
<i>Hyalomma asiaticum</i>	XJHA.499	SPAdes	2022360	123	2000962	53	74896	11	98,4								
	XJHA.496	SPAdes	2026628	212	2000046	78	46883	15	98,4								
	XJHA.498									SPAdes	2125827	2369	1549389	39	71371	7	98,8
	XJHA.432									SPAdes	1710181	596	1550715	38	71373	7	96,8
	XJHA.312									SPAdes	1625574	311	1546289	35	71689	7	96,8
<i>Rhipicephalus microplus</i>	Ynbm.454	MEGAHIT	1006945	777	815137	355	3751	61	82,3								
	Gzbn.458	MEGAHIT	1101551	972	827666	376	3446	68	84,7								
	HbRm.536	MEGAHIT	1024267	662	888183	387	3818	67	84,7								
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	GXR.865	MEGAHIT	1671476	300	1552452	41	126882	5	91,9								
	GXR.444	MEGAHIT	1662750	298	1544934	34	152631	4	91,9								
	GXR.837	MEGAHIT	1686736	340	1553274	40	126867	5	91,9								
<i>Dermacentor silvarum</i>	Sxds.774	MEGAHIT	721377	574	621376	359	2310	79	74,2								
	ShXds.131	MEGAHIT	710415	567	637024	373	2302	81	74,2								
	JLds.763	MEGAHIT	693432	610	603214	411	2108	85	71,8								
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	ZJHI.565	MEGAHIT	1589832	1160	1435097	759	3133	132	58,9								

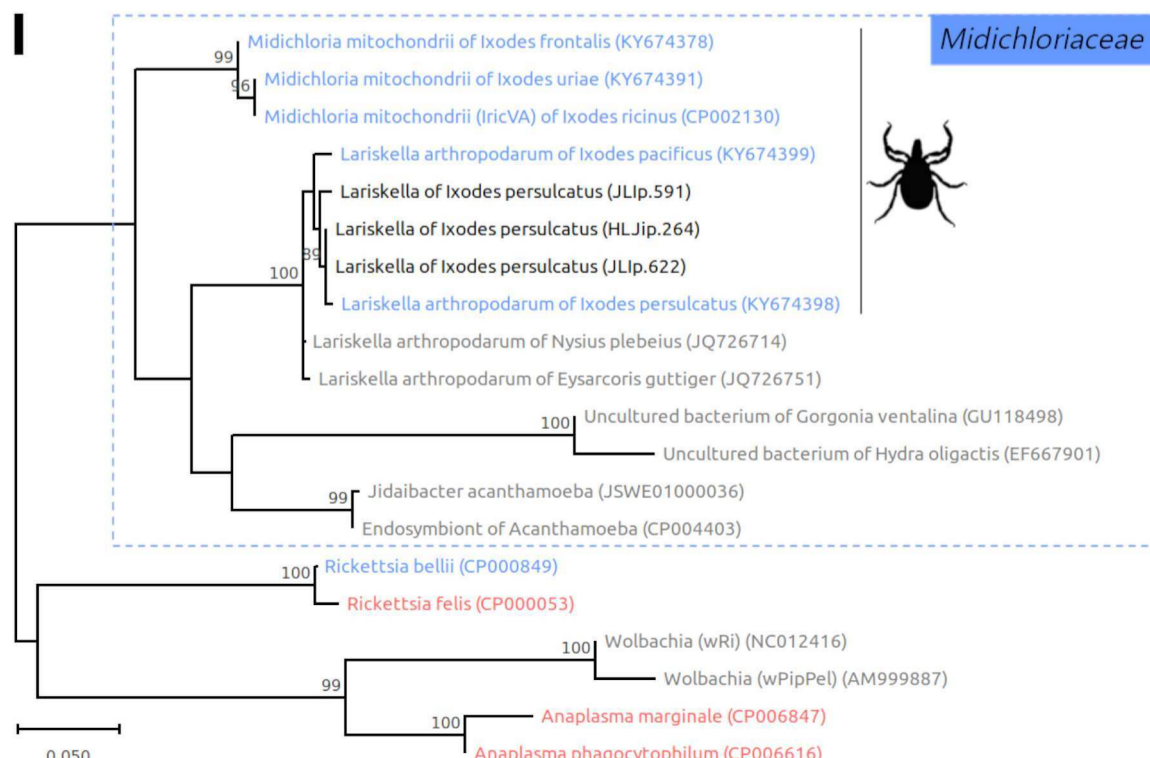
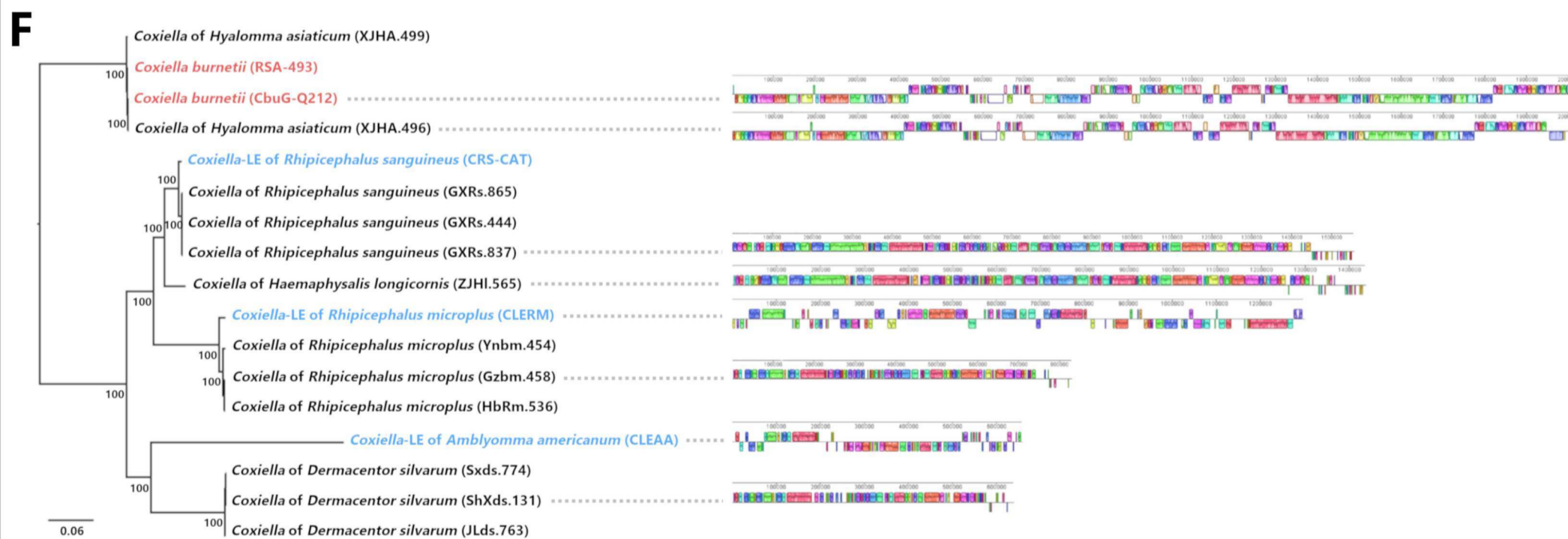
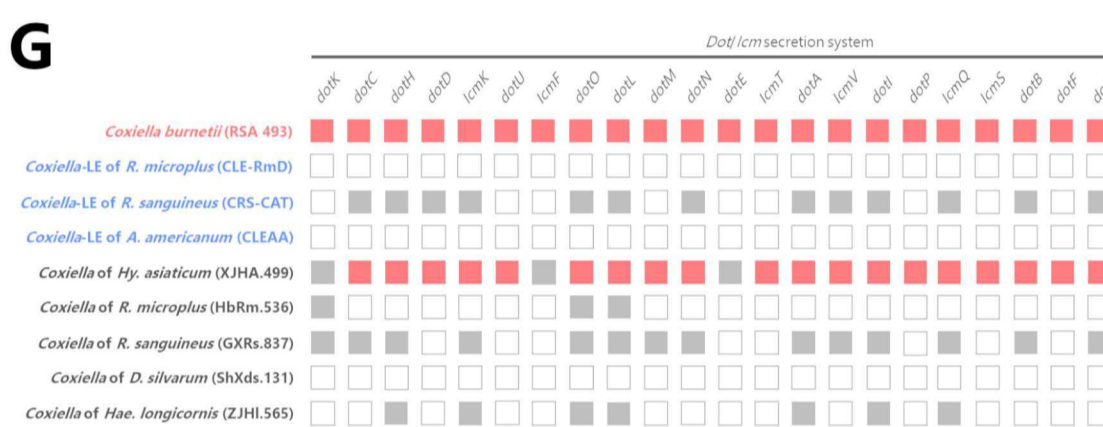
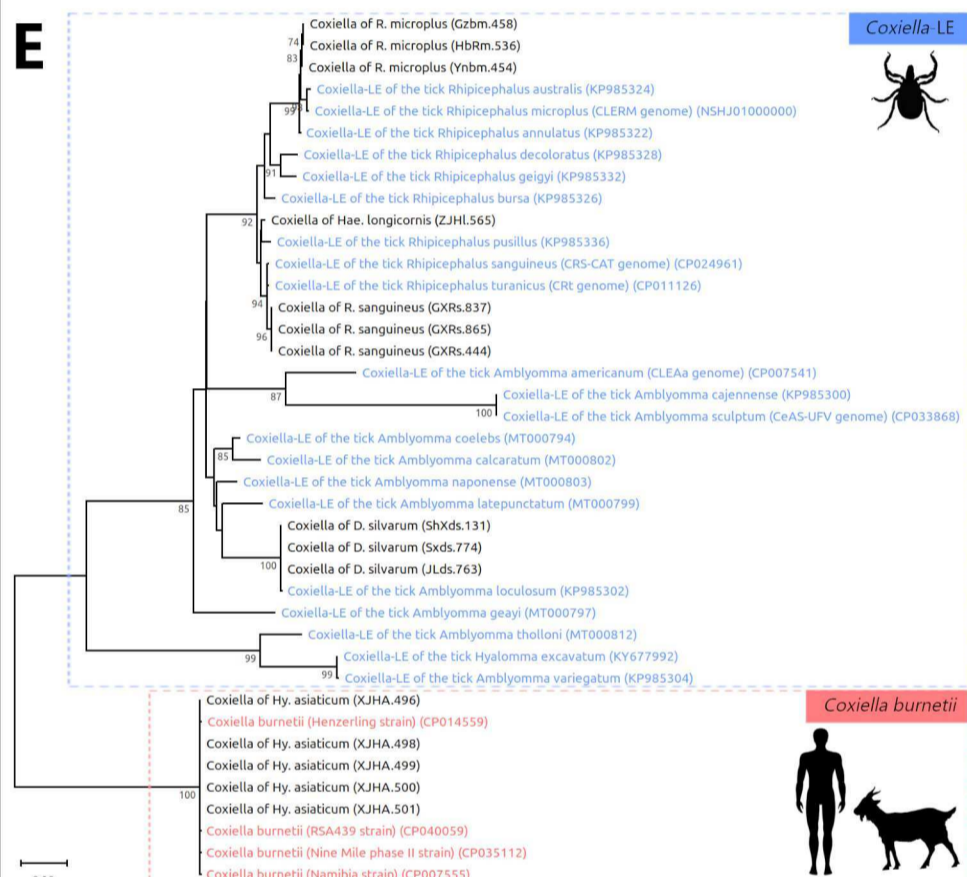
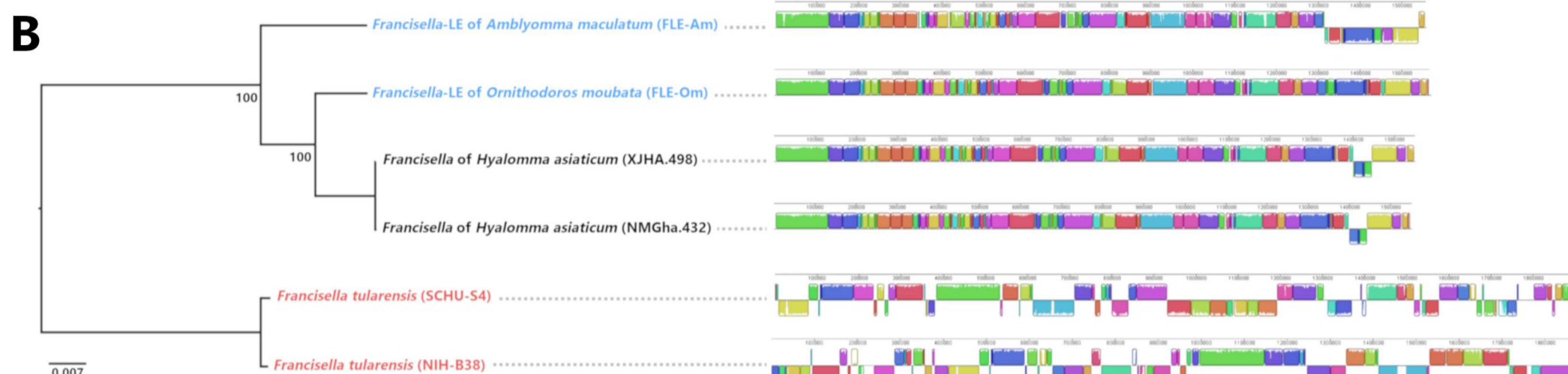
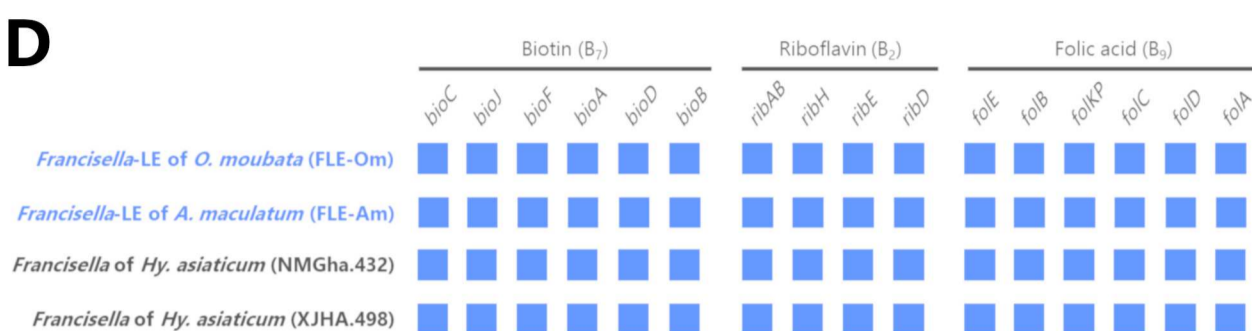
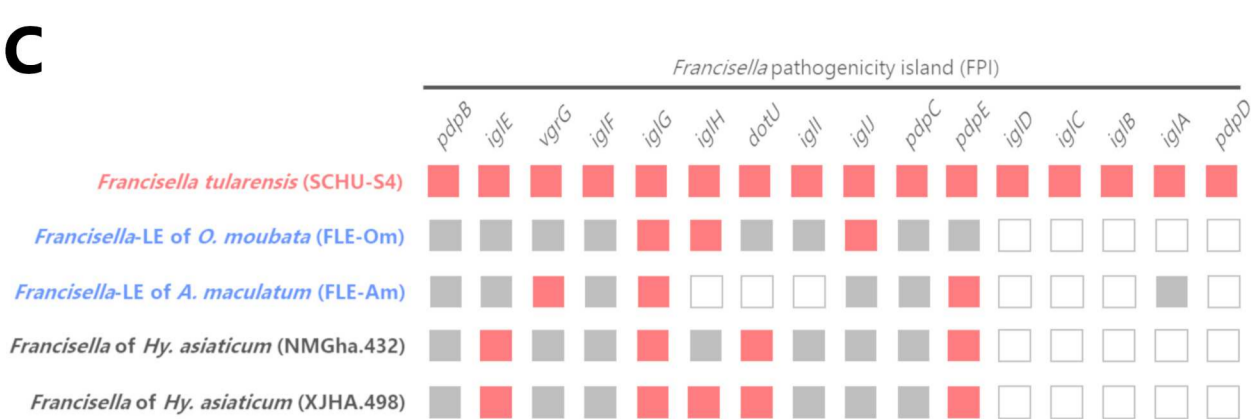
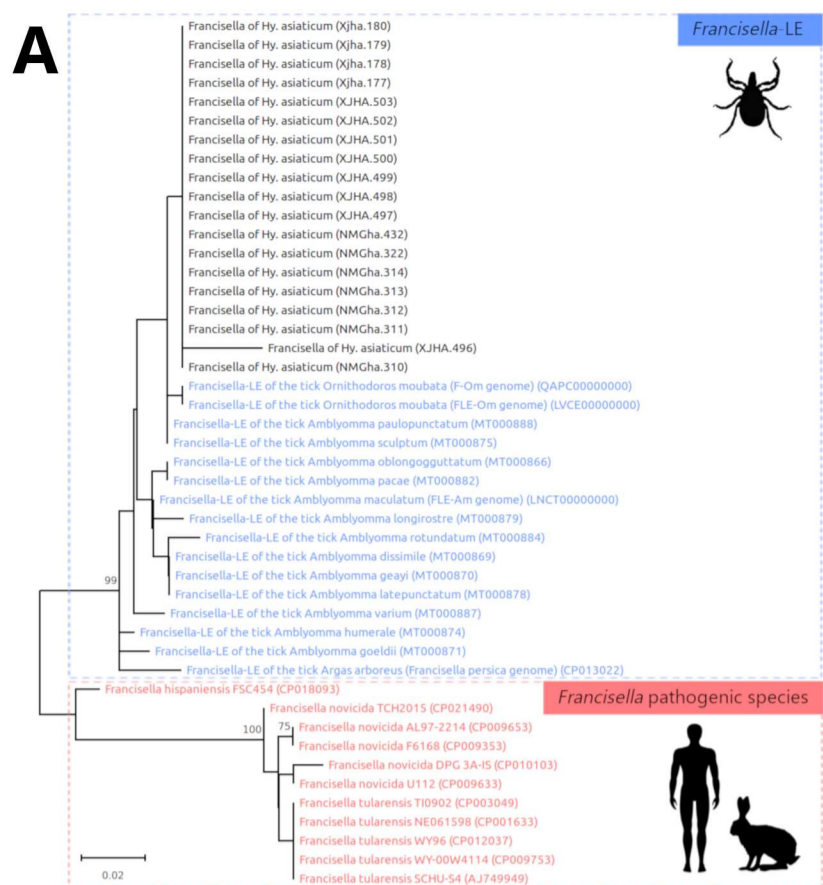
5

6 **Table S2. Summary of the assembly information of the symbiont genomes.** The comparison of the “raw” (in the black font) and “filtered” (in the
7 blue font) assemblies are presented here.

8

Reference genomes				
Specimen	Accession number (NCBI)	Genome final length (bp)	Number of final contigs	Reference
<i>Francisella</i> -LE of <i>Amblyomma maculatum</i> , FLE-Am	LNCT00000000	1556261	7	Gerhart et al., 2016
<i>Francisella</i> -LE of <i>Ornithodoros moubata</i> , FLE-Om	LVCE00000000	1564190	8	Gerhart et al., 2018
<i>Francisella</i> -LE of <i>Ornithodoros moubata</i> , F-Om	QAPC00000000	1566493	11	Duron et al., 2018
<i>Francisella</i> -LE of <i>Argas arboreus</i> , <i>F. persica</i>	CP013022	1540768	1	Suitor and Weiss, 1961
<i>Francisella tularensis</i> , SCHU-S4	NC_006570	1892775	1	Larsson et al., 2005
<i>Francisella tularensis</i> , NIH-B38	CP010115	1862444	1	Johnson et al., 2016
<i>Coxiella</i> -LE of <i>Amblyomma americanum</i> , CLEAA	CP021379	656933	1	Smith et al., 2015
<i>Coxiella</i> -LE of <i>Amblyomma sculptum</i> , CaAS-UFV	CP033868	622921	1	Direct submission
<i>Coxiella</i> -LE of <i>Rhipicephalus microplus</i> , CLE-RmD	DLUJ00000000	1296467	89	Ramaiah and Dasch, 2018
<i>Coxiella</i> -LE of <i>Rhipicephalus microplus</i> , CLERM	NSHJ01000000	1194772	171	Guizzo et al., 2017
<i>Coxiella</i> -LE of <i>Rhipicephalus sanguineus</i> , CRS-CAT	CP024961	1715759	1	Tsmentzi et al., 2018
<i>Coxiella</i> -LE of <i>Rhipicephalus turanicus</i> , CRt	CP011126	1733840	1	Gottlieb et al., 2015
<i>Coxiella burnetii</i> , CbuG-Q212	CP001019	2008870	1	Beare et al., 2009
<i>Coxiella burnetii</i> , RSA 493	AE016828	2032807	2	Seshadri et al., 2003

9 **Table S3. Summary of the information on the NCBI reference genomes used in our**
10 **analyses.**



1 **Figure legend**

2 **Figure S1. Comparative genomic features of bacteria detected in ticks.**

3 (A) Phylogenetic relationship of the *Francisella* characterized in the 19 specimens of *Hy.*
4 *asiaticum* (black), *Francisella*-LE of other tick species (blue) and *Francisella* pathogenic
5 species (red), including *F. tularensis*. The phylogenetic tree was inferred using maximum
6 likelihood from an alignment of *groEL* gene sequences used in the *Francisella*-LE MLST
7 (222 bp unambiguously aligned; best-fit approximation for the evolutionary model: TN93+I).
8 GenBank accession numbers of *Francisella*-LE and *Francisella* pathogenic species
9 sequences, and references of *Hy. asiaticum* specimens used by Jia *et al.* (Jia *et al.*, 2020), are
10 indicated on the tree. The numbers on each node represent the support of 1,000 bootstrap
11 replicates. The scale bar is in units of substitution/site.

12 (B) Whole genome phylogenetic relationship (left) and synteny (right) of two *Francisella*
13 genomes obtained from metagenomes of *Hy. asiaticum*, and representative *Francisella*-LE
14 and *F. tularensis* genomes. The phylogenetic tree was inferred using maximum likelihood
15 from a concatenated alignment of 913 single-copy orthologous genes (258,223 amino acids;
16 best-fit approximation for the evolutionary model: JTT+G4). The numbers on each node
17 represent the support of 1,000 bootstrap replicates. Each contiguously colored locally
18 collinear block (LCB) represents a region without rearrangement of the homologous backbone
19 sequence. LCBs below the center in *Francisella* genomes represent blocks in the reverse
20 orientation. The height of color bars within LCBs corresponds to the average level of
21 similarity (conservation) profile in that region of the genome sequence. Areas that are
22 completely white were not aligned and contain sequence elements specific to a particular
23 genome.

24 (C) Pathogenic features of *Francisella* genomes showing the conservation level of the FPI
25 genes. Red squares, functional genes; grey squares, pseudogenes; white squares, missing
26 genes.

27 (D) Biosynthetic pathways of *Francisella* for the three key B vitamins (biotin, folic acid, and
28 riboflavin) required for tick nutrition. Blue squares, functional genes; grey squares,
29 pseudogenes; white squares, missing genes; *, partial *Francisella* gene sequences that do not
30 contain internal codon stop but that are located at the end of unassembled contigs.

31 (E) Phylogenetic relationship of the *Coxiella* characterized in the metagenomes of *Hy.*
32 *asiaticum*, *Hae. longicornis*, *D. silvarum*, *R. sanguineus* and *R. microplus* specimens (black),
33 *Coxiella*-LE of other tick species (blue) and *C. burnetii* (red). The phylogenetic tree was
34 inferred using maximum likelihood from an alignment of *rpoB* gene sequences used in the
35 *Coxiella* MLST (322 bp unambiguously aligned; best-fit approximation for the evolutionary
36 model: TN93+G). GenBank accession numbers of *Coxiella*-LE and *C. burnetii* sequences,
37 and references of tick specimens used by Jia *et al.* (Jia *et al.*, 2020), are indicated on the tree.
38 The numbers on each node represent the support of 1,000 bootstrap replicates. The scale bar is
39 in units of substitution/site.

40 (F) Whole genome phylogenetic relationship (left) and synteny (right) of some *Coxiella*
41 genomes obtained from tick metagenomes, and representative *Coxiella*-LE and *C. burnetii*
42 genomes. The phylogenetic tree was inferred using maximum likelihood from a concatenated
43 alignment of 246 single-copy orthologous genes (56,731 amino acids; best-fit approximation
44 for the evolutionary model: CPREV+I+G4). The numbers on each node represent the support
45 of 1,000 bootstrap replicates. Each contiguously colored locally collinear block (LCB)
46 represents a region without rearrangement of the homologous backbone sequence. LCBs
47 below the center in *Coxiella* genomes represent blocks in the reverse orientation. The height
48 of color bars within LCBs corresponds to the average level of similarity (conservation) profile
49 in that region of the genome sequence. Areas that are completely white were not aligned and
50 contain sequence elements specific to a particular genome.

51 (G) Pathogenic features of *Coxiella* genomes showing the conservation level of the *Dot/Icm*
52 secretion system genes. Red squares, functional genes; grey squares, pseudogenes; white
53 squares, missing genes.

54 (H) Biosynthetic pathways of *Coxiella* for the three key B vitamins (biotin, folic acid, and
55 riboflavin) required for tick nutrition. Blue squares, functional genes; grey squares,
56 pseudogenes; white squares, missing genes; *, partial *Coxiella* gene sequences that do not
57 contain internal codon stop but that are located at the end of unassembled contigs.

58 (I) Phylogenetic features of the *Lariskella* endosymbionts obtained from metagenomes of
59 *Ixodes persulcatus*. The phylogenetic tree was inferred using maximum likelihood from an
60 alignment of partial 16S rRNA gene sequences (383 bp unambiguously aligned; best-fit
61 approximation for the evolutionary model: GTR+G+I). References of *I. persulcatus*
62 specimens used by Jia *et al.* (Jia *et al.*, 2020), and GenBank accession numbers of other
63 *Lariskella* and Midichloriaceae sequences, including the intra-mitochondrial endosymbiont
64 *Midichloria mitochondrii* of *I. ricinus*, are indicated on the tree. Other Rickettsiales bacteria
65 were shown as outgroups. Black font, *Lariskella* of *I. persulcatus* specimens used by Jia *et al.*
66 (Jia *et al.*, 2020); Blue font, maternally inherited endosymbionts of other tick species; Red
67 font, pathogens of vertebrates; Grey font, endosymbionts of invertebrates or amoebae. The
68 numbers on each node represent the support of 1,000 bootstrap replicates. The scale bar is in
69 units of substitution/site.

70

Chapitre 2

Symbiose nutritionnelle et érosion génomique

Article publié

Titre : A dual endosymbiosis drives nutritional adaptation to hematophagy in the invasive tick *Hyalomma marginatum*

Auteurs : Marie Buysse, Anna Maria Floriano, Yuval Gottlieb, Tiago Nardi, Francesco Comandatore, Emanuela Olivieri, Alessia Giannetto, Ana Palomar, Ben Makepeace, Chiara Bazzocchi, Alessandra Cafiso, Davide Sassera and Olivier Duron

Journal et année : eLife 10, 2021

Les co-infections sont fréquentes chez les tiques. La plupart des individus s'infectant avec un agent pathogène de vertébrés à la suite d'un repas sanguin portent déjà un endosymbiote obligatoire nutritionnel, issus de transmission transovarienne depuis la mère. De plus, des individus peuvent être infectés par plusieurs agents pathogènes. L'étude de Moutailler et al. (2016) rapporte par exemple que chez *Ixodes ricinus*, une des espèces vectrices d'agents pathogènes majeurs en Europe, près de 40% des individus testés présentaient une triple infection parmi la diversité d'agents pathogènes et mutualistes recherchés. Si beaucoup d'études corrélatives se basant sur l'occurrence de ces symbiotes recherchent des associations d'exclusion ou de coopération, il est plus compliqué d'établir finement la véracité de ces associations et leur potentielle nature fonctionnelle. Plusieurs études ont cependant démontré ces interactions, mais souvent entre des membres microbiens aux rôles fonctionnels et/ou stratégies évolutives différentes. Néanmoins, des co-infections impliquant deux endosymbiotes mutualistes nutritionnels, dont des souches sont considérées obligatoires chez plusieurs espèces de tiques,

sont également rapportées, au niveau de l'espèce et au sein d'individus (Duron et al., 2017b; Zhang and Liu, 2019). Des co-infections sont par exemple régulièrement répertoriées chez le genre de tiques dures *Hyalomma*, entre les symbiotes *Francisella*-LE et *Midichloria*. Chez d'autres espèces d'arthropodes, ces observations peuvent être la preuve d'une implication des deux dans la symbiose nutritionnelle chez leur hôte, souvent à cause d'une perte fonctionnelle chez l'un d'entre eux par érosion génomique. Dans le cadre de cette étude, nous avons étudié l'espèce *H. marginatum*, dont des individus présentent des co-infections entre ces deux symbiotes. Chez chacun d'eux, nous avons recherché des potentiels facteurs génomiques qui expliqueraient cette co-infection.

Nous avons reconstitué les génomes de *Francisella*-LE et *Midichloria* à partir de trois métagénomes distincts provenant d'individus de trois régions du pourtour méditerranéen (Italie, Espagne et Israël). Nous avons d'abord comparé les génomes nouvellement assemblés avec ceux précédemment décrits chez d'autres espèces de tiques. Ensuite, dans ces six génomes, nous avons cherché à définir la complétude des voies de biosynthèse de trois vitamines B considérées comme essentielles pour le développement des tiques : la biotine (B₇), l'acide folique (B₉) et la riboflavine (B₂). Nos analyses ont démontré que les trois génomes des *Francisella*-LE de *H. marginatum* présentaient un taux supérieur de pseudogénération par rapport aux autres génomes de référence, un facteur qui se traduit notamment par la pseudogénération (et l'absence) de plusieurs gènes impliqués dans la synthèse de biotine. Les voies de l'acide folique et de la riboflavine étaient, elles, complètes. Les génomes de *Midichloria* possédaient eux la voie complète de la biotine, mais pas celle de la riboflavine. La co-infection entre ces deux endosymbiotes nutritionnels préviendrait alors « l'effondrement » de la symbiose nutritionnelle chez cette espèce de tique, créant un système symbiotique reposant sur trois partenaires. Enfin, en étudiant l'origine de la voie métabolique de la biotine chez *Midichloria*, nous avons identifié que son origine chez ce genre proviendrait d'un ancien transfert de gènes entre deux bactéries intracellulaires. Ce transfert aurait notamment pu être facilité par la structure compactée de ces gènes formant un opéron de

moins de 7kb, retrouvée chez d'autres intracellulaires associées à différents phénotypes (agents pathogènes, mutualistes obligatoires et facultatifs).

Ces différents résultats supportent plusieurs précédentes observations. Tout d'abord, ils mettent en évidence que l'érosion génomique est à l'œuvre chez les endosymbiotes nutritionnels des tiques et que ce phénomène peut conduire à la perte de fonctions essentielles dans le cadre de leur symbiose avec leurs hôtes. Contrairement aux autres génomes d'endosymbiotes obligatoires de tiques disponibles, seuls ceux des *Francisella*-LE chez *H. marginatum* sont dépourvus de la voie de biosynthèse de la biotine. D'autre part, l'origine de l'opéron biotine chez le genre *Mitochondria* soulignerait l'importance des interactions microbiennes dans l'évolution des symbioses nutritionnelles chez les tiques. Enfin, ce système de co-infection a été décrit dans plusieurs localités provenant de plusieurs pays à travers le bassin méditerranéen. Quelle serait la chronologie derrière ce système ? Quelle est la succession des événements, quelles pressions ont pu être à l'œuvre derrière la mise en place de ce système tripartite ?

A dual endosymbiosis supports nutritional adaptation to hematophagy in the invasive tick *Hyalomma marginatum*

Marie Buysse^{1,2*†}, Anna Maria Floriano^{3,4†}, Yuval Gottlieb⁵, Tiago Nardi³, Francesco Comandatore⁶, Emanuela Olivieri³, Alessia Giannetto⁷, Ana M Palomar⁸, Benjamin L Makepeace⁹, Chiara Bazzocchi¹⁰, Alessandra Cafiso¹⁰, Davide Sasserà^{3‡}, Olivier Duron^{1,2‡}

¹MIVEGEC (Maladies Infectieuses et Vecteurs : Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle), Univ. Montpellier (UM) - Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) - Institut pour la Recherche et le Développement (IRD), Montpellier, France;

²Centre of Research in Ecology and Evolution of Diseases (CREES), Montpellier, France, Montpellier, France; ³Department of Biology and Biotechnology "L. Spallanzani", University of Pavia, Pavia, Italy; ⁴Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic; ⁵Koret School of Veterinary Medicine, The Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel; ⁶Department of Biomedical and Clinical Sciences L. Sacco and Pediatric Clinical Research Center, University of Milan, Milan, Italy; ⁷Department of Chemical, Biological, Pharmaceutical and Environmental Sciences, University of Messina, Messina, Italy; ⁸Center of Rickettsiosis and Arthropod-Borne Diseases (CRETAV), San Pedro University Hospital- Center of Biomedical Research from La Rioja (CIBIR), Logroño, Spain; ⁹Institute of Infection, Veterinary & Ecological Sciences, University of Liverpool, Liverpool, United Kingdom; ¹⁰Department of Veterinary Medicine, University of Milan, Lodi, Italy

¹⁰Department of Veterinary Medicine, University of Milan, Lodi, Italy

¹⁰Department of Veterinary Medicine, University of Milan, Lodi, Italy

*For correspondence: marie.buysse@ird.fr

†These authors contributed equally to this work

‡These authors also contributed equally to this work

Competing interest: The authors declare that no competing interests exist.

Funding: See page 15

Received: 03 August 2021

Accepted: 14 December 2021

Published: 24 December 2021

Reviewing Editor: Bruno Lemaître, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Switzerland

© Copyright Buysse et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Abstract Many animals are dependent on microbial partners that provide essential nutrients lacking from their diet. Ticks, whose diet consists exclusively on vertebrate blood, rely on maternally inherited bacterial symbionts to supply B vitamins. While previously studied tick species consistently harbor a single lineage of those nutritional symbionts, we evidence here that the invasive tick *Hyalomma marginatum* harbors a unique dual-partner nutritional system between an ancestral symbiont, *Francisella*, and a more recently acquired symbiont, *Midichloria*. Using metagenomics, we show that *Francisella* exhibits extensive genome erosion that endangers the nutritional symbiotic interactions. Its genome includes folate and riboflavin biosynthesis pathways but deprived functional biotin biosynthesis on account of massive pseudogenization. Co-symbiosis compensates this deficiency since the *Midichloria* genome encompasses an intact biotin operon, which was primarily acquired via lateral gene transfer from unrelated intracellular bacteria commonly infecting arthropods. Thus, in *H. marginatum*, a mosaic of co-evolved symbionts incorporating gene combinations of distant phylogenetic origins emerged to prevent the collapse of an ancestral nutritional symbiosis. Such dual endosymbiosis was never reported in other blood feeders but was recently documented in agricultural pests feeding on plant sap, suggesting that it may be a key mechanism for advanced adaptation of arthropods to specialized diets.

Editor's evaluation

This manuscript analyses endosymbionts harbored by field collected ticks in Spain, Italy and Israel. Using metagenomics, the authors infer the evolutionary history of a newly discovered tripartite interaction between *Hyalomma marginatum* (tick), *Francisella*-like endosymbiont (FLE) (ancestral co-obligate endosymbiont) and a *Midichloria* symbiont (more recent co-obligate endosymbiont). This is the first description of such co-obligate symbiotic association in ticks, which usually harbor only one obligate endosymbiont.

Introduction

Ticks evolved to hematophagy through the acquisition of key genomic adaptations (**Gulia-Nuss, 2016; Jia et al., 2020**) and the evolution of mutualistic interactions with microbial symbionts (**Buyse and Duron, 2021; Duron and Gottlieb, 2020**). Ticks rely on vertebrate blood as their sole food source throughout their development, although it is nutritionally unbalanced. Blood contains high levels of proteins, iron, and salts, but low levels of carbohydrates, lipids, and vitamins. To overcome these dietary challenges, tick genomes present large repertoires of genes related to vitamin and lipid shortages, iron management, and osmotic homeostasis (**Gulia-Nuss, 2016; Jia et al., 2020**). Yet, tick genomes do not contain genes for synthesis of some essential vitamins, thus, vitamin-provisioning pathways have indirectly arisen from symbiotic associations with transovarially transmitted intracellular bacteria (**Ben-Yosef et al., 2020; Duron et al., 2018; Duron and Gottlieb, 2020; Gerhart et al., 2016; Gottlieb et al., 2015; Guizzo et al., 2017; Smith et al., 2015**). This partnership allowed the long-term acquisition of heritable biochemical functions by ticks and favored their radiation into the nearly 900 tick species that currently exist (**Duron and Gottlieb, 2020**). This co-evolutionary process is reflected by microbial communities dominated by tick nutritional symbionts (**Bonnet and Pollet, 2021; Narasimhan and Fikrig, 2015**).

Most tick species typically harbor a single lineage of nutritional symbiont, but multiple symbiont lineages exist in different tick species (**Duron and Gottlieb, 2020**). The most common lineages belong to the *Coxiella*-like endosymbiont group and to the *Francisella*-like endosymbiont group (CLE and FLE, hereafter) (**Azagi et al., 2017; Binetruy et al., 2020; Duron et al., 2017; Machado-Ferreira et al., 2016**), but a few tick species may rely on other symbionts (**Duron et al., 2017**), such as the *Rickettsia*-like endosymbionts (**Narasimhan et al., 2021**) and the intramitochondrial bacterium *Midichloria* (**Sassera et al., 2006**). Once deprived of their nutritional symbionts, ticks show a complete stop of growth and moulting, as well as lethal physical abnormalities (**Ben-Yosef et al., 2020; Duron et al., 2018; Guizzo et al., 2017; Zhong et al., 2007**), which can be fully restored with an artificial supplement of B vitamins (**Duron et al., 2018**). Nutritional symbionts of ticks exhibit a high degree of lifestyle specialization toward mutualism. They have been found primarily in two tick organs, the ovaries and Malpighian tubules, while other organs have only been found sporadically infected (**Buyse et al., 2019; Duron and Gottlieb, 2020**). Ovary infection is consistent with vertical transmission of nutritional symbionts in developing oocytes. A high density of nutritional symbionts in Malpighian tubules supports a nutritional role for these symbionts, as Malpighian tubules are involved in excretion and osmoregulation. A likely hypothesis is that nutritional symbionts use tick hemolymph compounds to synthesize de novo B vitamins (**Duron and Gottlieb, 2020**).

Genomes of CLE and FLE consistently contain complete biosynthesis pathways of the same three B vitamins: biotin (vitamin B₇), riboflavin (B₂), and folate (B₉) (**Duron et al., 2018; Gerhart et al., 2018; Gerhart et al., 2016; Gottlieb et al., 2015; Guizzo et al., 2017; Nardi et al., 2021; Smith et al., 2015**). These three pathways form a set of core symbiotic genes essential for ticks (**Duron and Gottlieb, 2020**) while other functions are disposable. As such, the genomes of CLE, FLE, and *Midichloria* underwent massive reduction as observed in other nutritional endosymbionts of arthropods with a specialized diet (**Duron et al., 2018; Gerhart et al., 2018; Gerhart et al., 2016; Gottlieb et al., 2015; Nardi et al., 2021; Sassera et al., 2011; Smith et al., 2015**). This reduction process is primarily initiated as a consequence of relaxed selection on multiple genes which are not essential within the host stable and nutrient-rich cellular environment (**Bennett and Moran, 2015; McCutcheon et al., 2019**). Over time, genes encoding for functions such as motility, regulation, secondary-metabolite biosynthesis, and defense are pseudogenized and then definitively jettisoned (**Bennett and Moran, 2015; McCutcheon et al., 2019**).

Coevolution of hosts and their nutritional symbionts over millions of years is expected to result in stable co-cladogenesis (Bennett and Moran, 2015). However, in sap-feeding insects where symbionts compensate for nutritional deficiencies of the sap diet, cases of unstable interactions have been observed (Bennett and Moran, 2015; McCutcheon et al., 2019). Indeed, as the symbiont genome decays, repair mechanisms can be lost, leading to faster pseudogenization, which can affect genes in all functional categories including those involved in nutritional supplementation (Bennett and Moran, 2015; McCutcheon et al., 2019). This may ultimately lead to overly reduced and maladapted genomes, limiting beneficial contributions to hosts and opening the road to wholesale replacement by new symbiont(s) (Bennett and Moran, 2015; McCutcheon et al., 2019; Sudakaran et al., 2017). This degeneration–replacement model has been proposed in sap-feeding insects (Campbell et al., 2015; Lukasik et al., 2018; Manzano-Marin et al., 2020; Matsuura et al., 2018), but is difficult to document as such replacements are expected to be transient (McCutcheon et al., 2019). In parallel, other forms of multi-partite interactions have been reported, where a novel bacterium with similar function to a pre-existing symbiont enters a bipartite system (Husnik and McCutcheon, 2016; Santos-Garcia et al., 2018; Takeshita et al., 2019). This can lead to relaxation of conservative selection pressure on the original symbionts, which can lose genes that were previously fundamental, ultimately leading to a tripartite stable symbiosis (Husnik and McCutcheon, 2016; Takeshita et al., 2019).

In this study, we document a complex nutritional endosymbiosis in the invasive bont-legged tick *Hyalomma marginatum* characterized by a maladapted ancestral symbiont genome compensated by gene functions of a more recently acquired symbiont. This large tick species usually feeds on humans and a diversity of mammals and birds in the Mediterranean climatic zone but has recently expanded its range to the north, invading Western Europe (Vial et al., 2016). *Hyalomma marginatum* can transmit Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, an emerging disease affecting humans in the northern Mediterranean Basin, as well as protozoan parasites and intracellular bacterial pathogens such as *Rickettsia aeschlimannii* (Vial et al., 2016). Previous studies detected the presence of diverse highly prevalent bacterial symbionts across *H. marginatum* populations (Di Lecce et al., 2018), but their contribution to tick nutrition was not studied. A previous study showed that high densities of FLE can be observed in Malpighian tubules and ovaries of *H. marginatum*, while infections in other organs are scattered (Azagi et al., 2017). Here, we sequenced three microbial metagenomes of *H. marginatum* in three distinct locations, and determined the nutritional interactions in this unique symbiosis system.

Results

Microbial metagenomes

We sequenced three microbial metagenomes from *H. marginatum* specimens collected in Spain (i.e., the Hmar-ES metagenome), Italy (Hmar-IT), and Israel (Hmar-IL). We obtained 57,592,510 paired-end reads from the Hmar-ES metagenome, 68,515,944 paired-end reads from Hmar-IT, and 10,807,740 paired-end reads from Hmar-IL. We assembled one FLE genome with >99% estimated completeness from each metagenome (FLE-Hmar-ES, FLE-Hmar-IT, and FLE-Hmar-IL; also designated as FLE-Hmar genomes; **Supplementary file 1a**). In parallel, we assembled one genome with >95% estimated completeness from each metagenome for the bacterium *Midichloria*, and thus obtained three additional complete genomes (Midi-Hmar-ES, Midi-Hmar-IT, and Midi-Hmar-IL; also designated as Midi-Hmar genomes; **Supplementary file 1a**). In addition, we detected a third bacterium, the tick-borne pathogen *R. aeschlimannii*, in the Hmar-IT and Hmar-IL, but not Hmar-ES, metagenomes, and further assembled one genome with 94% estimated completeness (RAES-Hmar-IT) and one partial (RAES-Hmar-IL) genome (**Supplementary file 1a; Figure 1**).

The assemblies of the three FLE draft genomes (13 contigs for FLE Hmar-IT, 17 for FLE Hmar-ES, and 25 FLE Hmar-IL) were very similar in size (1.51–1.536 Mb), average G+C content (31.11–31.23%), number of predicted protein-coding genes (937–961), and protein-coding sequences with inactivating mutations (pseudogenes, 789–798), no prophages, and two identical insertion sequences (**Supplementary file 1a**). Phylogenomic analysis based on 436 single-copy orthologs (SCOs) *Francisella* genes showed that FLE-Hmar-ES, FLE-Hmar-IT, and FLE-Hmar-IL cluster together in a robust clade within other FLE of ticks (**Figure 2A**). The closest relative of this clade is the FLE of another *Hyalomma* species, *Hyalomma asiaticum* from China, while FLEs of other tick genera (*Ornithodoros*, *Argas*, and *Amblyomma*) are more distantly related. The FLE clade is embedded

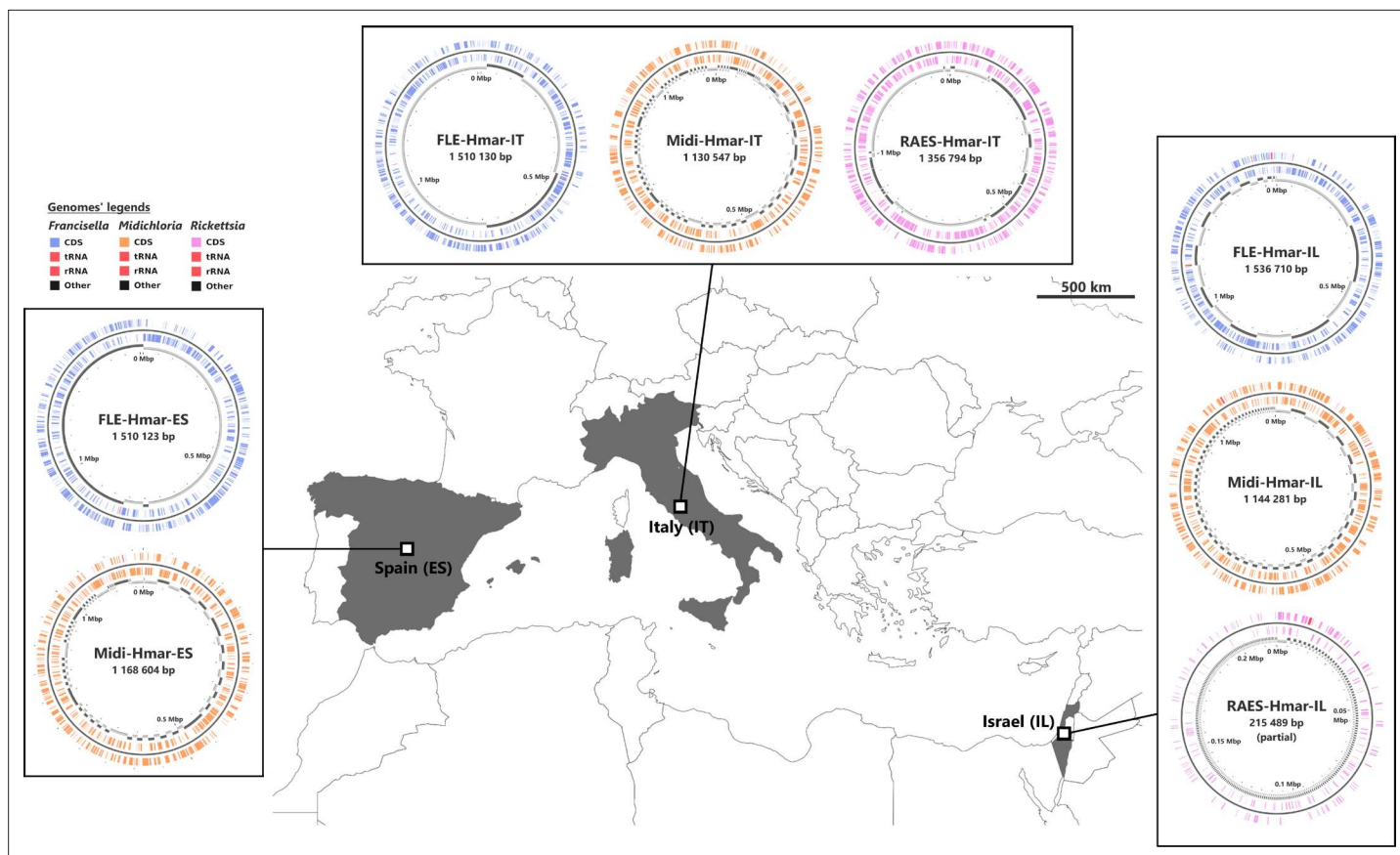


Figure 1. Sampled locations for *Hyalomma marginatum* ticks. Sampling countries are colored in gray. The symbiont genomes retrieved from each site are graphically represented in blue, orange, and pink, corresponding to *Francisella*-LE (FLE), *Midichloria* (Midi), and *R. aeschlimannii* (RAES), respectively. Circles on genome maps correspond to the following: (1) forward strand genes; (2) reverse strand genes; (3) in gray and black, contigs. Circular maps of the genomes were produced using CGView.

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 1:

Figure supplement 1. *Rickettsia* phylogenetic tree assessing the affiliation of the *Rickettsia* detected in *Hyalomma marginatum* specimens from Italy and Israel.

Figure supplement 2. Phylogenetic relationship of the *Hyalomma* species used in our study.

Figure supplement 3. Presence of FLE and *Midichloria* within the *Hyalomma* genus.

in the *Francisella* genus and shares a common origin with pathogenic species, including the tularia agent, *F. tularensis*, and an opportunistic human pathogen, *F. opportunistica* (**Figure 2A**). The FLE-Hmar genomes are similar in organization and content overall, apart from a 127,168 bp inversion in FLE-Hmar-ES and a 4165 bp inversion in FLE-Hmar-IL (**Figure 2B**). Compared to other FLE genomes (i.e., FLEOm and FLEAm), they are slightly reduced in size and exhibit substantial rearrangements (**Figure 2B, Supplementary file 1a and b**). Based on gene orthologs, the core-genome of these FLE shares 743 genes, while the core genome of the FLE of *H. marginatum* contains 796 genes because the FLE-Hmar genomes share 53 genes that are not present in other FLE genomes (**Figure 2C**). Interestingly, pseudogenes are highly abundant in the three genomes of FLE of *H. marginatum*, compared with other FLE genomes (**Figure 2D**), and most functional categories are impacted by this advanced pseudogenization process. Most of the genes associated with virulence in pathogenic *Francisella* species, including the *Francisella* pathogenicity island (FPI) and secretion system, are pseudogenized or completely missing in FLE-Hmar genomes, consistent with previous observations in other FLEs (**Figure 4—figure supplement 1**). Furthermore, FLE-Hmar genomes contain fewer genes involved in replication, recombination, and repair than any other FLEs analyzed (**Figure 2C**). The nucleotide excision repair system (*uvrABCD*) in FLE-Hmar genomes is conserved; however, the DNA mismatch repair system (*mutSL*) is fully pseudogenized.

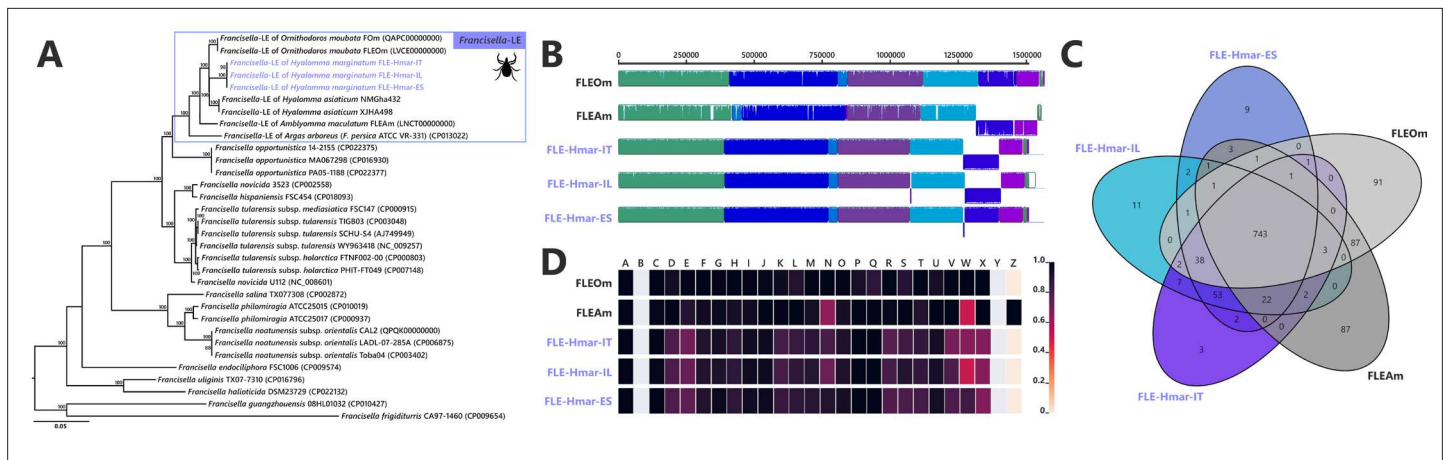


Figure 2. Comparative genomic features of FLE. **(A)** Whole-genome phylogenetic relationship of the three FLE genomes obtained from *Hyalomma marginatum* specimens (highlighted), FLE of other tick species, and *Francisella* pathogenic species, including *F. tularensis*. The phylogenetic tree was inferred using maximum likelihood from a concatenated alignment of 436 single-copy orthologs genes (132,718 amino acids; best-fit approximation for the evolutionary model: CPREV+G4+I). The numbers on each node represent the support of 1000 bootstrap replicates; only bootstrap values >70% are shown. The scale bar is in units of substitution/site. Sequences from newly sequenced FLE genomes are indicated by a blue font. **(B)** Whole-genome synteny of the three FLE genomes obtained from *H. marginatum* specimens (blue font) and representative FLE (black font). Each contiguously colored locally collinear block (LCB) represents a region without rearrangement of the homologous backbone sequence. LCBs below the center in *Francisella* genomes represent blocks in the reverse orientation. The height of color bars within LCBs corresponds to the average level of similarity (conservation) profile in that region of the genome sequence. Areas that are completely white were not aligned and contained sequence elements specific to a particular genome. **(C)** Venn diagram representing orthologous groups distribution between the three FLE genomes obtained from *H. marginatum* specimens (blue font) and representative FLE (black font). **(D)** Clusters of orthologous groups of proteins (COGs) comparisons between the three FLE genomes obtained from *H. marginatum* specimens (blue font) and representative FLE (black font). The color scale indicates the percentage of functional genes per category. Gray color means that genes are not present in a given category. The COG category names (capital letters from A to Z) correspond to the NCBI reference naming system.

In other FLEs, these systems are conserved, with the exception of the *mutSL* system in the FLE of *Ornithodoros moubata* and *H. asiaticum* genomes (**Figure 4—figure supplement 2**).

The *Midichloria* genomes, Midi-Hmar-ES, Midi-Hmar-IT, and Midi-Hmar-IL, were assembled in 179, 359, and 123 contigs, respectively, and their genomes reach 1.13–1.16 Mb, with consistent G+C content (35.03–35.23%), number of predicted protein-coding genes (1032–1071), pseudogenes (190–192), no prophages, and between three and 10 insertion sequences (**Supplementary file 1a**). Remarkably, their average coding density (76%) is higher than those of FLEs of *H. marginatum* (54%), and furthermore, those of other FLE representatives (range from 57% to 69%). Phylogenomic analysis based on 242 SCOs *Rickettsiales* genes shows that Midi-Hmar-ES, Midi-Hmar-IT, and Midi-Hmar-IL cluster in a highly supported monophyletic sister group of the single other sequenced *Midichloria* genome, *Candidatus M. mitochondrii* strain IricVA (*M. mitochondrii* hereafter), the intra-mitochondrial endosymbiont of the European sheep tick, *Ixodes ricinus*. Altogether, they delineate a monophyletic clade within the *Midichloriaceae* family (**Figure 3A**). The high number of Midi-Hmar contigs precluded comparison of their genome structures. However, gene contents of the Midi-Hmar genomes are highly similar, differing substantially from *M. mitochondrii* (**Supplementary file 1a and b**). Based on gene orthologs, the pan-genome of *Midichloria* shared 745 genes, and Midi-Hmar genomes shared 181 genes that are not present in *M. mitochondrii* (**Figure 3B**). Pseudogenization only impacted a few functional categories (e.g., genes of chromatin structure and dynamics [category B] and genes of the mobilome [prophages and transposons, category X]), across Midi-Hmar genomes (**Figure 3C**). By contrast to FLE genomes, the DNA mismatch repair system (*mutSL*) and the nucleotide excision repair (*uvrABCD*) are not pseudogenized in Midi-Hmar genomes and are thus potentially functional (**Figure 4—figure supplement 2**).

In two metagenomes, we also detected contigs belonging to *R. aeschlimannii*. We recovered one possibly complete chromosome (1.35 Mb for 165 contigs, with 1122 genes, 475 pseudogenes, and 32.32% G+C content) for RAES-Hmar-IT (**Supplementary file 1a**), whereas for RAES-Hmar-IL only a partial genome (0.215 Mb) was obtained. No *Rickettsia* reads were detected in the Hmar-ES

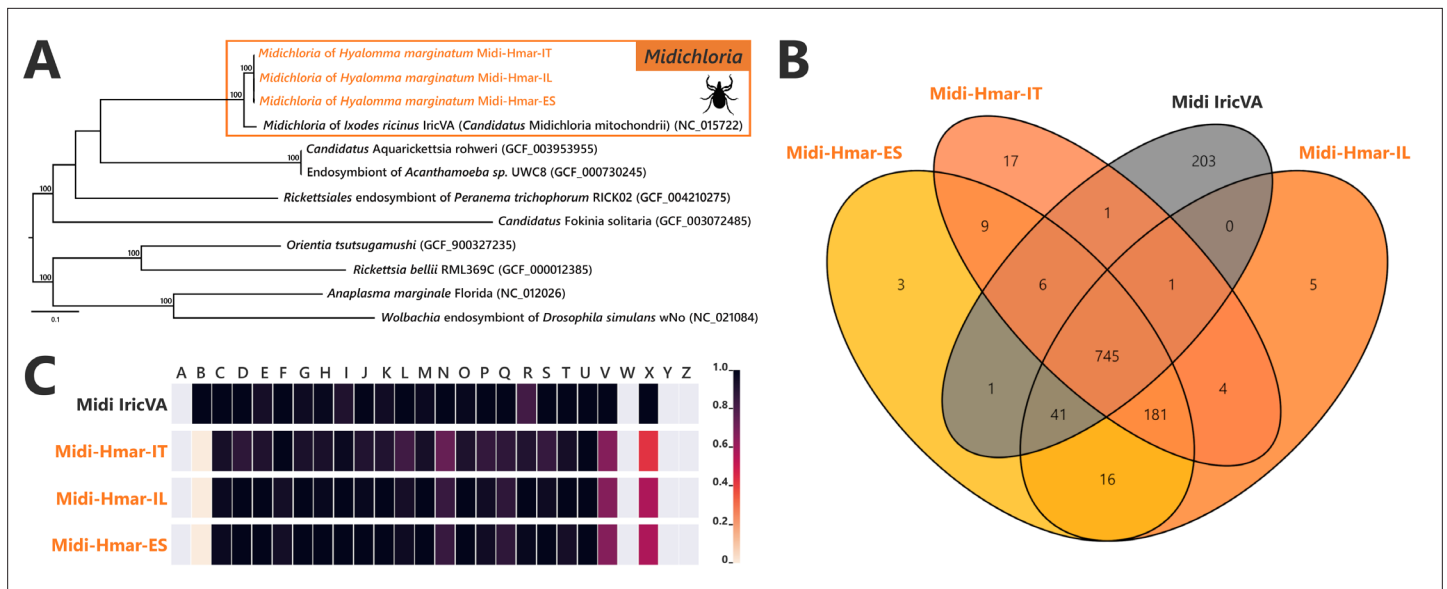


Figure 3. Comparative genomic features of *Midichloria*. **(A)** Whole-genome phylogenetic relationship of the three *Midichloria* genomes obtained from *Hyalomma marginatum* specimens (highlighted), 'Ca M. mitochondrii', and other Rickettsiales species. The phylogenetic tree was inferred using maximum likelihood from a concatenated alignment of 242 single-copy orthologs genes (49,957 amino acids; best-fit approximation for the evolutionary model: LG+G4+I). The numbers on each node represent the support of 1000 bootstrap replicates; only bootstrap values >70% are shown. The scale bar is in units of substitution/site. Sequences from newly sequenced *Midichloria* genomes are indicated by an orange font. **(B)** Venn diagram representing orthologs distribution between the three *Midichloria* genomes obtained from *H. marginatum* specimens (orange font) and 'Ca. M. mitochondrii' (black font). **(C)** Clusters of orthologous groups of proteins (COGs) comparisons between the three *Midichloria* genomes obtained from *H. marginatum* specimens (orange font) and 'Ca. M. mitochondrii' (black font). The color scale indicates the percentage of functional genes per category. Gray color means that genes are not present in a given category. The COG category names (capital letters from A to Z) correspond to the NCBI reference naming system.

metagenome. This may be due to the absence of the bacterium in the Hmar-ES microbiome, or, possibly, to experimental artifact. This metagenome was obtained by sequencing DNA extracted from the dissected ovaries of 10 females, whereas the Hmar-IT metagenome was sequenced from DNA extracted from a whole female, suggesting that *Rickettsia* may be absent or at low density in tick ovaries. This pattern of tissue localization may be corroborated by the Hmar-IL metagenome, sequenced from a pool of dissected ovaries of 10 ticks, but for which we obtained only a few *Rickettsia* reads. This reflects either the absence of *Rickettsia* in the dissected ticks (*R. aeschlimannii* usually reaches low-to-medium prevalence in field populations of *H. marginatum*; Azagi et al., 2017), or a lower abundance of *Rickettsia* in ovaries. Phylogenetic analysis based on 324 SCOs genes present in *Rickettsia* genomes showed that RAES-Hmar-IT clusters with the tick-associated human pathogen *R. aeschlimannii* (including the strain MC16 previously isolated from *H. marginatum*) and altogether delineate a robust clade with the Spotted Fever *Rickettsia* group (Figure 1—figure supplement 1). Overall, the low abundance of *Rickettsia* in the Hmar-IL metagenome (8× average genome coverage), its absence in the Hmar-ES metagenome, as well as the genetic proximity with *R. aeschlimannii*, are all indicative of a tick-borne pathogen, rather than a nutritional endosymbiont.

Complementation in nutritional endosymbiosis

While all previously sequenced FLE genomes contain complete pathways for biotin, riboflavin, and folate, the FLE-Hmar genomes only retain intact pathways for riboflavin and folate (Figure 4A). The biosynthesis pathway for biotin is non-functional, as from six genes of the complete pathway, five (*bioA*, *bioD*, *bioC*, *bioF*, and *bioB*) are pseudogenized in the FLE-Hmar genomes (only *bioH* is not pseudogenized; Figure 4A). Pseudogenization is due to indels or mutations that induce premature codon stops interrupting the coding sequences, indicating that FLE-Hmar cannot produce biotin (Figure 4—figure supplement 3). While *bioA*, *bioD*, *bioC*, and *bioF* contains multiple indels or mutations (introducing premature stop codon, or missing start codon), *bioB* shows a low level of pseudogenization with a unique indel. A stop codon comes from a reading frame shift due to the insertion

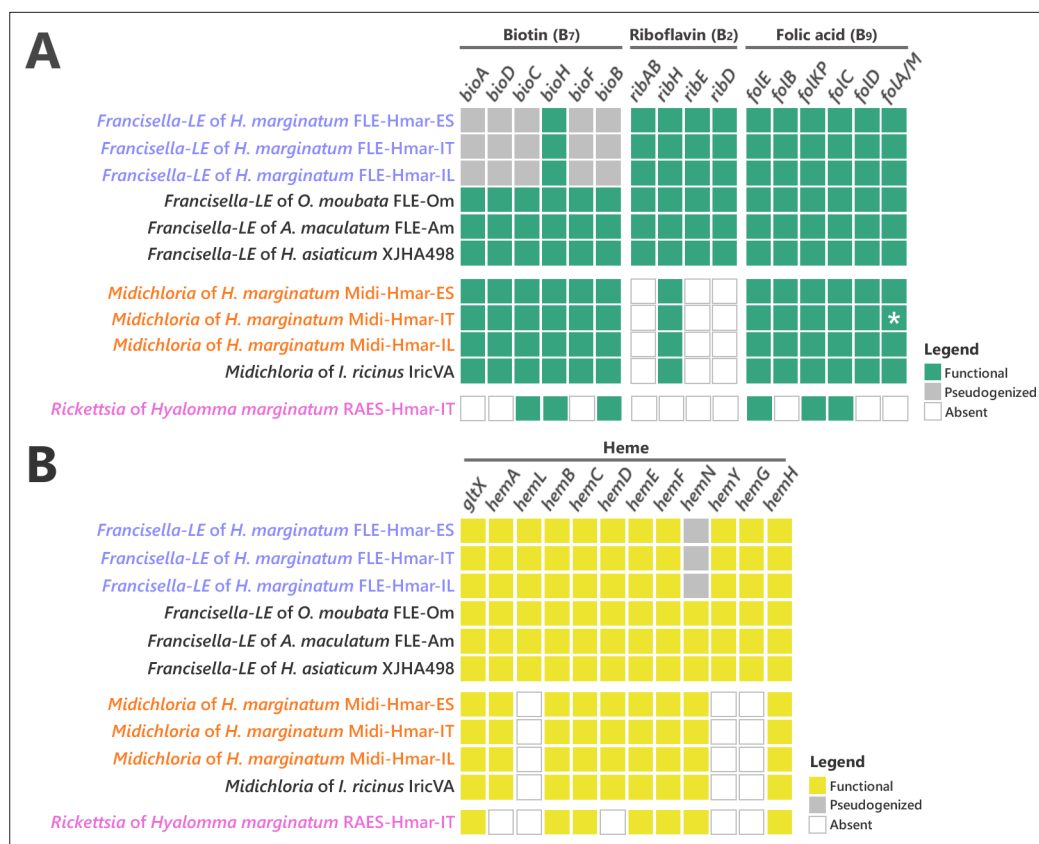


Figure 4. Conservation level of biosynthetic pathways involved in the symbiotic interaction between ticks and endosymbionts. **(A)** Biosynthetic pathways for the three key B vitamins (biotin, folic acid, and riboflavin) required for tick nutrition of FLE, *Midichloria*, and *Rickettsia*. Newly sequenced FLE, *Midichloria*, and *Rickettsia* genomes are indicated by a blue, an orange, and a pink font, respectively. Green squares, functional genes; gray squares, pseudogenes; white squares, missing genes; asterisk, partial gene sequence that do not contain internal codon stop but that are located at the beginning of a contig. **(B)** Heme biosynthetic pathway of FLE, *Midichloria*, and *Rickettsia*. Newly sequenced FLE, *Midichloria*, and *Rickettsia* genomes are indicated by a blue, an orange, and a pink font, respectively. Yellow squares, functional genes; gray squares, pseudogenes; white squares, missing genes. The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 4:

Figure supplement 1. Conservation level of the genes involved in the *Francisella* pathogenicity island (FPI) on FLE of *Hyalomma marginatum* and references genomes.

Figure supplement 2. Conservation level of the genes involved in the mismatch repair system (*mutSL*) and the nucleotide excision repair system (*uvrABCD*) on FLE and *Midichloria* of *Hyalomma marginatum* and references genomes.

Figure supplement 3. Pseudogenization of biotin synthesis genes.

Figure supplement 4. Conservation level of **(A)** pantothenic acid, nicotinic acid, pyridoxine, and thiamine B vitamins and **(B)** cofactors biosynthetic pathways of FLE, *Midichloria*, and *Rickettsia*.

Figure supplement 5. Phylogenetic trees of representative genes of riboflavin and folate biosynthesis pathways of FLE and *Midichloria*.

of one adenine base on a poly(A) zone (**Figure 4—figure supplement 3**). Since infidelity at poly(A) tracks can rescue pseudogenes in endosymbionts (*Tamas et al., 2008*), the *bioB* gene could be thus functional. Partial biosynthesis pathways of four other B vitamins (pantothenic acid: B₅; nicotinic acid: B₃; pyridoxine: B₆, and thiamine: B₁), each containing one to four pseudo/missing genes, are also present in the FLE-Hmar genomes, a pattern consistent with other FLE genomes (**Figure 4—figure supplement 4**).

The B-vitamin pathways in Midi-Hmar genomes are similar to those of *M. mitochondrii*. A complete pathway of biotin was consistently recovered in *Midichloria* genomes (**Figure 4A**). For folate, five

of the six biosynthesis genes (*folE*, *folB*, *folKP*, *folC*, and *folD*) were present but the sixth gene, *folA* (encoding for a dihydrofolate reductase), was not. However, we detected an alternative dihydrofolate reductase gene, *folM* (also known as *ydgB*), that was shown in other bacteria to provide the same metabolic function as *folA* (Giladi et al., 2003) suggesting that the folate pathway is functional in Midi-Hmar genomes. Only partial pathways were detected for riboflavin and pantothenic acid with three and four missing genes, respectively (Figure 4A and Figure 4—figure supplement 4).

No B vitamin pathway seems complete in the RAES-Hmar genomes. In the RAES-Hmar-IT genome, partial pathways of biotin and folate were detected with each three missing genes (Figure 4A). For pantothenic acid, only one of the five biosynthesis genes is present (Figure 4—figure supplement 4). No genes for other B vitamin pathways were found in the RAES-Hmar-IT genome. No additional B vitamin gene was observed in the other *Rickettsia* genome, RAES-Hmar-IL, which is incomplete. There is thus no obvious evidence that presume that RAES-Hmar is B-vitamin provisioning endosymbionts in *H. marginatum*.

We further searched for B vitamin genes of other origins than FLE, *Midichloria*, and *Rickettsia* genomes in tick metagenomes. In the Hmar-ES and Hmar-IL metagenomes (obtained from ovary samples), we found no significant hits, indicating that neither an additional B vitamin provisioning microorganism was present, nor did the tick genome itself encodes B vitamin pathways. In the Hmar-IT metagenome (obtained from a whole tick), we found four biotin genes (*bioA*, *bioD*, *bioF*, and *bioB*) in low abundance contigs of *Staphylococcus* bacteria. Previous studies report the presence of *Staphylococcus*, a common skin-associated bacteria, on tick exoskeletons and midguts and hypothesize this to be due to contamination, or acquisition during feeding (Greay et al., 2018).

Ticks differ from other eukaryotes in that they lack most of the genes encoding proteins required to produce and degrade heme (Gulia-Nuss, 2016; Jia et al., 2020). We thus searched for relevant pathways in the symbiont genomes and found that the FLE-Hmar and Midi-Hmar genomes contain genes involved in heme and iron homeostasis. The heme biosynthetic pathway was consistently

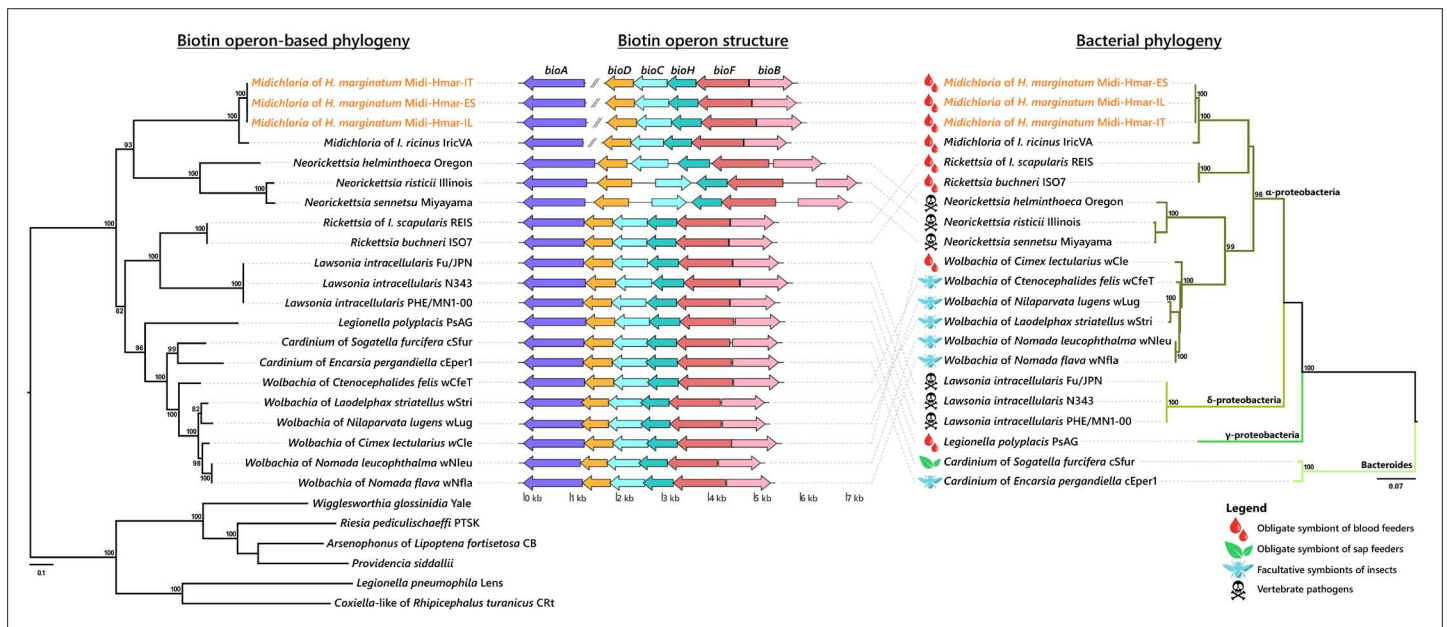


Figure 5. Evolutionary relationships (left) and structure (middle) of the streamlined biotin operon, confronted to the bacterial phylogeny (right). The phylogenetic tree of the streamlined biotin operon (left) was inferred using maximum likelihood (ML) from a concatenated alignment of the six genes composing the biotin biosynthetic pathway (1493 amino acids; best-fit approximation for the evolutionary model: CPREV+G4+I). The numbers on each node represent the support of 1000 bootstrap replicates; only bootstrap values >70% are shown. The scale bar is in units of substitution/site. Sequences from newly sequenced *Midichloria* genomes are indicated by an orange font. Structure of the streamlined biotin operon (middle) is represented by arrows in which each colored arrow corresponds to an intact gene and its direction. A discontinuous line corresponds to genes encoding on two separated contigs. The bacterial phylogenetic tree (right) was inferred using ML from an alignment of 16S rDNA sequences (1362 bp unambiguously aligned; best-fit approximation for the evolutionary model: GTR+G+I). The numbers on each node represent the support of 1000 bootstrap replicates; only bootstrap values >70% are shown. The scale bar is in units of substitution/site. Sequences from *Midichloria* of *Hyalomma marginatum* are indicated by an orange font.

detected, as well as a gene encoding heme oxygenase that catalyzes the degradation of heme and the subsequent release of iron (**Figure 4B**). In these genomes, we detected similar genetic patterns as those observed in the other FLE and *Midichloria* genomes. However, the heme pathway is partially degraded in FLE-Hmar genomes since their *hemN* gene is pseudogenized, a pattern not observed in other FLE genomes, suggesting an early stage of degradation for the heme pathway. This gene is present and not pseudogenized in the Midi-Hmar genomes (**Figure 4B**), suggesting these symbionts may compensate for the FLE heme pathway. In addition, three other genes, *hemL*, *hemY*, and *hemG* were not found in *Midichloria* genomes, but were present in FLE genomes (**Figure 4B**). As a result, a combination of FLE and *Midichloria* genes may be required to obtain a complete heme pathway.

Phylogenetic origins of B vitamin biosynthetic pathways

Our analysis shows that the B vitamin biosynthesis genes in the FLE-Hmar genomes have all been vertically inherited from a *Francisella* ancestor as their B vitamin genes are always more closely related to *Francisella* orthologous genes than to genes of more distantly related bacteria (examples are shown in **Figure 4—figure supplement 5A-B**). Similarly, folate and riboflavin biosynthesis genes in the Midi-Hmar genomes are of *Midichloria* origin as these genes are more closely related to orthologous genes present in *M. mitochondrii* and other members of the *Midichloriaceae* family than to genes of other bacteria (**Figure 4—figure supplement 5A-B**).

By contrast, the six biotin genes present in the Midi-Hmar genomes did not originate from the *Midichloriaceae* family, but from an exogenous origin. The biotin synthesis genes *bioD*, *bioC*, *bioH*, *bioF*, and *bioB* formed a compact operon in the Midi-Hmar genomes while the *bioA* gene is more distantly located along the bacterial chromosome (**Figure 5**). A similar operon structure is also present on the *M. mitochondrii* genome. In contrast, an arrangement in which the *bioA* is gene physically associated with the remainder of the biosynthetic operon was identified on the genomes of multiple intracellular bacteria that are all distantly related to *Midichloria*, including the *Cardinium* endosymbionts (Bacteroidetes: Flexibacteraceae) of parasitoid wasps and leaf-hoppers; the *Wolbachia* endosymbionts (Alphaproteobacteria: Anaplasmataceae) of bed bugs, bees, planthoppers, and fleas; the *Legionella* endosymbiont (Gammaproteobacteria: Legionellaceae) of the rodent lice; *Rickettsia buchneri* (Alphaproteobacteria: Rickettsiaceae) symbiont of the blacklegged tick *Ixodes scapularis*; and diverse

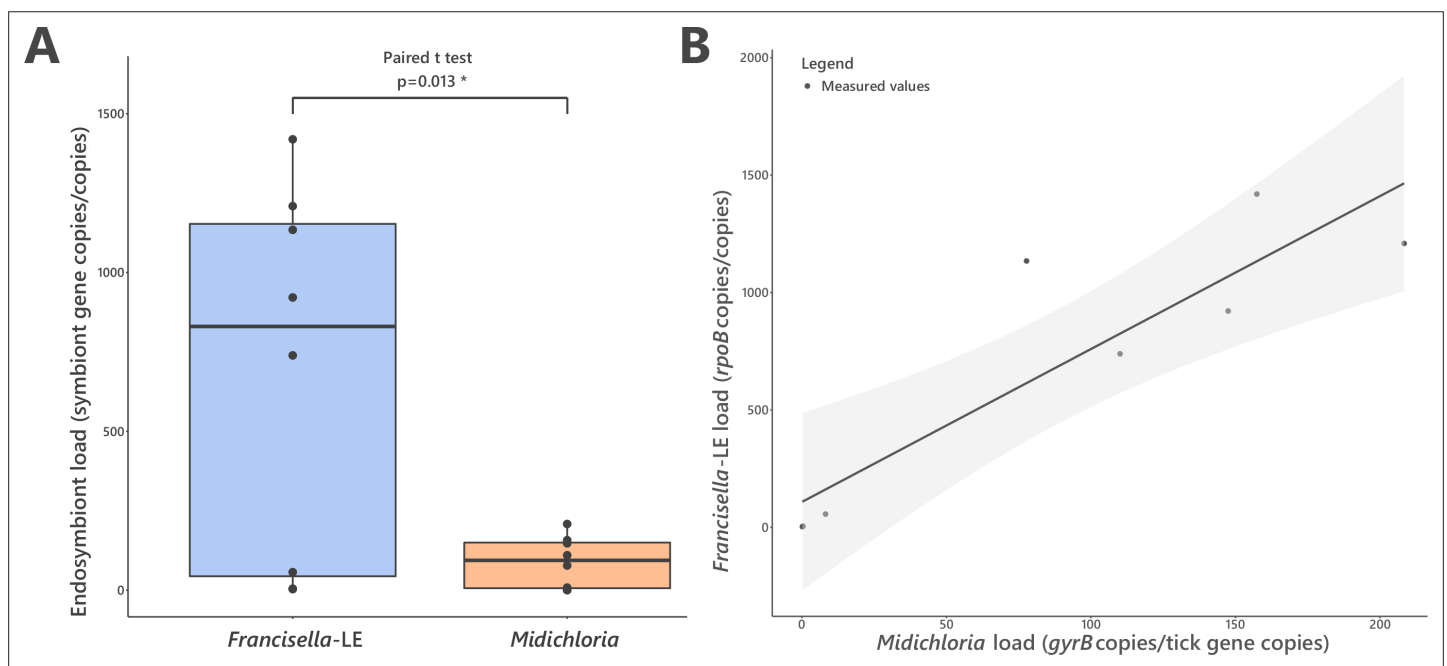


Figure 6. FLE and *Midichloria* loads in ovaries of *Hyalomma marginatum*. **(A)** Representation and statistical comparison of FLE and *Midichloria* densities. **(B)** FLE density as a function of *Midichloria* density in *H. marginatum* ovaries. Gray area represents 95% confidence interval.

The online version of this article includes the following source data for figure 6:

Source data 1. FLE and *Midichloria* densities in *H. marginatum* ovaries.

intracellular pathogens of vertebrates, such as *Lawsonia* (Deltaproteobacteria: Desulfovibrionaceae) and *Neorickettsia* (Alphaproteobacteria: Anaplasmataceae) (**Figure 5** and **Supplementary file 1c**). In most cases, the biotin genes form a compact and streamlined operon of 5–7 kb without major structural variation among bacteria. Phylogenetic analyses of the six biotin synthesis genes consistently exhibited similar evolutionary patterns (**Figure 5**). These patterns suggest that the biotin synthesis genes were acquired as a whole operon by an ancestor of *Midichloria* from an unrelated intracellular bacterium. In some cases, this streamlined biotin operon is also associated with nutritional symbionts of obligate blood feeders, such as *Wolbachia* of bedbugs, *Legionella* of rodent lice, and *R. buchneri* in the blacklegged tick, *I. scapularis* (**Figure 5**).

Co-infections of nutritional endosymbionts in tick ovaries

We next assessed the abundance of FLE and *Midichloria* in *H. marginatum* ovaries, which are the key organ where vertical transmission of nutritional symbionts to developing oocytes occurs (**Azagi et al., 2017**). Real-time qPCR assays on 10 field *H. marginatum* adult females indicated that FLE and *Midichloria* are both abundant in tick ovaries, with FLE and *Midichloria* detected in 10 and 9 ovarian samples, respectively. High densities were always observed for FLE (686.09±206.89 FLE *rpoB* gene copies per tick *cal* gene copies) and for *Midichloria* (88.72±28.41 *Midichloria gyrB* gene copies per tick *cal* gene copies) (**Figure 6A**). FLE were consistently most abundant with densities 5.8–21.4× higher than *Midichloria* densities (paired t-test, $p=0.013$; one outlier was removed from analysis, $n=8$). The FLE and *Midichloria* densities covaried positively in individual ticks ($\chi^2=23.937$, $p=0.003$; **Figure 6B**). FLE and *Midichloria* densities are provided in **Figure 6—source data 1**.

Evolutionary history of endosymbiosis in the *Hyalomma* genus

We further examined the evolutionary history of *Hyalomma* species and their associations with FLE and *Midichloria* through a bibliographic survey. Out of 10 *Hyalomma* species with sufficient published data, all were found infected by FLE, and 9 by *Midichloria* (**Supplementary file 1d**). We next reconstructed *Hyalomma* phylogeny using mitochondrial DNA sequences of the cytochrome c oxidase I (*cox1*) gene available on Genbank (**Figure 1—figure supplement 2**). Mapping of FLE and *Midichloria* onto the *Hyalomma* phylogenetic tree showed that co-infection by FLE and *Midichloria* is widespread across all *Hyalomma* lineages (**Figure 1—figure supplement 3**). However, FLE and *Midichloria* co-infection was not detected in one species, *H. asiaticum*, nested within the *Hyalomma* phylogeny among co-infected species.

Discussion

In this study, we show that the tick *H. marginatum* is a complex symbiotic system, combining genes of diverse phylogenetic origins to generate nutritional adaptations to obligate hematophagy. This tick harbors a microbiome functionally analogous to those observed in other tick species, dominated by intracellular bacterial symbionts producing the core set of B vitamins (biotin, riboflavin, and folate) essential for tick growth and survival. However, while in other tick species, as in other obligate blood feeders, production of all three core B vitamins is performed by a single nutritional symbiont (**Binetruy et al., 2020; Duron et al., 2017; Duron and Gottlieb, 2020**), *H. marginatum* harbors two bacterial partners whose core B vitamins biosynthetic capacities depend on a combination of genes, with indigenous and exogenous phylogenetic origins. This multi-partner nutritional symbiosis is stably maintained at least at the tick species level, as supported by our founding of genetically similar FLE and *Midichloria* present in *H. marginatum* populations from geographically distant regions.

Genome reconstructions confirmed the key role of symbionts in *H. marginatum* nutrition, but contrary to other tick species, no single symbiont does compensate for all nutritional needs. The FLE-Hmar genomes contain the genes to synthesize folate and riboflavin but its biotin synthesis pathway is degraded, and thus non-functional. Genome reduction is a conserved trait in all FLEs, but this process has extended in the FLE of *H. marginatum*, with an additional loss of genes in most COG functional categories. This process could have been triggered by the pseudogenization of the mismatch repair system (*mutSL*), leaving the FLE of *H. marginatum* with only one DNA repair system, nucleotide excision repair (*uvrABCD*). Absence of the *mutSL* system, coupled with strict clonality and a small population size during transovarial transmission, have probably led the FLE-Hmar genomes to accumulate

deleterious mutations, that resulted in maladaptation, and ultimately limited their beneficial contributions to ticks.

In the context of FLE genome degradation, co-infection with *Midichloria* prevents the breakdown and collapse of nutritional symbiosis in *H. marginatum*; that is, the *Midichloria* genome contains an intact biotin biosynthesis operon, and thus compensates for genome decay of FLE. Inversely, *Midichloria* has only partial pathways for riboflavin and folate and hence cannot meet the nutritional needs of *H. marginatum* for these B vitamins. Consequently, the co-infection of FLE with *Midichloria* forms a cooperative system essential for the nutritional symbiosis in *H. marginatum*. In addition, complementary heme synthesis genes are present in the FLE and *Midichloria* genomes, and these symbionts may be an additional source of heme, perhaps conferring a fitness advantage to *H. marginatum* during periods of starvation. In animals, heme is essential for the function of all aerobic cells, playing an important role in controlling protein synthesis and cell differentiation. Complete biosynthetic heme gene pathways exist in most animals, but not in ticks that need an exogenous source of heme (**Gulia-Nuss, 2016; Jia et al., 2020**). Vertebrate blood is usually considered to be their unique source for this essential cofactor (**Perner et al., 2016**), however ticks spend most of their life off host, and thus the presence of heme genes in FLE and *Midichloria* genomes may also indicate symbiont provisioning of heme in *H. marginatum*.

The co-localization of FLE and *Midichloria* in tick ovaries suggests that vertical transmission has led to their stable co-inheritance through tick generations, linking their evolutionary fate, as observed in other symbiotic systems of arthropods (**McCutcheon et al., 2019; Vautrin and Vavre, 2009**). This co-transmission fidelity creates the conditions under which cooperative interactions can emerge. The stable coexistence of FLE and *Midichloria* genomes makes various genes redundant, as we observed for B vitamin and heme synthesis pathways. Furthermore, the covariance of FLE and *Midichloria* densities in ticks is positive, suggesting that these two symbionts are not in direct competition but rather cooperative. However, FLE is about 100-times more abundant than *Midichloria*, which can be suggestive of competition. Indeed, negative interactions among these endosymbionts can occur because their tick host provides a limited amount of resources and space. Under this hypothesis, the density of *Midichloria* can be depressed by FLE, which could be more competitive. Regardless of the issue of this interaction, FLE and *Midichloria* depend on each other since their host tick would not survive without their combined production of B vitamins. The asymmetrical abundance of FLE and *Midichloria* may have further implications in nutritional endosymbiosis. First, it suggests that, at lower abundance, *Midichloria* can fully bridge the biotin requirements for *H. marginatum*. Second, it could imply that biotin (produced by *Midichloria*) is required at much lower abundance than riboflavin (FLE) and folate (FLE and *Midichloria*), or that *Midichloria* could over-express its biotin genes, possibly thanks to the streamlined structure of the biotin operon, and finally produce biotin at the same abundance than riboflavin and folate.

While the nutritional association of FLE with *Hyalomma* species has persisted for millions of years (**Azagi et al., 2017**), the nutritional role of *Midichloria* seems more recent in this tick genus. Co-infection with *Midichloria* was reported in at least nine *Hyalomma* species (**Supplementary file 1d**), but in most species, such as *H. excavatum* and *H. impeltatum* (**Azagi et al., 2017; Selmi et al., 2019**), *Midichloria* is present at much lower frequencies than would be expected for an obligate nutritional mutualist, suggesting that it is instead a facultative (i.e., not essential) association. Interestingly, the *Hyalomma* species apparently devoid of *Midichloria*, *H. asiaticum*, harbors an FLE with intact biotin, folate, and riboflavin synthesis pathways (**Buysse and Duron, 2021**). In *H. marginatum*, the decay of the FLE genome may have been accelerated by the presence of *Midichloria* and the redundancy of biotin biosynthesis, a process also reported in sap-feeding insects (**Husnik and McCutcheon, 2016; Manzano-Marin et al., 2020**). While it is clear that two events have led to the current status (loss of biotin genes and acquisition of *Midichloria*), the order by which these happened is unclear. *Midichloria* could have rescued a decaying symbiosis, or could have led, with its entrance in the system, to relaxation of selective constraints on FLE. Based on the common presence of *Midichloria* at lower frequencies in other *Hyalomma* species, a scenario of gradual parallel occurrence of these two events cannot be ruled out.

Our analyses also indicated that the biotin operon detected in the *Midichloria* of *H. marginatum* has an exogenous origin, being acquired following an ancient lateral gene transfer pre-dating the divergence between the *Midichloria* of *H. marginatum* and the one of *I. ricinus*. Accumulating

genomic sequences indicate that this streamlined biotin operon (denoted in some studies as the Biotin synthesis Operon of Obligate intracellular Microbes—BOOM [Driscoll et al., 2020](#)) has experienced transfers between distantly related endosymbionts inhabiting arthropod cells including *Wolbachia* ([Driscoll et al., 2020](#); [Gerth and Bleidorn, 2016](#); [Ju et al., 2020](#); [Nikoh et al., 2014](#)), *Rickettsia* ([Gillespie et al., 2012](#)), *Cardinium* ([Penz et al., 2012](#)), and *Legionella* ([Rihová et al., 2017](#)). Remarkably, the invasive nature of this streamlined biotin operon has contributed not only to the emergence of novel nutritional symbioses in *H. marginatum* with *Midichloria*, but also in other blood feeders, such as bedbugs with *Wolbachia* ([Nikoh et al., 2014](#)) and rodent lice with *Legionella* ([Rihová et al., 2017](#)), or in sap feeders as white flies with *Cardinium* ([Santos-Garcia et al., 2014](#)) and planthoppers with *Wolbachia* ([Ju et al., 2020](#)). Until recently, lateral gene transfer was thought to be rare in intracellular symbionts, as they reside in confined and isolated environments. However, co-infections of unrelated endosymbionts within the same host cell have created freely recombining intracellular bacterial communities, a unique environment previously defined as the ‘intracellular arena’ ([Kent and Bordenstein, 2010](#)). The detection of the streamlined biotin operon in *Wolbachia*, *Rickettsia*, and *Cardinium*—three of the most common intracellular symbionts of arthropods ([Duron et al., 2008](#))—corroborates the role of such ‘intracellular arenas’ in the evolutionary dynamics of nutritional symbioses, especially as the biotin operon can be found on plasmids ([Gillespie et al., 2012](#)).

The macroevolutionary and ecological consequences of acquiring nutritional symbionts are immense, ticks would simply not exist as strict blood feeders without such mutualistic interactions ([Duron and Gottlieb, 2020](#)). Our investigations corroborate that nutritional symbionts of ticks have all converged towards an analogous process of B vitamin provisioning. While past investigations showed that this evolutionary convergence consists in severe degeneration of symbiont genomes accompanied by preservation of biotin, folate, and riboflavin biosynthesis pathways ([Buysse and Duron, 2021](#); [Duron and Gottlieb, 2020](#)), nutritional endosymbiosis in *H. marginatum* is influenced by a more complex web of interactions resulting in a dynamic mosaic of symbiont combinations and offering novel evolutionary possibilities.

Materials and methods

Tick collection, DNA extraction, and molecular screening

Adult females of *H. marginatum* were collected from domestic animals from three geographical regions (Italy, Spain, and Israel) ([Figure 1](#)). Whole body of one female from Italy was processed for metagenome sequencing, while ovaries from females collected in Spain (n=10) and Israel (n=10) were used for metagenome sequencing (and for qPCR in the case of samples from Spain). For each sample, total DNA was extracted using either the DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN) or the NucleoSpin Plant II Kit (Macherey-Nagel).

A molecular screening was performed by qPCR (iQ5 system, Bio-Rad) on Spanish samples to evaluate the bacterial load of FLE and *Midichloria* symbionts in ovaries. For each specimen, three SYBR Green-based qPCR (Bio-Rad) assays were performed: (i) a specific amplification for the *H. marginatum cal* gene, (ii) a specific amplification for the FLE *rpoB* gene, and (iii) a specific amplification for the *Midichloria gyrB* gene. Thermal protocols and primers are listed in [Supplementary file 1e](#).

Genome sequencing, assembly, and annotation

Metagenomes were sequenced on Illumina HiSeq 2500, after a library preparation performed with Nextera XT. For the Italian and the Spanish samples, the raw paired-end reads quality was evaluated with FastQC ([Andrews, 2010](#)). Paired-end reads were trimmed via Trimmomatic (v0.40) ([Bolger et al., 2014](#)) and then assembled using SPAdes (v3.10.0) ([Bankevich et al., 2012](#)) following the Blobology pipeline ([Kumar et al., 2013](#)) (thus separating reads according to G+C content, coverage, and taxonomic annotation). Discarding of contaminating sequences and refining of the assemblies were performed manually through the analysis of the assemblies’ graphs with Bandage (v0.8.1) ([Wick et al., 2015](#)). Bacterial reads were separated from the tick reads, allowing the assembling of different bacterial genomes (‘filtered’ assemblies). For the Israeli sample, reads were trimmed using Cutadapt (v1.13) ([Martin, 2011](#)) and contaminants’ reads were removed through a mapping against Coliphage phi-X174 (GenBank: NC_001422) and *Staphylococcus aureus* (NC_010079) genomes with BWA (v0.7.17-r1188) (option mem) and SAMtools (v1.10) ([Li and Durbin, 2009](#)). Remaining reads

were further assembled using SPAdes (v3.11.1) ([Bankevich et al., 2012](#)) with default parameters. These 'raw' assembled scaffolds were compared to different reference genomes separately (FLE of *O. moubata* FLEOm, *M. mitochondrii*, and *R. aeschlimannii*; [Supplementary file 1b](#)) to discard unspecific scaffolds using RaGOO (v1.02) ([Alonge et al., 2019](#)), and, for each reference genome separately, the assignation of the remaining scaffolds ('filtered' assembly) was confirmed using the online NCBI BLAST tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The quality assessment and the completeness of the 'filtered' assemblies from all *H. marginatum* metagenomes were estimated using QUAST (v4.6.3) ([Gurevich et al., 2013](#)) and miComplete (v1.1.1) ([Hugoson et al., 2020](#)) with the --hmms Bact105 setting. The newly obtained genomes were annotated using Prokka (v1.13.1) ([Seemann, 2014](#)) with default parameters. The new *Midichloria* genomes were annotated using a manually revised annotation of *M. mitochondrii* ([Supplementary file 1b](#)) as a reference.

Genomic content, structure, and metabolic pathways analyses

The FLE and *Midichloria* whole-genome alignments were obtained separately using Mauve ([Darling et al., 2004](#)). Previously, contigs from newly obtained genomes were reordered with Mauve. Graphical representations of newly sequenced genomes were produced using CGView (v1.5) ([Stothard and Wishart, 2005](#)). Genes involved in biosynthesis pathways (B vitamins and heme), FPI, and mismatch repair systems (*mutSL* and *uvrABCD*) were retrieved using BLASTn, BLASTp, and tBLASTx on both newly obtained and reference FLE and *Midichloria* genomes.

To identify mobile elements, we used ISEScan ([Xie and Tang, 2017](#)) to predict insertion sequences and PhySpy ([Akhter et al., 2012](#)) for prophages detection. Pseudogenes prediction was performed using Pseudofinder (version downloaded in date April 1, 2020) ([Syberg-Olsen et al., 2020](#)) on each genome, including newly obtained and reference genomes of FLE and *Midichloria* ([Supplementary file 1b](#)). The FLE and *Midichloria* data sets were filtered excluding pseudogenes from the subsequent analyses. Clusters of orthologous groups of proteins (COGs) were predicted using the NCBI pipeline ([Galperin et al., 2015](#)) and COGs presence was then plotted with an in-house R script. Then, two different data sets were created: (i) a FLE data set including the three newly sequenced FLE-Hmar genomes and other published FLE genomes; and (ii) a *Midichloria* data set including the three newly sequenced Midi-Hmar genomes and *M. mitochondrii*. For each data set, SCOs were identified using OrthoFinder (v2.3.12) ([Emms and Kelly, 2019](#)), then SCO lists were retrieved on a R environment (v3.6.2) to build Venn diagrams using the 'VennDiagram' R package ([Chen and Boutros, 2011](#)).

To check if whether B-vitamin biosynthesis genes of other origin than FLE, *Midichloria*, and *Rickettsia*, we used the following procedure: we predicted the genes present in the preliminary assemblies of the three tick metagenomes using prodigal (using the setting '-p meta') and annotated them with GhostKOALA ([Kanehisa et al., 2016](#)). Indeed, for biotin, we checked for the presence of the *bioA*, *bioD*, *bioC*, *bioH*, *bioF*, and *bioB* genes searching for 'K00833, K01935, K02169, K02170, K00652, and K01012' sequences in the annotations, setting a cutoff to exclude contigs shorter than 500 bp or with a kmer coverage below 4. The hits above cutoff were manually examined with BLAST for functional and taxonomic classification.

Phylogenomics

The FLE, *Midichloria*, and *Rickettsia* data sets were filtered excluding the pseudogene sequences and were then used for the phylogenetic analyses. For each symbiont data set, SCOs were identified using OrthoFinder (v2.3.12) ([Emms and Kelly, 2019](#)) and then aligned with MUSCLE (v3.8.31) ([Edgar, 2004](#)). Poorly aligned positions and divergent regions were removed by Gblocks (v0.91b) ([Castresana, 2000](#)) prior to concatenation of individual alignments using an in-house script. Finally, the most suitable evolutionary model was determined using modeltest-ng (v0.1.5) ([Darriba et al., 2020](#)) according to the Akaike information criterion and maximum likelihood (ML) trees were inferred using RAxML (v8.2.9) ([Stamatakis, 2014](#)) with 1000 bootstrap replicates.

Biotin operon phylogeny and structure

Nucleic and protein sequences of the six genes of the biotin biosynthesis pathway were retrieved using BLASTn, BLASTp, and tBLASTx on all *Midichloria* genomes. Sequences from described streamlined biotin operons and sequences from biotin genes from other symbionts (retrieved from GenBank) were included in the data set (details in [Supplementary file 1c](#)). All protein sequences of the six

biotin genes were manually concatenated and aligned with MAFFT (v7.450) (Kato et al., 2002) and ambiguous positions were removed using trimAl (v1.2rev59) (Capella-Gutiérrez et al., 2009). The appropriate substitution model, and then ML-tree, were determined as described above. Meanwhile, 16S rRNA sequences from all organisms included in this data set were retrieved from GenBank and aligned with MEGA software. The Gblocks program with default parameters was used to obtain non-ambiguous sequence alignments. Phylogenetic analyses were performed with MEGA software, that is, determination of the appropriate substitution model using Akaike information criterion, ML-tree inference. Clade robustness was assessed by bootstrap analysis using 1000 replicates.

Contigs carrying the streamlined biotin operon were retrieved from newly obtained and reference genomes of different intracellular bacteria. Contigs were annotated using Prokka (v1.13.1) (Seemann, 2014) with default parameters. Prokka GenBank outputs were imported in R (v3.6.2) and analyzed using the 'genoplots' R package (Guy, 2010). Sequences of *ribH* and *folD* genes from bacteria carrying the streamlined biotin operon and from other bacteria were secondarily analyzed. Phylogenetic analyses on these two genes were performed as described above for biotin genes.

Bibliographic survey and phylogeny of *Hyalomma*

To access the associations between *Hyalomma* species with FLE and *Midichloria*, we performed an extensive bibliographic survey of published studies. For *Hyalomma* species for which presence/absence of FLE and *Midichloria* is documented, we retrieved cytochrome c oxidase I (*cox1*) gene sequences from GenBank and further performed an ML phylogenetic analysis with MEGA software as described above.

Statistical analyses

Statistical analyses were carried out using the R statistical package (v3.6.2) and the 'lme4' R package (Bates et al., 2015). The FLE load was analyzed using linear mixed-effects models on a data set containing loads measured in ovaries from adult engorged ticks. The normality of the data distribution was tested through a Shapiro-Wilk test with a 95% confidence interval. Outliers were removed from data sets. To build models, *Midichloria* load was fitted as a fixed explanatory variable. The best-fitted model was determined with the following procedure: the maximal model, including all higher-order interactions, was simplified by sequentially eliminating interactions and non-significant terms to establish a minimal model. A likelihood ratio test (using a chi-square distribution and a p-value cutoff of 0.05) was performed to establish the difference between sequential models. The comparison between the densities of FLE and *Midichloria* of *H. marginatum* was tested by a paired t-test.

Data and code availability

The bacterial genomes obtained in this study were deposited in European Nucleotide Archive (ENA) under the project PRJEB44779 and accession numbers GCA_910592745 (FLE-Hmar-ES), GCA_910592815 (FLE-Hmar-IL), GCA_910592705 (FLE-Hmar-IT), GCA_910592695 (Midi-Hmar-ES), GCA_910592725 (Midi-Hmar-IL), GCA_910592865 (Midi-Hmar-IT), and GCA_910592765 (RAES-Hmar-IT). Metagenome reads were deposited in ENA under accession numbers ERR7255744 (Hmar-ES), ERR7255745 (Hmar-IL), and ERR7255743 (Hmar-IT). Command lines used for the different genomic analyses are available on GitHub (<https://github.com/mariebuysse/Hmar-2021>; Buysse et al., 2021).

Acknowledgements

The authors are grateful to Tal Azagi for tick collection and extraction and Inbar Plaschkes for initial sequence analysis of the Israeli sample, to Justine Grillet, Valentina Serra, and Catherine Hartley for technical support during molecular analyses. This work benefited from (1) an international 'Joint Research Projects' grant (EVOSYM) co-managed by the Ministry of Science, Technology and Space (Israel) and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France), from (2) The Israel Science Foundation (ISF Grant no. 1074/18), from (3) the Human Frontier Science Programme Grant RGY0075/2017 to DS, and the Italian Ministry of Education, University and Research (MIUR): Dipartimenti di Eccellenza Programme (2018–2022) – Department of Biology and Biotechnology 'L. Spallanzani,' University of Pavia to DS, and from (4) the French Agence Nationale de la Recherche (ANR-21-CE02-0002).

Additional information

Funding

Funder	Grant reference number	Author
Ministry of Science, Technology and Space	EVOSYM	Yuval Gottlieb
Centre National de la Recherche Scientifique	EVOSYM	Olivier Duron
Israel Science Foundation	1074/18	Yuval Gottlieb
Human Frontier Science Program	RGY0075/2017	Davide Sasserà
Ministry of Education, University and Research		Davide Sasserà
Centre National de la Recherche Scientifique	ANR-21-CE02-0002	Olivier Duron

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author contributions

Marie Buysse, Anna Maria Floriano, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft, Writing – review and editing; Yuval Gottlieb, Davide Sasserà, Olivier Duron, Conceptualization, Writing – original draft, Writing – review and editing; Tiago Nardi, Formal analysis, Investigation, Writing – review and editing; Francesco Comandatore, Data curation, Formal analysis, Investigation; Emanuela Olivieri, Alessia Giannetto, Ana M Palomar, Benjamin L Makepeace, Chiara Bazzocchi, Alessandra Cafiso, Data curation, Investigation

Author ORCIDs

Marie Buysse [id http://orcid.org/0000-0002-8160-2470](http://orcid.org/0000-0002-8160-2470)
Tiago Nardi [id http://orcid.org/0000-0002-1248-9873](http://orcid.org/0000-0002-1248-9873)
Ana M Palomar [id http://orcid.org/0000-0002-5461-5874](http://orcid.org/0000-0002-5461-5874)

Decision letter and Author response

Decision letter <https://doi.org/10.7554/eLife.72747.sa1>
Author response <https://doi.org/10.7554/eLife.72747.sa2>

Additional files

Supplementary files

- Supplementary file 1. **Supplementary file 1** contains tables with relevant information that was needed for the genome assemblies and their following analyses, including a summary of the assembly information and quality analyses of the newly sequenced genomes. **Supplementary file 1** presents as well the genes and the primers used for qPCR assays conducted for relative quantification of FLE and *Midichloria*.
- Transparent reporting form

Data availability

The bacterial genomes obtained in this study were deposited in European Nucleotide Archive (ENA) under the project PRJEB44779 and accession numbers GCA_910592745 (FLE-Hmar-ES), GCA_910592815 (FLE-Hmar-IL), GCA_910592705 (FLE-Hmar-IT), GCA_910592695 (Midi-Hmar-ES), GCA_910592725 (Midi-Hmar-IL), GCA_910592865 (Midi-Hmar-IT) and GCA_910592765 (RAES-Hmar-IT). Metagenome reads were deposited in ENA under accession numbers ERR7255744 (Hmar-ES), ERR7255745 (Hmar-IL) and ERR7255743 (Hmar-IT). Command lines used for the different genomic analyses are available on GitHub (<https://github.com/mariebuysse/Hmar-2021>; copy archived at [swh:1:rev:a459aeeeb87d3fae17cf6ab8317654feadb62dba](https://www.swh.io/rev/a459aeeeb87d3fae17cf6ab8317654feadb62dba)).

The following dataset was generated:

Author(s)	Year	Dataset title	Dataset URL	Database and Identifier
Buyse M, Floriano AM, Gottlieb Y, Nardi T, Comandatore F, Olivieri E, Giannetto A, Palomar S, Makepeace B, Bazzocchi C, Cafiso A, Sasseria D, Duron O	2021	Dual bacterial symbiosis ensures ticks' nutrition through metabolic complementation	http://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB44779	European Nucleotide Archive, PRJEB44779

References

- Akhter S**, Aziz RK, Edwards RA. 2012. PhiSpy: a novel algorithm for finding prophages in bacterial genomes that combines similarity- and composition-based strategies. *Nucleic Acids Research* **40**:1–13. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gks406>, PMID: 22584627
- Alonge M**, Soyk S, Ramakrishnan S, Wang X, Goodwin S, Sedlazeck FJ, Lippman ZB, Schatz MC. 2019. RaGOO: fast and accurate reference-guided scaffolding of draft genomes. *Genome Biology* **20**:1–17. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1829-6>, PMID: 31661016
- Andrews S**. 2010. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. ScienceOpen, Inc.
- Azagi T**, Klement E, Perlman G, Lustig Y, Mumcuoglu KY, Apanaskevich DA, Gottlieb Y. 2017. Francisella-Like Endosymbionts and Rickettsia Species in Local and Imported Hyalomma Ticks. *Applied and Environmental Microbiology* **83**:1–14. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01302-17>, PMID: 28710265
- Bankevich A**, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Pribelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology* **19**:455–477. DOI: <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>, PMID: 22506599
- Bates D**, Mächler M, Bolker BM, Walker SC. 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software* **67**:i01. DOI: <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Ben-Yosef M**, Rot A, Mahagna M, Kapri E, Behar A, Gottlieb Y. 2020. Coxiella-Like Endosymbiont of Rhipicephalus sanguineus Is Required for Physiological Processes During Ontogeny. *Frontiers in Microbiology* **11**:1–16. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00493>, PMID: 32390951
- Bennett GM**, Moran NA. 2015. Heritable symbiosis: The advantages and perils of an evolutionary rabbit hole. *PNAS* **112**:10169–10176. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1421388112>, PMID: 25713367
- Binetruy F**, Buyse M, Lejarre Q, Barosi R, Villa M, Rahola N, Paupy C, Ayala D, Duron O. 2020. Microbial community structure reveals instability of nutritional symbiosis during the evolutionary radiation of Amblyomma ticks. *Molecular Ecology* **29**:1016–1029. DOI: <https://doi.org/10.1111/mec.15373>, PMID: 32034827
- Bolger AM**, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**:2114–2120. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>, PMID: 24695404
- Bonnet SI**, Pollet T. 2021. Update on the intricate tango between tick microbiomes and tick-borne pathogens. *Parasite Immunology* **43**:1–12. DOI: <https://doi.org/10.1111/pim.12813>, PMID: 33314216
- Buyse M**, Plantard O, McCoy KD, Duron O, Menard C. 2019. Tissue localization of Coxiella-like endosymbionts in three European tick species through fluorescence in situ hybridization. *Ticks and Tick-Borne Diseases* **10**:798–804. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.03.014>, PMID: 30922601
- Buyse M**, Duron O. 2021. Evidence that microbes identified as tick-borne pathogens are nutritional endosymbionts. *Cell* **184**:2259–2260. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.053>, PMID: 33930290
- Buyse M**, Nardi T, Floriano MF. 2021. Hmar-2021. a459aee. GitHub. <https://github.com/mariebuyse/Hmar-2021>
- Campbell MA**, Van Leuven JT, Meister RC, Carey KM, Simon C, McCutcheon JP. 2015. Genome expansion via lineage splitting and genome reduction in the cicada endosymbiont Hodgkinia. *PNAS* **112**:10192–10199. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1421386112>, PMID: 26286984
- Capella-Gutiérrez S**, Silla-Martínez JM, Gabaldón T. 2009. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* **25**:1972–1973. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348>, PMID: 19505945
- Castresana J**. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* **17**:540–552. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334>, PMID: 10742046
- Chen H**, Boutros PC. 2011. VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics* **12**:35. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-35>, PMID: 21269502
- Darling ACE**, Mau B, Blattner FR, Perna NT. 2004. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Research* **14**:1394–1403. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.2289704>, PMID: 15231754
- Darriba D**, Posada D, Kozlov AM, Stamatakis A, Morel B, Flouri T. 2020. ModelTest-NG: A New and Scalable Tool for the Selection of DNA and Protein Evolutionary Models. *Molecular Biology and Evolution* **37**:291–294. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msz189>, PMID: 31432070

- Di Lecce I**, Bazzocchi C, Cecere JG, Epis S, Sasseria D, Villani BM, Bazzi G, Negri A, Saino N, Spina F, Bandi C, Rubolini D. 2018. Patterns of Midichloria infection in avian-borne African ticks and their trans-Saharan migratory hosts. *Parasites & Vectors* **11**:106. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2669-z>, PMID: 29471857
- Driscoll TP**, Verhoeve VI, Brockway C, Shrewsbury DL, Plumer M, Sevdalis SE, Beckmann JF, Krueger LM, Macaluso KR, Azad AF, Gillespie JJ. 2020. Evolution of Wolbachia mutualism and reproductive parasitism: insight from two novel strains that co-infect cat fleas. *PeerJ* **8**:1–39. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.10646>, PMID: 33362982
- Duron O**, Bouchon D, Boutin S, Bellamy L, Zhou L, Engelstädter J, Hurst GD. 2008. The diversity of reproductive parasites among arthropods: Wolbachia do not walk alone. *BMC Biology* **6**:1–12. DOI: <https://doi.org/10.1186/1741-7007-6-27>, PMID: 18577218
- Duron O**, Binetruy F, Noël V, Cremaschi J, McCoy KD, Arnathau C, Plantard O, Goolsby J, Pérez de León AA, Heylen DJA, Van Oosten AR, Gottlieb Y, Baneth G, Guglielmone AA, Estrada-Peña A, Opara MN, Zenner L, Vavre F, Chevillon C. 2017. Evolutionary changes in symbiont community structure in ticks. *Molecular Ecology* **26**:2905–2921. DOI: <https://doi.org/10.1111/mec.14094>, PMID: 28281305
- Duron O**, Morel O, Noël V, Buysse M, Binetruy F, Lancelot R, Loire E, Ménard C, Bouchez O, Vavre F, Vial L. 2018. Tick-Bacteria Mutualism Depends on B Vitamin Synthesis Pathways. *Current Biology* **28**:1896–1902. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.04.038>, PMID: 29861133
- Duron O**, Gottlieb Y. 2020. Convergence of Nutritional Symbioses in Obligate Blood Feeders. *Trends in Parasitology* **36**:816–825. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.07.007>, PMID: 32811753
- Edgar RC**. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**:1792–1797. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>, PMID: 15034147
- Emms DM**, Kelly S. 2019. OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics. *Genome Biology* **20**:1–14. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1832-y>, PMID: 31727128
- Galperin MY**, Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. 2015. Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. *Nucleic Acids Research* **43**:D261–D269. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gku1223>, PMID: 25428365
- Gerhart JG**, Moses AS, Raghavan R. 2016. A Francisella-like endosymbiont in the Gulf Coast tick evolved from a mammalian pathogen. *Scientific Reports* **6**:1–6. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep33670>, PMID: 27645766
- Gerhart JG**, Auguste Dutcher H, Brenner AE, Moses AS, Grubhoffer L, Raghavan R. 2018. Multiple Acquisitions of Pathogen-Derived Francisella Endosymbionts in Soft Ticks. *Genome Biology and Evolution* **10**:607–615. DOI: <https://doi.org/10.1093/gbe/evy021>, PMID: 29385445
- Gerth M**, Bleidorn C. 2016. Comparative genomics provides a timeframe for Wolbachia evolution and exposes a recent biotin synthesis operon transfer. *Nature Microbiology* **2**:16241. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.241>, PMID: 28005061
- Giladi M**, Altman-Price N, Levin I, Levy L, Mevarech M. 2003. FolM, a new chromosomally encoded dihydrofolate reductase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **185**:7015–7018. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.185.23.7015-7018.2003>, PMID: 14617668
- Gillespie JJ**, Joardar V, Williams KP, Driscoll T, Hostetler JB, Nordberg E, Shukla M, Walenz B, Hill CA, Nene VM, Azad AF, Sobral BW, Caler E. 2012. A Rickettsia genome overrun by mobile genetic elements provides insight into the acquisition of genes characteristic of an obligate intracellular lifestyle. *Journal of Bacteriology* **194**:376–394. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.06244-11>, PMID: 22056929
- Gottlieb Y**, Lalzar I, Klasson L. 2015. Distinctive Genome Reduction Rates Revealed by Genomic Analyses of Two Coxiella-Like Endosymbionts in Ticks. *Genome Biology and Evolution* **7**:1779–1796. DOI: <https://doi.org/10.1093/gbe/evv108>, PMID: 26025560
- Greyay TL**, Gofton AW, Papparini A, Ryan UM, Oskam CL, Irwin PJ. 2018. Recent insights into the tick microbiome gained through next-generation sequencing. *Parasites & Vectors* **11**:12. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2550-5>, PMID: 29301588
- Guizzo MG**, Parizi LF, Nunes RD, Schama R, Albano RM, Tirloni L, Oldiges DP, Vieira RP, Oliveira WHC, Leite MDS, Gonzales SA, Farber M, Martins O, Vaz IDS, Oliveira PL. 2017. A Coxiella mutualist symbiont is essential to the development of Rhipicephalus microplus. *Scientific Reports* **7**:1–10. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17309-x>
- Gulia-Nuss M**. 2016. Genomic insights into the Ixodes scapularis tick vector of Lyme disease. *Nature Communications* **7**:10507. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms10507>
- Gurevich A**, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. 2013. QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* **29**:1072–1075. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Guy L**. 2010. GenoPlotR: comparative gene and genome visualization in R. *Bioinformatics* **27**:2334–2335. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq413>
- Hugoson E**, Lam WT, Guy L. 2020. MiComplete: Weighted quality evaluation of assembled microbial genomes. *Bioinformatics* **36**:936–937. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz664>
- Husnik F**, McCutcheon JP. 2016. Repeated replacement of an intrabacterial symbiont in the tripartite nested mealybug symbiosis. *PNAS* **113**:E5416–E5424. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1603910113>
- Jia N**, Wang J, Shi W, Du L, Sun Y, Zhan W, Jiang J-F, Wang Q, Zhang B, Ji P, Bell-Sakyi L, Cui X-M, Yuan T-T, Jiang B-G, Yang W-F, Lam T-T-Y, Chang Q-C, Ding S-J, Wang X-J, Zhu J-G, et al. 2020. Large-Scale Comparative Analyses of Tick Genomes Elucidate Their Genetic Diversity and Vector Capacities. *Cell* **182**:1328–1340. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.023>, PMID: 32814014

- Ju JF, Bing XL, Zhao DS, Guo Y, Xi Z, Hoffmann AA, Zhang KJ, Huang HJ, Gong JT, Zhang X, Hong XY. 2020. Wolbachia supplement biotin and riboflavin to enhance reproduction in planthoppers. *The ISME Journal* **14**:676–687. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0559-9>, PMID: 31767943
- Kanehisa M, Sato Y, Morishima K. 2016. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. *Journal of Molecular Biology* **428**:726–731. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.006>, PMID: 26585406
- Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* **30**:3059–3066. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>, PMID: 12136088
- Kent BN, Bordenstein SR. 2010. Phage WO of Wolbachia: lambda of the endosymbiont world. *Trends in Microbiology* **18**:173–181. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.12.011>, PMID: 20083406
- Kumar S, Jones M, Koutsovoulos G, Clarke M, Blaxter M. 2013. Blobology: exploring raw genome data for contaminants, symbionts and parasites using taxon-annotated GC-coverage plots. *Frontiers in Genetics* **4**:1–12. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00237>, PMID: 24348509
- Li H, Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**:1754–1760. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>, PMID: 19451168
- Lukasik P, Nazario K, Van Leuven JT, Campbell MA, Meyer M, Michalik A, Pessacq P, Simon C, Veloso C, McCutcheon JP. 2018. Multiple origins of interdependent endosymbiotic complexes in a genus of cicadas. *PNAS* **115**:E226–E235. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1712321115>, PMID: 29279407
- Machado-Ferreira E, Vizzoni VF, Balsemão-Pires E, Moerbeck L, Gazeta GS, Piesman J, Voloch CM, Soares CAG. 2016. Coxiella symbionts are widespread into hard ticks. *Parasitology Research* **115**:4691–4699. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5230-z>, PMID: 27595990
- Manzano-Marin A, Coeur d'acier A, Clamens AL, Orvain C, Cruaud C, Barbe V, Jousselin E. 2020. Serial horizontal transfer of vitamin-biosynthetic genes enables the establishment of new nutritional symbionts in aphids' di-symbiotic systems. *The ISME Journal* **14**:259–273. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0533-6>, PMID: 31624345
- Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal* **17**:10. DOI: <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Matsuura Y, Moriyama M, Łukasik P, Vanderpool D, Tanahashi M, Meng XY, McCutcheon JP, Fukatsu T. 2018. Recurrent symbiont recruitment from fungal parasites in cicadas. *PNAS* **115**:E5970–E5979. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1803245115>, PMID: 29891654
- McCutcheon JP, Boyd BM, Dale C. 2019. The Life of an Insect Endosymbiont from the Cradle to the Grave. *Current Biology* **29**:R485–R495. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.03.032>
- Narasimhan S, Fikrig E. 2015. Tick microbiome: the force within. *Trends in Parasitology* **31**:315–323. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.03.010>, PMID: 25936226
- Narasimhan S, Sweil A, Abouneameh S, Pal U, Pedra JHF, Fikrig E. 2021. Grappling with the tick microbiome. *Trends in Parasitology* **37**:722–733. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.04.004>, PMID: 33962878
- Nardi T, Olivieri E, Kariuki E, Sasser D, Castelli M. 2021. Sequence of a Coxiella Endosymbiont of the Tick Amblyomma nuttalli Suggests a Pattern of Convergent Genome Reduction in the Coxiella Genus. *Genome Biology and Evolution* **13**:1–7. DOI: <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa253>, PMID: 33275132
- Nikoh N, Hosokawa T, Moriyama M, Oshima K, Hattori M, Fukatsu T. 2014. Evolutionary origin of insect-Wolbachia nutritional mutualism. *PNAS* **111**:10257–10262. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1409284111>, PMID: 24982177
- Penz T, Schmitz-Esser S, Kelly SE, Cass BN, Müller A, Woyke T, Malfatti SA, Hunter MS, Horn M. 2012. Comparative genomics suggests an independent origin of cytoplasmic incompatibility in Cardinium hertigii. *PLOS Genetics* **8**:e1003012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003012>, PMID: 23133394
- Perner J, Sobotka R, Sima R, Konvickova J, Sojka D, Oliveira P de, Hajdusek O, Kopacek P. 2016. Acquisition of exogenous haem is essential for tick reproduction. *eLife* **5**:e12318. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.12318>, PMID: 26949258
- Ríhová J, Nováková E, Husník F, Hypša V. 2017. Legionella Becoming a Mutualist: Adaptive Processes Shaping the Genome of Symbiont in the Louse Polyplax serrata. *Genome Biology and Evolution* **9**:2946–2957. DOI: <https://doi.org/10.1093/gbe/evx217>, PMID: 29069349
- Santos-García D, Rollat-Farnier PA, Beitia F, Zchori-Fein E, Vavre F, Mouton L, Moya A, Latorre A, Silva FJ. 2014. The genome of Cardinium cBtQ1 provides insights into genome reduction, symbiont motility, and its settlement in Bemisia tabaci. *Genome Biology and Evolution* **6**:1013–1030. DOI: <https://doi.org/10.1093/gbe/evu077>, PMID: 24723729
- Santos-García D, Juravel K, Freilich S, Zchori-Fein E, Latorre A, Moya A, Morin S, Silva FJ. 2018. To B or Not to B: Comparative Genomics Suggests Arsenophonus as a Source of B Vitamins in Whiteflies. *Frontiers in Microbiology* **9**:1–16. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02254>, PMID: 30319574
- Sasser D, Beninati T, Bandi C, Bouman EAP, Sacchi L, Fabbi M, Lo N. 2006. "Candidatus Midichloria mitochondrii", an endosymbiont of the tick Ixodes ricinus with a unique intramitochondrial lifestyle. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**:2535–2540. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64386-0>, PMID: 17082386
- Sasser D, Lo N, Epis S, D'Auria G, Montagna M, Comandatore F, Horner D, Peretó J, Luciano AM, Franciosi F, Ferri E, Crotti E, Bazzocchi C, Daffonchio D, Sacchi L, Moya A, Latorre A, Bandi C. 2011. Phylogenomic evidence for the presence of a flagellum and cbb(3) oxidase in the free-living mitochondrial ancestor. *Molecular Biology and Evolution* **28**:3285–3296. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msr159>, PMID: 21690562

- Seemann T.** 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* **30**:2068–2069. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>, PMID: 24642063
- Selmi R**, Ben Said M, Mamlouk A, Ben Yahia H, Messadi L. 2019. Molecular detection and genetic characterization of the potentially pathogenic *Coxiella burnetii* and the endosymbiotic *Candidatus Midichloria mitochondrii* in ticks infesting camels (*Camelus dromedarius*) from Tunisia. *Microbial Pathogenesis* **136**:103655. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103655>, PMID: 31398530
- Smith TA**, Driscoll T, Gillespie JJ, Raghavan R. 2015. A *Coxiella*-like endosymbiont is a potential vitamin source for the Lone Star tick. *Genome Biology and Evolution* **7**:831–838. DOI: <https://doi.org/10.1093/gbe/evv016>, PMID: 25618142
- Stamatakis A.** 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* **30**:1312–1313. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>, PMID: 24451623
- Stothard P**, Wishart DS. 2005. Circular genome visualization and exploration using CGView. *Bioinformatics* **21**:537–539. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti054>, PMID: 15479716
- Sudakaran S**, Kost C, Kaltenpoth M. 2017. Symbiont Acquisition and Replacement as a Source of Ecological Innovation. *Trends in Microbiology* **25**:375–390. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.02.014>, PMID: 28336178
- Syberg-Olsen M**, Garber A, Keeling P, McCutcheon J, Husnik F. 2020. Pseudofinder: Detection of Pseudogenes in Prokaryotic Genomes. *bioRxiv*. DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.10.07.463580>
- Takeshita K**, Yamada T, Kawahara Y, Narihiro T, Ito M, Kamagata Y, Shinzato N. 2019. Tripartite Symbiosis of an Anaerobic Scuticociliate with Two Hydrogenosome-Associated Endosymbionts, a Holospora-Related Alphaproteobacterium and a Methanogenic Archaeon. *Applied and Environmental Microbiology* **85**:1–14. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.00854-19>, PMID: 31585988
- Tamas I**, Wernegreen JJ, Nystedt B, Kauppinen SN, Darby AC, Gomez-Valero L, Lundin D, Poole AM, Andersson SGE. 2008. Endosymbiont gene functions impaired and rescued by polymerase infidelity at poly(A) tracts. *PNAS* **105**:14934–14939. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0806554105>, PMID: 18815381
- Vautrin E**, Vavre F. 2009. Interactions between vertically transmitted symbionts: cooperation or conflict? *Trends in Microbiology* **17**:95–99. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.12.002>, PMID: 19230673
- Vial L**, Stachurski F, Leblond A, Huber K, Vourc'h G, René-Martellet M, Desjardins I, Balança G, Grosbois V, Pradier S, Gély M, Appelgren A, Estrada-Peña A. 2016. Strong evidence for the presence of the tick *Hyalomma marginatum* Koch, 1844 in southern continental France. *Ticks and Tick-Borne Diseases* **7**:1162–1167. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.08.002>, PMID: 27568169
- Wick RR**, Schultz MB, Zobel J, Holt KE. 2015. Bandage: interactive visualization of de novo genome assemblies. *Bioinformatics* **31**:3350–3352. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv383>, PMID: 26099265
- Xie Z**, Tang H. 2017. ISEScan: automated identification of insertion sequence elements in prokaryotic genomes. *Bioinformatics* **33**:3340–3347. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx433>, PMID: 29077810
- Zhong J**, Jasinskas A, Barbour AG. 2007. Antibiotic treatment of the tick vector *Amblyomma americanum* reduced reproductive fitness. *PLOS ONE* **2**:e000405. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000405>, PMID: 17476327

Chapitre 3

Symbiotes facultatifs : Traits biologiques d'un symbiote répandu chez les tiques molles du genre *Ornithodoros*

Article (en cours d'écriture)

Titre : *Rickettsia lusitaniae*, a worldwide distributed maternally inherited endosymbiont of *Ornithodoros* soft ticks

Auteurs : Marie Buysse, Emilie Talagrand-Reboul, Valérie Noël, Karen McCoy, Maxime Duhayon, Laurence Vial, Nathalie Boulanger, Sofian Ouass, Kevin Terretaz, Frédéric Landmann, Claudine Ménard, Olivier Duron

Tout comme les tiques dures, les tiques molles sont présentes à l'échelle mondiale, avec une forte occurrence d'espèces dans les régions tropicales et arides. Elles sont infectées elles aussi par plusieurs agents pathogènes de Vertébrés. Cependant leur distribution, leur écologie ou même leur capacité/compétence vectorielle restent très souvent sous-étudiées, sauf pour quelques espèces dont le rôle épidémiologique dans des pathologies est établi (Sándor et al., 2021; Vial, 2009), comme par exemple la fièvre porcine africaine (Manzano-Román et al., 2012; Sánchez-Vizcaíno et al., 2015). Ces différences pourraient résider dans les particularités écologiques et biologiques : Les tiques molles ont des repas sanguins de courtes durée, passent peu de temps sur leurs hôtes vertébrés, ont plusieurs stades nymphaux (impliquant un plus grand nombre de repas sanguin), et sont souvent inféodées à des micro-habitats (la plupart des espèces sont nidicoles).

Cela se traduit alors par un état de connaissances limité, notamment sur (i) les espèces associées à la faune sauvage et (ii) la diversité de leur microbiome en général. Pour comparaison, sur les 58 études répertoriées par Wu-Chuang et al. (2021) se reportant au microbiome des tiques, seulement une étude concernait une espèce de tiques molles (*nota bene* : quelques études sont à rajouter ce chiffre (Duron et al., 2018; Gomard et al., 2021; Moustafa et al., 2022; Yan et al., 2019)).

Les *Rickettsia*, bactéries intracellulaires dont plusieurs induisent des rickettsioses humaines ou animales, sont régulièrement détectées chez les tiques dures. Entre autre, les *Rickettsia* sont fréquemment recherchées étant donné le nombre d'espèces supposées pathogènes décrites infectant les tiques dures et l'établissement de leur rôle dans leur transmission. Dans les études sur les tiques molles, la présence des *Rickettsia* est souvent recherchée et celles-ci sont d'ailleurs présentes chez plusieurs espèces, et ce dans diverses régions mondiales. [Notamment, dans le cadre d'un projet annexe à la thèse nous avons décrit, sur la base de l'amplification de plusieurs gènes, deux nouvelles espèces de *Rickettsia* associées à trois espèces de tiques du complexe d'espèces *O. erraticus* (Buysse and Duron, 2020)]. Néanmoins, aucune étude n'a pour l'instant établi leur compétence vectorielle ou reporté un cas humain coïncidant avec une piqûre, et ce malgré le fait que des souches similaires à des souches pathogènes de *Rickettsia* chez les tiques dures soient retrouvées chez les tiques molles. Si des études sur leur implication épidémiologique sont à poursuivre (Tomassone et al., 2018), un autre aspect n'est pas à négliger : L'existence de souches de *Rickettsia* endosymbiotiques facultatives. Une *Rickettsia* semble à ce titre un candidat à considérer : *Rickettsia lusitaniae*. Formellement décrite par Milhano et al. (2014) chez *Ornithodoros erraticus* en 2014, *R. lusitaniae* est phylogénétiquement proche de *R. felis*, un agent pathogène transmis par des puces et d'autres insectes, et est ainsi considérée comme un agent pathogène potentiel. Néanmoins aucune preuve de pathogénicité n'a été démontrée jusqu'à présent. Depuis, *R. lusitaniae* a été reportée chez d'autres espèces de tiques molles du genre *Ornithodoros* provenant de diverses régions du monde. Très peu d'informations sont cependant disponibles afin de comprendre les mécanismes sous-jacents à sa présence, et sa potentielle persistance, chez les tiques molles. L'objectif de l'étude suivante est de déterminer

plusieurs caractéristiques de *R. lusitaniae* et de son interaction avec des tiques du genre *Ornithodoros*. Nos différentes expérimentations nous ont permis de soutenir que des souches similaires de *R. lusitaniae* infectent plusieurs espèces de tiques, avec des prévalences variables, pouvant être fortes dans plusieurs populations naturelles. Cette bactérie est notamment transmise verticalement, d'une femelle à sa progéniture, mais sa potentielle transmission horizontale pourrait également participer à son maintien dans les populations de tiques. Sur la base des traits d'histoire de vie mesurés dans cette étude, nous n'avons pas identifié d'effet négatif chez les tiques infectées, mais plutôt que les pontes issues de femelles porteuses de *R. lusitaniae* ont un taux d'éclosion plus élevé. Le séquençage de génomes complets de *R. lusitaniae* issus de trois espèces de tiques molles nous permet également d'explorer plusieurs hypothèses sur leur(s) effet(s) phénotypique(s).

Cette étude apporte une nouvelle perspective sur un symbiote de tiques, grâce à l'appui de plusieurs expérimentations complémentaires. En particulier, les *Rickettsia* sont un genre bactérien divers et hétérogène en terme d'associations avec leurs hôtes Arthropodes ou Vertébrés ; l'identification de leur phénotype ne peut uniquement reposer sur leurs ressemblances phylogénétiques. Par exemple, deux souches de *R. felis* ont des effets pathogéniques chez les Vertébrés et sont transmis par des puces, lorsqu'une autre souche de *R. felis* est un symbiote induisant la parthénogénèse chez une espèce de Psocoptères. Lors de la détection/description d'une nouvelle souche de *Rickettsia*, la mesure serait donc de mise dans l'attente d'études complémentaires sur leurs effets pathogéniques ou non. D'ailleurs, d'autres études sont encore nécessaires pour appréhender la nature de l'interaction entre les tiques molles et *R. lusitaniae* et cette étude soulève déjà plusieurs pistes d'investigations : (i) Dans quelle mesure une transmission horizontale de *R. lusitaniae* jouerait un rôle dans son maintien dans les populations de tiques ? Ce passage chez l'hôte vertébré s'accompagne-t-il d'effets pathogéniques ? (ii) Sa transmission verticale résulte-t-elle d'une manipulation de la reproduction de son hôte, comme chez d'autres *Rickettsia* ? (iii) Si *R. lusitaniae* est un endosymbiote facultatif, dans quel contexte est-il avantageux pour la tique et quelle est la nature de cet avantage ? Le fait

d'augmenter le taux d'éclosion des œufs chez une femelle infectée est-il un signe de protection des œufs lors de leur développement, comme un effet défensif contre des bactéries environnementales ?

Ces données sont présentées ici sous la forme d'un article, néanmoins ce dernier est encore en cours d'écriture et sera finalisée dans les semaines à venir.

***Rickettsia lusitaniae*, a worldwide distributed maternally inherited endosymbiont of *Ornithodoros* soft ticks**

Marie Buysse^{1,2*}, Emilie Talagrand-Reboul^{3,4}, Valérie Noël¹, Karen McCoy^{1,2}, Maxime Duhayon⁵, Laurence Vial⁵, Nathalie Boulanger^{3,4}, Sofian Ouass¹, Kevin Terretaz⁶, Frédéric Landmann⁶, Claudine Ménard⁷, Olivier Duron^{1,2*}

¹ MIVEGEC (Maladies Infectieuses et Vecteurs : Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle), CNRS – IRD (Institut pour la Recherche et le Développement) – Université de Montpellier, Montpellier, France

² MEEDiN (Montpellier Ecology and Evolution of Disease Network), Montpellier, France

³ EA7290 : virulence bactérienne précoce, groupe Borréliose de Lyme, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

⁴ Centre National de Référence Borrelia, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

⁵ CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement), Prades-le-Lez, France

⁶ CRBM (Centre de Recherche en Biologie Moléculaire de Montpellier) – Université de Montpellier – CNRS, Montpellier, France

⁷ IBMM (Institut des Biomolécules Max Mousseron) – Université de Montpellier, Montpellier, France

* Correspondence: marie.buysse@ird.fr, olivier.duron@cnrs.fr

Abstract

Rickettsia spp. are best known as major human and animal pathogens transmitted by ticks, fleas, mites, and lice. As etiological agents, their distribution, prevalence, and horizontal transmission are regularly surveyed, especially in hard ticks being among their main hosts. However, increasing studies report their transmission through generations in their arthropod hosts by a maternal transovarial transmission and, besides, the existence of non-pathogenic strains. For instance, while diverse *Rickettsia* spp. are detected in soft ticks, there is no report of associated human case. The stability of these strains could rely on evolutionary strategies to enhance their persistence within host lineages by infecting their progeny. In this study, while we identified multiple *Rickettsia* spp., one in particular is widely distributed across soft tick species (especially from the *Ornithodoros* genus): *Rickettsia lusitaniae*. To identify mechanisms underlying its maintenance in *Ornithodoros* populations, we studied different features of their association as transmission modes, tissular tropism, phenotypic effects, pathogenicity, and genomic features of three rickettsial genomes. Our investigations established a new perspective on this previously considered pathogenic species and led to highlighted features of a facultative endosymbiotic relationships. While we discussed different potential phenotypic effects on *R. lusitaniae*, further studies are required to access these hypotheses.

Keywords

Rickettsia; soft ticks; maternally inherited; endosymbionts

Introduction

Rickettsia is a genus of obligate intracellular bacteria (Alphaproteobacteria: Rickettsiales) infecting eukaryotes, and closely related to other obligate intracellular of medical, veterinary, or ecological interest as *Wolbachia*, *Midichloria*, *Ehrlichia*, and *Anaplasma* (Szokoli et al., 2016). *Rickettsia* spp. are a diverse from many aspects. *Rickettsia* species infect a high range of hosts, being found in plants, algae, amoebas, ciliates, hydrozoa, annelids, arthropods and vertebrates, inhabiting aquatic or terrestrial habitats (Pilgrim et al., 2021; Weinert et al., 2009). According to predictions, at least 20 to 42% of arthropods species might be infected, making *Rickettsia* one of the most common bacterial endosymbionts of arthropods (Pilgrim et al., 2021; Weinert et al., 2015). The *Rickettsia* genus is partitioned in several phylogenetic subclades: the Spotted Fever group, Typhus group, Transitional group, Canadensis group, Bellii group, and Torix group (Blanton, 2019; McGinn and Lamason, 2021; Weinert et al., 2009). While studies continue to discover novel *Rickettsia* species, our knowledge of their evolution, diversification and adaptations to a diversity of eukaryotes is expanding (El Karkouri et al., 2022; Laukaitis and Macaluso, 2021; Murray et al., 2016).

In arthropods, *Rickettsia* spp. are mainly acquired through maternal (transovarial) transmission (Perlman et al., 2006). In this case, *Rickettsia* transmission success is tightly linked to arthropod' reproduction, some *Rickettsia* have evolved into reproductive parasites of arthropods spreading within host populations by manipulating the host reproductive processes to enhance their own transmission. Because males represent a dead-end for reproductive parasites, manipulations frequently involve biasing the sex ratio (SR) of infected females towards the production of daughters, via the induction of either thelytokous parthenogenesis (production of all female progeny from unfertilized eggs) or male killing, as observed in *Rickettsia*-infected book lice and ladybirds, respectively (Lawson et al., 2001; Von der Schulenburg et al., 2001; Werren et al., 1994). Others might involve more beneficial

interactions, from obligate to commensal (Perlman et al., 2006). It is thus justified to present *Rickettsia* – arthropods associations in the prism of a parasitism – mutualism continuum. If *Rickettsia* can initiate specific and obligate interactions with its hosts, its distribution in arthropods order reflect the existence of multiple host shifts, driven by its ability to be horizontally transmitted (Weinert, 2015). Moreover, some *Rickettsia* spp. infecting blood-feeding arthropods appear to have mixed transmission, being then transmitted to vertebrates which could induce mild to fatal human and animal rickettsioses. The best known *Rickettsia* species are major human pathogens that include the etiological agents of the epidemic typhus, *R. prowazekii*, the Rocky Mountain spotted fever, *R. rickettsii*, and the flea-borne spotted fever, *R. felis*. Most of these pathogenic *Rickettsia* species have a zoonotic life cycle and are transmitted by blood-feeding arthropods such as ticks, mites, lice, and fleas, which commonly serve as ecological bridges for transmission from wildlife to humans and domestic animals. If nowadays the existence of arthropods-associated non-pathogenic species is recognized (and since late 1990's) (Chen et al., 1996; Fukatsu and Shimada, 1999; Werren et al., 1994) and that multiple tick-associated *Rickettsia* have unknown pathogenicity (Parola et al., 2013), *Rickettsia* are mainly known and studied as vector-borne pathogens.

With an epidemiological perspective, *Rickettsia* spp. are often surveyed in ticks. Indeed, since most of the rickettsioses-associated strains have been described from hard ticks (Parola et al., 2013; Socolovschi et al., 2009) and its presence are frequently reported by on-field studies, hard ticks (Ixodidae family, around 700 described species) are considered as one their main arthropods hosts. However, in soft ticks (Argasidae family, around 200 described species), mostly in *Argas* and *Ornithodoros* tick species, descriptions are fewer and report a lower diversity of *Rickettsia* spp. (even if some infections were not assigned to known species) (Table 1). While some of these isolates are similar to pathogenic ones found in hard ticks or belong to the Spotted Fever group, there is no evidence yet of human infectious case related to a soft tick

bite. Thus, their vector competence and epidemiological implication regarding *Rickettsia* spp. remain unknown (Tomassone et al., 2018). Besides, different *Rickettsia* spp. are only described in soft ticks and recent studies emphasized their wide host range and geographical distribution, notably those from *Ornithodoros* spp (Dietrich et al., 2014; Duron et al., 2017). Presence of *Rickettsia* spp. in soft tick species might thus not only be relying on occasional horizontal transmission events but specific adaptations with their arthropod hosts.

Prevalence of *Rickettsia* spp. usually vary from 0% to 100% depending on tick species and populations (Novakova et al., 2016; Pokutnaya et al., 2020). Tick microbiome is mainly driven by obligate nutritional endosymbionts and, at a local level, by facultative symbionts and pathogens of vertebrates (Binetruy et al., 2019b). As other strict hematophagous arthropods, tick species harbor nutritional endosymbionts that supplement them in essential nutrients deficient in their strict blood diet. Several bacterial genera are related to this function, including *Coxiella*-like endosymbionts (*Coxiella*-LE, hereafter) (Ben-Yosef et al., 2020; Buysse and Duron, 2021; Gottlieb et al., 2015; Guizzo et al., 2017; Nardi et al., 2021; Smith et al., 2015), *Francisella*-LE (Duron et al., 2018; Gerhart et al., 2016), *Midichloria* (Buysse et al., 2021b; Olivieri et al., 2019), and *Rickettsia* (Al-Khafaji et al., 2020; Gillespie et al., 2012; Hunter et al., 2015). These endosymbionts are highly maternally inherited (Duron et al., 2018), while, as well as *Rickettsia* spp., facultative symbionts could present horizontal or mixed transmission (Perlman et al., 2006; Weinert, 2015). The tick microbiome is thus complex and dynamic, and as different members rely on antagonist maintenance strategies they are expected to interact at some level (Bonnet et al., 2017).

In this study, we investigate on the diversity, the prevalence, and the phenotypic effects of *Rickettsia* in soft ticks. According to a phylogenetic analysis of the *gltA* gene sequences, we identified that multiple *Rickettsia* sequences isolated from diverse *Ornithodoros* spp. can be assigned to a unique species, *R. lusitaniae*, which was originally described in *O. erraticus*

(Milhano et al., 2014) and *O. yumatensis* (Sánchez-Montes et al., 2016). Therefore, based on our tick collection including specimens of eleven *Ornithodoros* species, we characterize phenotypic effects and transmission modes of *R. lusitaniae* to identify the mechanisms underlying its maintenance in *Ornithodoros* populations. We next sequenced and assembled three *R. lusitaniae* genomes from metagenomes of three tick species and used these data to further explore some phenotypic hypotheses of this *Rickettsia* – arthropod association.

Methods

Tick collection. A collection of 393 tick specimens belonging to 12 species of *Ornithodoros* was used (Table 2). Ticks were collected from natural populations in Europe, Northern Africa, Indian Ocean, and South America, or from laboratory colonies initiated from field specimens, between 2002 and 2019. Field ticks were either sampled from rodent burrows, seabird nests, or directly on hosts. Depending on *Ornithodoros* species, one to eight populations have been sampled, including each from one-to-87 specimens (Table 2). Samples from natural populations were either preserved in 70% ethanol until use or maintained in the laboratory at 25 °C with 80% relative humidity until use. Samples from laboratories colonies were reared and fed as described in Duron et al. (2018) and Buysse et al. (2021). Of the 393 specimens, *Rickettsia* infection had been formally characterized for 12 of them in previous studies through sequencing of a fragment of the citrate synthase (*gltA*) gene (Duron et al., 2017; Buysse and Duron, 2020).

DNA extraction and molecular screening. Prior to extraction, tick specimens were washed three times in sterile water and individually crushed. All DNA extractions (ticks, tick organs, eggs, vertebrate tissues, and blood) were performed using the DNeasy Blood and Tissue extraction kit (Qiagen) following manufacturer instructions. In our further experiments, to

access the presence of *R. lusitaniae*, specimens were individually tested by PCR amplification of a 637-bp fragment of the *gltA* gene using specific primers (see Table 3 for PCR conditions and primers). Positive PCR products were purified and sequenced (SANGER, Eurofins genomics). After being manually inspected with Chromas (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>), sequences were aligned using ClustalW (Thompson et al., 2003), implemented in the MEGA X software (Kumar et al., 2018).

Molecular typing and phylogenetic analyses. We performed a phylogenetic analysis based on the *gltA* gene sequences including (i) newly obtained *R. lusitaniae* sequences from this study, sequences from (ii) *Rickettsia*-infected specimens from Duron et al. (2017) and Buysse and Duron (2020) also further used in this study, (ii) from *Rickettsia*-infected soft tick specimens reported in other studies (Table 1), and (iv) from representative *Rickettsia* spp. available on GenBank. Sequences were aligned using mafft (v7.450) (Katoh et al., 2002), poorly aligned positions were removed using trimal (v1.2rev59) (Capella-Gutiérrez et al., 2009), and then unambiguous sequence alignments were concatenated using AMAS (Borowiec, 2016). The most suitable evolutionary model was determined using modeltest-ng (v0.1.5) (Darriba et al., 2020) according to the Akaike information criterion and maximum likelihood (ML) trees were inferred using RAxML (v8.2.12) (Stamatakis, 2014) with 1,000 bootstrap replicates. To go further, 19 DNA templates positive for *R. lusitaniae* on the basis of *gltA* gene sequences from our DNA collection were typed through the sequencing of three other gene fragments (16S rDNA (*rrs*), *coxA*, and *ompB*; Table 3). Phylogenetic relationships were evaluated between *R. lusitaniae* strains using the concatenated sequences of the four genes. Additional *R. lusitaniae* and representative *Rickettsia* spp. sequences available on GenBank were included in our analyses. The phylogenetic tree was obtained as described above.

Real-time quantitative PCR on tick organs. To investigate the presence and the load of *R. lusitaniae* in different tick tissues, real-time quantitative PCR (qPCR) assays were performed on specimens from two soft tick species: *O. maritimus* and *O. moubata*. Engorged males and females were used for both species (respectively four and nine for *O. maritimus*, three and five for *O. moubata*). Ticks were dissected in physiological serum in a Petri dish under a binocular magnifying glass. The midgut, gonads (ovaries or testes), Malpighian tubules, and salivary glands were isolated, washed in clean physiological serum before to separately extract DNA. The *R. lusitaniae* infection status of each tick was tested by a *gltA* PCR assay on carcasses; only tissues from positive specimens were further analyzed. For each tissue, two SYBR Green-based (Applied biosystems) qPCR assays were performed with a LightCycler 480 (Roche): (i) a specific amplification for the *Ornithodoros act2* gene and (ii) a specific amplification for the *Rickettsia gltA* gene (primers and qPCR conditions detailed in Table 3). Since both genes are single-copy per haploid genome of the tick and *R. lusitaniae*, the ratio between *act2* and *gltA* concentrations provides a load of *Rickettsia* genomes, a density, consequently independent of the tick size or organ size.

Detection of *R. lusitaniae* within organs through fluorescence *in situ* hybridization.

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) assays were performed on *O. maritimus* dissected organs to access the cellular tropism of *R. lusitaniae* compared to the intracellular nutritional symbiont of this species, *Coxiella*-LE (this latter is an obligate endosymbiont, i.e. required for tick survival and reproduction; Duron and Gottlieb (2020)). As described above, Malpighian tubules and ovaries of six *O. maritimus* females were isolated, then fixed 20 min in a 3.2% paraformaldehyde (PFA) solution and rinsed in 1X PBS solution for 10 min. Tissues were placed overnight at 37 °C in 100 µL of the hybridization solution (500 µL deionized formamide, 200 µL 20X SSC, 10 µL 50X Denhardt' solution, 100 µL DDT (1 mol/L), 10 µL Tween 20

10%, 180 µL Dextran sulfate 50%, for a final volume of 1 mL) in which were added the two sets of specific probes and helpers (i.e. *Coxiella*-LE and *Rickettsia* specific sets, see Table 3) at a final concentration of 0.5 µM. Tissues were then rinsed with different washing solutions as follows: a first brief bath with a 1X SSCDT solution (500 µL 20X SSC, 100 µL DDT (1 mol/L), 10 µL Tween 20 100%, for a final volume of 1 mL), a second with a 1X SSCDT solution for one hour at 42 °C in the dark, a third with a 0.5X SSCDT solution for one hour at 42 °C in the dark, a brief fourth with 1X PBS-T (Tween 0.05%), and a last brief one with 1X PBS. On a microscope slide (RS France), tissues were placed within a mounting medium with DAPI (ABCAM), topped with a cover glass and stored in the dark at 4 °C. Fluorescent signals were observed under an epifluorescent microscope (Zeiss Axioimager Z1). Negative-control was obtained by incubating organs without the *R. lusitaniae*-specific probe and by checking for tissue auto-fluorescence. Additionally, DNA of females' carcasses were tested for *R. lusitaniae* presence.

Presence of *Rickettsia lusitaniae* in ticks' eggs. The presence of *R. lusitaniae* in eggs was investigated in three tick species: *O. erraticus*, *O. maritimus*, and *O. moubata*. *Ornithodoros maritimus* specimens were caught engorged in yellow-legged gull (*Larus michahellis*) nests on the field, while *O. erraticus* and *O. moubata* specimens were from laboratory colonies. Gravid females of *O. maritimus* were captured alive and brought to the laboratory for laying individually. In order to obtain individual clutches for *O. erraticus* and *O. moubata*, several couples were created (two to three engorged females with one male) and housed until fecundation, then females were individually maintained in the laboratory to allow them to lay. Clutches were separately preserved in 70% ethanol until further use. DNA of the males' and females' whole bodies were tested for *R. lusitaniae* presence. In case of a *Rickettsia*-positive female, DNA of 10 eggs was individually extracted, while in case of a *Rickettsia*-negative

female, DNA of two pools of 10 eggs each was extracted. All eggs' DNA were tested by a *gltA* PCR assay and DNA quality of uninfected eggs was tested by a PCR targeting the 16S gene of ticks (Table 3).

Tick feeding experiments. A potential *R. lusitaniae* transmission through tick biting was investigated in two soft tick species, *O. erraticus* and *O. moubata*, in two separate experiments. For the first experiment, fourth-instar *O. moubata* nymphs (n=10) and adults (n=10) were fed on heparinized cow blood pack using an artificial feeding system, nothing was added to the blood. After feeding, ticks were kept under standard housing conditions until the molting of nymphs to adults. A second blood meal was provided to all adults. Two blood samples were collected before and after each blood meal to control the presence of *R. lusitaniae* that could be secreted by ticks into the blood. DNA of each blood sample was extracted in four replicates and further tested by qPCR assays targeting the *Rickettsia gltA* gene. Ticks' DNA were tested for *R. lusitaniae* infection.

For the second experiment, two batches of eight two-instar nymphs of *O. erraticus* reared in a laboratory colony were placed on the shaved dorsal skin of two 22-weeks old female mice, one batch per mice. After 24 hours, ticks were removed, checked for their engorgement state, and skin alterations were searched at the biting area. Seven days later, mice were euthanized. Total blood was collected by retro-orbital puncture with EDTA, and organs (heart and spleen), and two samples of skin at the biting area were dissected. Skin samples, heart and spleen were individually extracted (in two technical replicates), while blood samples were extracted in three technical replicates, then tested by qPCR assays targeting the *Rickettsia gltA* gene. Ticks' DNA were tested for *R. lusitaniae* infection.

Life-history traits. Twenty engorged females of *O. maritimus* were field-collected. Then, females were individually maintained in the laboratory to allow them to lay. Clutches were housed in the laboratory at 25 °C with 80% relative humidity, allowing eggs' development and hatching. After a month, remaining eggs and larvae were fixed in 70% ethanol. The numbers of unhatched eggs and larvae (i.e. hatched eggs) were counted. For each female, anterior-posterior length was measured as a proxy of their size. DNA of the females' whole body were tested for *R. lusitaniae* presence.

Modeling maintenance of *R. lusitaniae*. We used mathematical models, adapted from Turelli and Hoffmann (1999) and Rasgon and Scott (2003), to predict *R. lusitaniae* dynamic and establishment depending on different parameters: vertical transmission rate, positive fitness effect on infected specimens, horizontal transmission rate, and *R. lusitaniae* prevalence at introduction. Parameters' values were estimated using our experiments on the Carteau island natural populations of *O. maritimus*.

$$Finf_{t+1} = \frac{(X * fit_{inf} * Finf_t) + (fit_{uninf} * Funinf_t * Y) + ((1 - X) * fit_{inf} * Finf_t * Y)}{fit_{uninf} * Funinf_t + ((1 - X) * fit_{inf} * Finf_t) + (X * fit_{inf} * Finf_t)}$$

and

$$Funinf_{t+1}$$

$$= \frac{fit_{uninf} * Funinf_t + ((1 - X) * fit_{inf} * Finf_t) - ((1 - X) * fit_{inf} * Finf_t * Y) - (fit_{uninf} * Funinf_t * Y)}{fit_{uninf} * Funinf_t + ((1 - X) * fit_{inf} * Finf_t) + (X * fit_{inf} * Finf_t)}$$

with $Finf_t$ and $Funinf_t$ the respective frequency of infected and uninfected individuals at t generations;

fit_{inf} and fit_{uninf} the respective fitness effect of infected and uninfected individuals;

X the vertical transmission rate;

Y the horizontal transmission rate.

Genome sequencing, assembling, and annotation. We aimed to retrieve the *R. lusitaniae* MAGs of three specimens belonging to three soft ticks' species: *O. erraticus*, *O. maritimus*, and *O. moubata*. Different types of DNA matrices were used for metagenome sequencing: whole-body DNA of a single *O. maritimus*' specimen; Malpighian tubules' DNA of single male specimen of *O. erraticus*, and Malpighian tubules' DNA of five female specimens of *O. moubata*. Metagenome dataset for *O. moubata* was produced by Duron et al. (2018). First, reads were assembled using MEGAHIT (v1.2.9) (Li et al., 2015). To retrieve *R. lusitaniae* MAGs, meta-assembled contigs were binned using CONCOCT (v1.1.0) (Alneberg et al., 2014) and bins were taxonomically assigned using the anvi'o pipeline (v7.1) (Eren et al., 2021). For each meta-assembly, one bin was assigned as *Rickettsia* but the final assignment as *R. lusitaniae* was confirmed by retrieving *gltA* gene sequences from the MAGs and phylogenetically assigned them (as described above). To reduce the redundancy of the raw *R. lusitaniae* MAG, we used the anvi-refine tool with the anvi'o interactive interface. To obtain final *R. lusitaniae* MAGs, all raw MAGs were aligned using MAUVE (Darling et al., 2004); contigs that showed no homology with neither one of the two other bins were BLAST against the NCBI database and those that did not show sequence similarity with any *Rickettsia* representative were removed. The presence of plasmids in raw meta-assemblies and final MAGs was investigated through different bioinformatic methods: (i) retrieving circular contigs and scaffolds using Bandage (v0.8.1) (Wick et al., 2015) and SCAPP (Pellow et al., 2021) then BLAST them against the NCBI database, (ii) using the plasmidspades.py script (SPAdes, v3.15.3) (Bankevich et al., 2012), and (iii) using PlasmidSeeker (v1.3.0) (Roosaare et al., 2018). Final *R. lusitaniae* MAGs quality was accessed using miComplete (v1.1.1) (Hugoson et al., 2020) and Quast (v4.6.3) (Gurevich et al., 2013), and were annotated using Prokka (v1.13.3) (Seemann, 2014). Graphical representations of final MAGs were produced using CGView (Stothard and Wishart, 2005).

Phylogenomics and genomic analyses. Phylogenomics were conducted on a dataset including obtained *R. lusitaniae* MAGs and genomes of other *Rickettsia* representatives. Single-copy orthologs (SCO) were identified using OrthoFinder (v2.5.4) (Emms and Kelly, 2019). For each SCO, sequences were individually aligned using mafft and ambiguous hypervariable regions were removed using trimal. Finally, all SCO sequences were concatenated using Amas and the according phylogenetic tree was produced as described above. Genomic analyses were performed on two datasets: (i) the three *R. lusitaniae* MAGs and (ii) the same dataset used for the phylogenomics. On the first dataset, MAGs were aligned and compared using MAUVE (prior to alignment, the contigs were re-ordered using MAUVE using the Rlusi-Oerra MAG as a reference considering its higher size and CDs number). To compare their genomic content, SCOs were identified using OrthoFinder and listed in order to build a Venn diagram using the VennDiagram R package. A nucleic sequences' identity matrix was calculated between the three *R. lusitaniae* MAGs and three strains of *R. felis* (URRWXCal2, LSU, and LSU-Lb) using fastANI (Jain et al., 2018), and visualized using the heatmaply R package. On the second dataset, an amino acids' identity matrix was calculated using EzAAI (v1.2.2) (D. Kim et al., 2021) and visualized using the heatmaply R package. The differences of genes presence/absence was accessed using Roary (v3.12.0) (Page et al., 2015) and represented using an in-housed script. Comparison between *R. lusitaniae* MAGs and categories of other *Rickettsia* were further investigated using the query-pan-genome command line implemented in Roary (with the -a difference and -a intersection options).

Metabolic pathways analyses and ISRpe1 detection. The presence and completeness of genes involved in biosynthesis pathways (B vitamins/co-factors and heme) and potential genes associated with virulence in vertebrates (gene list established based on Gillespie et al. (2015), McGinn and Lamason (2021), and Yen et al. (2021)) were investigated by two complementary

tools to increase detection of both potential functional and pseudogenized genes: (i) OrthoFinder and (ii) BLASTn, BLASTp, and tBLASTn (Altschul et al., 1990). Investigations were conducted on *R. lusitaniae* MAGs and other *Rickettsia* representatives.

In addition, we also surveyed *R. lusitaniae* MAGs for the presence of an insertion sequence, ISRpe1, using BLASTn. ISRpe1 was previously detected in several *Rickettsia* genomes, including *R. felis*, and other endosymbionts of ticks (Duron, 2013). Comparing BLASTn outputs (and contigs carrying them) using MEGA X software allowed to (i) distinct SNPs between outputs and access number of ISRpe1 copies, and (ii) assess the completeness of ISRpe1 copies by translating nucleic sequences into protein sequences. A phylogenetic tree was produced for the ISRpe1 including the Rlusi-ISRpe1 sequences identified (only size-sufficient sequences for a phylogenetic analysis were included) and sequences from different bacteria, as described above.

Statistical analyses. The differences of (i) *R. lusitaniae* prevalence between females and males, (ii) *Rickettsia* genomes' load between organ, (iii) the effect of *R. lusitaniae* infection on the anterior-posterior length, the number of eggs laid, and the hatching rate, (iv) the effect of a rifampicin treatment on *Rickettsia* genomes' load, and (v) the difference of genomic size depending on reported *Rickettsia* phenotypes and phylogenetic clades were analyzed using the R statistical package (v3.6.2; R Core Team (2019)) implemented in RStudio (v1.2.5019; RStudio: Integrated Development for R (2019)) and using the following packages: car (Fox and Weisberg, 2019), lme4 (Bates et al., 2015), sjPlot (Lüdecke, 2022), DHARMA (Florian Hartig, 2022), Rmisc (Ryan M. Hope, 2022), lmtest (Hothorn et al., 2022), and agricolae (Mendiburu, 2021). For each variable, the normality was tested by Shapiro tests to assess the relevant law to use and the required data transformation. The differences of *R. lusitaniae* prevalence between females and males were tested using a Fisher's exact test (p-value cut-off of 0.05). The

Rickettsia genomes' loads were analyzed using linear mixed-effects models, a log transformation for the *O. maritimus* dataset, a boxcox transformation for the *O. moubata* dataset, and without including the values from gonads (ovaries and testes) to avoid extrapolation of a potential sex effect while *R. lusitaniae* was previously described as maternally transmitted. For these models, organs (midgut/salivary glands/Malpighian tubules/carcass) and sex (female/male) were fitted as fixed explanatory variables, while tick specimens were fitted as a random effect. For each variable, the maximal model was simplified by sequentially eliminating interactions and non-significant explanatory variables to establish the minimal model. A likelihood ratio test (LRT) (using a chi-square distribution and a p-value cut-off of 0.05) was performed to establish the difference between sequential models. All models' AICc were compared using the sjPlot package to select the best-fitted model and the quality of the best-fitted model was evaluated by the DHARMA package. To refine analyses on the *Rickettsia* genomes' loads, post hoc analyses were performed to establish significant differences between organs. Post hoc analyses were realized on three datasets: (i) all organs and gonads regardless of the specimen' sex, (ii) organs and ovaries from females, and (iii) organs and testes from males. The anterior-posterior length and the number of eggs laid were analyzed using linear models, in which the infection status was fitted as a fixed variable. The hatching rate was analyzed using generalized linear models with a quasibinomial distribution, in which the anterior-posterior length, the number of eggs laid, and the infection status were fitted as fixed variables. The anterior-posterior length and the number of eggs laid between uninfected and infected ticks were separately compared using a Wilcoxon-Mann Whitney U test, while the hatching rate was compared using a two-proportions z-test (p-value cut-off of 0.05). The effect of a rifampicin treatment on *Rickettsia* genomes' load was tested using a Student's t-test (p-value cut-off of 0.05). The differences between categories of reported *Rickettsia* phenotypes (arthropod endosymbionts, pathogens of vertebrates, and "to test", i.e. *Rickettsia lusitaniae*)

and phylogenetic clades (Spotted Fever group, Transitional group, and “to test”) were tested using an ANOVA associated with a HSD test (p-value cut-off of 0.05), on a boxcox transformation of the genomic size in base pairs.

Data and code availability. Raw data from our experiments are available in the Supplementary files. Both *R. lusitaniae* MAGs and datasets of associated paired-end reads are deposited on GenBank under the (to fill after submission) BioProject. Metagenome-assembled genomes Rlusi-Oerra, Rlusi-Omari, and Rlusi-Omoub are available on GenBank with the following accession numbers (respectively): (to fill after submission). Details and command lines used for the different genomic analyses are available on GitHub (https://github.com/mariebuysse/Rickettsia_lusitaniae_MS).

Results

Prevalence, distribution and diversity of *Rickettsia*, including *R. lusitaniae*, in *Ornithodoros* species. In our DNA collection, the presence of *R. lusitaniae* was investigated in 12 *Ornithodoros* soft tick species, for a total of 393 individuals distributed into 27 geographical localities across 11 countries (Table 2). The *gltA* PCR assay identified *R. lusitaniae* in a total of 167 specimens from the 11 species, although not in all localities (15 with at least one infected individual over 27) and specimens as further detailed. *Rickettsia lusitaniae* assignment was confirmed by similarity identify analysis, while sequences share a 99.63 to 100% nucleic identity (534/536 – 536/536 bp) with the reference sequence CEVDI PoTiRo (JQ771933). We also amplified three sequences from three tick species that were different of the *R. lusitaniae* reference sequence (97.02, 97.76, and 97.39% nucleic identity). Both in our collection and other reports, the prevalence of *R. lusitaniae* is contrasted depending on tick species and populations

(Table 4). In *O. costalis*, over 8 localities from 2 countries, *R. lusitaniae* is only detected in 2 of them but with prevalence of 25 and 100%. For *O. maritimus*, while all ticks were collected on the same host species (yellow-legged gull, *Larus michahellis*), *R. lusitaniae* prevalence is ranging from 20 to 61.9% in 3 localities but is absent in the fourth. Finally, we detected *R. lusitaniae* in both natural populations and laboratory maintained colonies of ticks.

We compared a total of 79 *gltA* sequences of *Rickettsia* identified in soft tick specimens of *Ornithodoros* and *Argas* genera, including only 28 sequences from our DNA collection. Our phylogenetic analyses revealed diverse sequences' clustering within different phylogenetic subclades: unknown *Rickettsia* sp., *R. argasii*, *Cand. R. nicoyana*, and *Cand. R. wissemanni* in the Spotted Fever group, *R. bellii* in the Bellii group, and *Candidatus R. mauretana*, *Cand. R. africaseptentrionalis*, *R. hoogstraalii*, and *R. lusitaniae* in the Transitional group (Figure 1, Figure S1). In total, 25 sequences from our DNA collection and 33 sequences from other studies cluster together with *R. lusitaniae* reference sequences (i.e. CEVDI PoTiRo isolate described by Milhano et al. (2014)) (Figure 1, Figure S1). These sequences were isolated from 14 *Ornithodoros* spp. and one *Argas* spp., making *R. lusitaniae* the most distributed *Rickettsia* spp. across soft tick species (Figure 1, Figure S1). *Rickettsia lusitaniae* sequences share a high level of nucleic similarity (99.978 – 100%, 225/230 – 230/230 bp), and there is no structuring according to tick host types, natural or laboratory-maintained populations, and geographical countries, even considering the only one *R. lusitaniae* sequence retrieved from a vertebrate host (carcass of the bat *Pipistrellus pipistrellus* from China) (Zhao et al., 2020). Infected *Ornithodoros* tick species are not associated with nor one specific host type, nor one ecological niche, those being specialized on birds, rodents, mammals, and bats depending on tick species (Figure 2). Altogether, considering all studies reporting its presence, *R. lusitaniae* was detected in a total of 15 *Ornithodoros* and one *Argas* species, distributed in 21 countries over Europe, Middle East, Asia, Africa, Indian Ocean, and North and South America (Figure 2 and Table 4).

To go further, we sequenced three additional gene fragments (16S rDNA, *coxA*, and *ompB*) of 19 specimens from nine *Ornithodoros* species and performed a phylogenetic analysis on the concatenated gene sequences (Figure 3). This analysis over 2,319 aligned base pairs supports that *R. lusitaniae* sequences cluster together with a very low divergence rate (99.88 – 100%). *Rickettsia lusitaniae* closest relative is *R. felis* (average nucleic identity of mean \pm SE: 98.54 \pm 0.001%), *R. hoogstraalii* (97.89 \pm 0.001%), and *R. asemonensis* (98.16 \pm 0.001%), as described in previous studies (Duron et al., 2017; Milhano et al., 2014), placing *R. lusitaniae* within the rickettsial Transitional group.

Sex-ratio bias in *R. lusitaniae* prevalence. Using *gltA* PCR assays, we examined specimens from three *Ornithodoros* species for potential SR bias in *R. lusitaniae* prevalence: *O. erraticus* (six females and three males), *O. maritimus* (52 females and 11 males), and *O. moubata* (75 females and nine males). In each species, we detected *R. lusitaniae* with overall prevalence of 100% in *O. erraticus*, 61.9% (39 of 63 specimens) in *O. maritimus*, and 75% (63 of 84 specimens) in *O. moubata*. There was no evidence of SR bias in two species: *O. erraticus* (100% prevalence in both females and males) and *O. moubata* with 56 of 75 females infected (74.6%) and 7 of 9 males infected (77.8%) (Fisher's exact test, p-value = 0.999), For *O. maritimus*, we observed a SR bias towards females: 36 of 52 females were infected (69.2%) while only 3 of 11 males were infected (27.3%) Fisher' exact test, p-value = 0.0153).

Tissue and cellular tropism. We quantified by qPCR assays the abundance of *R. lusitaniae* on different organs of both infected females and males specimens of *O. maritimus* (four females and two males) and *O. moubata* (four females and three males). In both species, *R. lusitaniae* infection was detected in all tick organs, however its abundance varies according to the organ type ($\chi^2 = 24.007$, p-value = 2.49e-05 for *O. maritimus*; $\chi^2 = 41.381$, p-value = 5.429e-09 for

O. moubata) and are independent of the specimen sex ($\chi^2 = 1.0711$, p-value = 0.3007; $\chi^2 = 0.2435$, p-value = 0.6217, respectively) (Figure 4). The density of *R. lusitaniae* is higher in the Malpighian tubules (in average 6.73x in *O. maritimus* (p-value = 1.565e-06), 61.96x in *O. moubata* (p-value = 3.045e-09)) and in the midgut (2.72x (p-value = 0.001383) and 2.18x (p-value = 0.04241), respectively) than in the carcass, but not in the salivary glands in which its density is similar to the carcass's (p-value = 0.8765 and p-value = 0.544, respectively). Regarding to the gonads, *R. lusitaniae* is at higher density in the ovaries compared to the carcass in both species (p-value = 0.01075 and p-value = 0.03311, respectively), while its density in the testes is lower or similar (p-value = 0.04023 and p-value = 0.2513, respectively). We also compared *R. lusitaniae* densities between (i) ovaries, (ii) salivary glands, and (iii) Malpighian tubules by post hoc analyses, being the organs generally involved (i) in the maternal transmission, (ii) in the horizontal transmission, and (iii) associated with high density of mutualistic endosymbionts of ticks. The *R. lusitaniae* density in ovaries is higher (p-value = 0.0001764) compared to salivary glands in *O. maritimus*, but is lower compared to Malpighian tubules in both species (p-value = 3.892e-05 and p-value = 0.000315, respectively).

To observe cellular tropism of *R. lusitaniae* within tick organs and compared it to the localization of the obligate endosymbiont *Coxiella*-LE, we hybridized fluorescent probes on both bacteria in ovaries and Malpighian tubules of *O. maritimus* females (Figure 5). Within Malpighian tubules, *Coxiella*-LE seem grouped in vacuole-like shapes while *R. lusitaniae* remain in others. *Rickettsia* distribution within the cells and organs seem homogenized.

Assessment of the vertical transmission of *R. lusitaniae*. First, we evaluated the maternal transmission of *R. lusitaniae* in gravid females of three *Ornithodoros* species with two females of *O. erraticus* (2 infected/2), 10 females of *O. maritimus* (9 infected/10), and 10 females of *O. moubata* (10 infected/10). By testing individual eggs, we confirmed the presence of *R.*

lusitaniae in the progeny of all tick species, with moderate to high transmission rate depending on tick species (1 in *O. erraticus*, 0.989 ± 0.011 in *O. maritimus*, and 0.75 ± 0.13 in *O. moubata*). Then, we assessed the existence of a potential paternal transmission in *O. maritimus* with 14 pools of 10 eggs from 7 uninfected females. No infected egg was detected. The vertical transmission of *R. lusitaniae* thus might be only supported by a maternal (transovarial) component.

Determination of the *in vitro* and *in vivo* horizontal transmission of *R. lusitaniae*. To explore the potential horizontal and infectious transmission of *R. lusitaniae* we conducted two experiments to study two features underlying these processes, as the bacterial relapsing during a blood meal and the infection within a host following a tick bite. With an artificial feeding system, we screened for and quantified the presence of *R. lusitaniae* in blood (two samples before/after a blood meal) at two life stages of tick specimens of *O. moubata* (nymphs and adults), for a total of eight blood samples. Blood was confirmed negative for *R. lusitaniae* infection before blood meals. Over 32 technical replicates, we detected *R. lusitaniae* in three replicates corresponding to the two blood samples sampled after the adults' blood meal, with an estimated bacterial load of $3,280 \pm 970$ bacteria/ml. In a second experiment, we investigated the presence of *R. lusitaniae* in the dermis at biting area, blood, and organs (heart and spleen) of two mice seven days after having been bitten by *R. lusitaniae*-infected *O. erraticus* specimens. We did not detect *R. lusitaniae* in any of the 18 replicates by qPCR assay. If relapsed in the blood during the tick blood meal, we did not evidence any persistent infection and pathogenicity of *R. lusitaniae* in mice.

Impact of *R. lusitaniae* on tick fitness and modelling maintenance in populations.

The effect of *R. lusitaniae* on tick fitness was evaluated on 20 gravid females of *O. maritimus* and their progeny by measuring anterior-posterior length, number of laid eggs, and number of hatched eggs. Over 20 females, 13 was *R. lusitaniae*-positive. We did not find an effect of the infection on female size (mean-infected = 6.51 ± 0.13 mm; mean-uninfected = 6.78 ± 0.22 mm; Wilcoxon-Mann Whitney U test, p-value = 0.311) and on the number of eggs (mean-infected = 134.53 ± 17.32 ; mean-uninfected = 167.57 ± 20.77 ; Wilcoxon-Mann Whitney U test, p-value = 0.2047), but we did on the hatching rate (mean-infected = 0.94 ± 0.02 ; mean-uninfected = 0.84 ± 0.07 ; two-proportions z-test, p-value = 0.01792) (Figure 6A–C and Table S4). Further analyses suggest that the hatching rate might vary by female size (p-value = 0.038) and *R. lusitaniae* infection (p-value = 0.0361), but not by an interaction of the two variables (p-value = 0.27) or by the number of eggs (p-value = 0.289) (Figure 6D). Based on data obtained from this particular natural population of *O. maritimus*, we modelled *R. lusitaniae* establishment. Considering its imperfect vertical transmission rate of 0.989 ± 0.011 , *R. lusitaniae* maintenance through generations is strongly dependent of the existence of a positive fitness effect of the infection on ticks and is enhanced by a potential horizontal transmission (Figure 7). Our models show that in absence of those, *R. lusitaniae* is not maintained in host populations, disappearing rapidly (except in the case in which its vertical transmission is almost perfect and its entry in the population results in a major infection event). Infection dynamics of *Rickettsia* theoretically achieve stability only through the existence of a difference between the selective value of infected and uninfected individuals in favor of the infected (i.e., a mutualistic effect) and/or a potential for infection through horizontal transmission. Predicted stability levels are similar and do not reach systematic infection (which is anyway impossible because of imperfect maternal transmission), independently of the prevalence of infection at population entry.

Description of *R. lusitaniae* genomes. Based on metagenomes sequenced from specimens of *O. erraticus*, *O. maritimus*, and *O. moubata*, we retrieved three *R. lusitaniae* metagenome-assembled genome (MAG, hereafter) (one per metagenome), designated as Rlusi-Oerra, Rlusi-Omari, and Rlusi-Omoub, and also as Rlusi-MAGs (Table S5). Rlusi-MAGs are almost complete (>94% of estimated completeness), ranging from 1.45–1.56 Mb in size, with similar G+C content (32.32–32.51%), containing from 1452 to 1689 coding sequences and no plasmids. Number of pseudogenes have not been accessed since the MAGs remain fragmented and un-scaffolded in the absence of reference genomes (152 contigs for Rlusi-Oerra, 144 for Rlusi-Omari, and 108 for Rlusi-Omoub). Rlusi-MAGs share a high level of identity based on nucleic sequences (99.281–99.573% between Rlusi-MAGs, 95.59 – 96.22% with *R. felis*) and conserved regions (Figure 8A and 8B). Most of genes are retained in Rlusi-MAGs, even if their genomic content shows slightly variations (Figure 8C and 9A). At least three copies of the insertion sequence ISRpe1 were detected in Rlusi-Oerra and Rlusi-Omari, but the functionality of only two copies from Rlusi-Omari could have been assessed, other copies being truncated by a contig limit. One copy from Rlusi-Oerra and two copies from Rlusi-Omari exhibit divergence with each other but do cluster together in the ISRpe1-i clade with sequences from other intracellular endosymbionts of arthropods as other *Rickettsia*, *Cardinium* and *Wolbachia* (Figure 8D).

Genomic features of *R. lusitaniae* and comparison with other *Rickettsia*. Phylogenomic analysis based on 434 SCOs of *Rickettsia* genomes support previous assumption that *R. lusitaniae* from different *Ornithodoros* species cluster together and embed in the Transitional group (Figure 9A). Taking in account recently obtained *Rickettsia* genomes isolated in arthropods, closest relatives of *R. lusitaniae* include *R. felis* and an endosymbiotic *Rickettsia* of the tsetse fly *Glossina mortisans submortisans* (GCA_020881295), for which no phenotype

is described yet. Notably, the Transitional group contain both arthropods associated endosymbionts and vertebrates' pathogens, and its members exhibit higher levels of divergence than members of the Spotted Fever group (Figure 9A and 9B). Phenotypic characterization of newly described species appeared thus risky if only based on phylogenetic closeness.

Evidences support that pathogenic *Rickettsia*'s genomes have undergone genomic degradations, leading to a reduced genome size (Diop et al., 2018). We thus compared Rlusi-MAGs size with other *Rickettsia*'s based on phenotypic categories and phylogenetic categories. As expected, we observed differences between phenotypic categories (ANOVA, p-value = 0.00244) and evidenced that Rlusi-MAGs genome size were more similar to the ones of arthropods associated endosymbionts (1.52 ± 0.36 and 1.60 ± 0.14 , respectively) than vertebrates' pathogens' (1.31 ± 0.02) (Figure 9C). We reported no differences regarding to phylogenetic groups (ANOVA, p-value = 0.154).

To investigate the potential phenotypic effect of *R. lusitaniae*, we looked for genes of metabolic pathways presumably involved in mutualistic nutritional or pathogenic interactions with tick or vertebrate hosts. Rlusi-MAGs do not present particular B vitamins (and cofactors) biosynthesis pathways, especially compared to *R. buchneri* ISO7 strain which possess a complete biotin synthesis pathway (Figure 10A and 10B). Heme metabolic pathways is also comparable between all *Rickettsia* surveyed (Figure 10C). On another perspective, we detected several genes potentially involved in *Rickettsia* virulence in Rlusi-MAGs, but there is no clear pattern between all Rlusi-MAGs, or between other virulent *Rickettsia* as *R. felis* URRWXC12 strain, *R. amblyommatis*, *R. rickettsia*, or *R. typhi* (Figure 11). Furthermore, based on the Roary output, we listed different proteins present in Rlusi-MAGs that appeared not to be common in other *Rickettsia*. This list still needs to be analyzed but our preliminary observations pointed one first protein of interest: the rrrD lysozyme. Complete rrrD protein sequences were only detected in Rlusi-MAGs and *R. bellii*, while truncated sequences were retrieved in *R. amblyommatis*, *R.*

heilongjiangensis, *R. japonica* and *R. argasii*. Aside, *rrrD* sequences were identified in multiple *Rickettsia* associated with different arthropods families, *Vibrio* phages, or *Cand. Megaira* using online BLAST on NCBI. Our interest in *rrrD* is its reported lytic activity against bacteria and its classification to the “defense response to bacterium” category on Uniprot.

Discussion

Characterization of *Rickettsia* spp. sequences obtained from soft ticks bring new insights about a relatively newly described tick endosymbionts, *R. lusitaniae*. First, *R. lusitaniae* is the most common and widespread *Rickettsia* species infecting soft ticks, with at least 16 naturally infected species. Overall phylogenetic results highlight a wide geographical distribution of low divergent *R. lusitaniae* strains found in different tick species, suggesting that its acquisition within the *Ornithodoros* genus is recent at an evolutionary scale. Besides, such low divergence over sequences isolated in phylogenetically distant hosts might be not explained by an ancestral infection following by co-speciation, but rather by host shifts. Here, *R. lusitaniae* isolates from distant *Ornithodoros* spp. and one *Argas* species, cluster all together. Some *R. lusitaniae* infected tick species share similar ecological niches, locations and hosts, which could facilitate potential host shifts through co-feeding (i.e. aggregation of ticks on a host during a blood meal). For example, near the Gugul Island (South Korea) where was sampled *O. sawai* specimens infected by *R. lusitaniae* (H.-C. Kim et al., 2021), a previous study found co-occurrence of *O. sawai* and *O. capensis* in Black-tailed Gull colonies (Kim et al., 2017); specimens from both species were reported associated with *R. lusitaniae*. Host shifts have already been reported across *Rickettsia* species and clades (Weinert et al., 2009) (some through co-feeding, Fongsaran et al. (2022)), and other tick-associated arthropods as *Spiroplasma* (Binetruy et al., 2019a) and *Arsenophonus* (Duron et al., 2017). At another level, co-feeding implication is already

established in horizontal transmission of tick-borne pathogens (Randolph et al., 1996). Additionally, our experiments did not revealed negative effect of *R. lusitaniae* infection on ticks, in contrast to some reports in hard tick species (i.e. lethal effect of *R. conorii* infecting *Rhipicephalus sanguineus* (Levin et al., 2009) or *R. rickettsii* in *Dermacentor andersoni* (Niebylski et al., 1999)), but in contrary, we evidenced a positive fitness effect on *O. maritimus* infected females. Overall, these features could participate to the spread, infection, and then persistence of the maternally inherited *R. lusitaniae* within soft tick populations. Further studies should attest of the homogeneity of soft tick responses to *R. lusitaniae* natural infections.

Ornithodoros soft ticks are known as vectors of different *Borrelia* species, inducing Relapsing Fever borreliosis (Trape et al., 2013), or of the African Swine fever virus (Gaudreault et al., 2020). However, no soft tick species is yet identified as *Rickettsia* vector-competent (Tomassone et al., 2018). Our bibliographical survey reported the only *R. lusitaniae* infection in one specimens of the bat *Pipistrellus pipistrellus* in China. The infection was PCR-detected in three organs (heart, liver, and small intestine) but no symptoms or lesions were observed, all bats from this study being sampled dead (Zhao et al., 2020). While soft ticks sampled on *R. raoultii* infected bats were also detected as infected, there is no report of *R. lusitaniae* infected ticks over the 67 sampled from this study. Nevertheless, horizontal transmission of *R. lusitaniae* remains possible according to our findings of infection in salivary glands and midgut, and presumed relapsing during a blood meal. However, we did not identified any infection in *O. erraticus* beaten mice, but we propose that different factors should be further investigated. First, aside confirming the presence of living *R. lusitaniae* in blood (not just DNA), there is may be an effective relapsing of *R. lusitaniae* but at an insufficient titer to fulfil dissemination, infection and replication in vertebrate organs. Second, an inadequate host – tick – bacteria experimental model could be unable to conceal a natural system, even if here *O. erraticus* is mainly associated to pigs but also occasionally reported feeding on rodents (Palma et al., 2013). In case of an

evidenced horizontal transmission by ticks, *R. lusitaniae* will not be the first tick maternally-transmitted endosymbionts (aside *Rickettsia* spp.) associated with opportunistic infections in vertebrates. *Coxiella*-like endosymbionts are recognized vertically transmitted obligate mutualists of ticks, yet there are reports of infection in humans, psittacines, and toucans associated with those, probably related with salivary glands infection (Angelakis et al., 2016; Shivaprasad et al., 2008; Vapniarsky et al., 2012; Woc-Colburn et al., 2008) enabling a bacterial release during blood meal. From an evolutionary perspective, these occasional horizontal transmission could favor or participate to diversification of *R. lusitaniae*. Indeed, Balti et al. (2021) described the first detection of *R. lusitaniae* in the hard tick *R. sanguineus* sampled in (uninfected) hedgehogs.

Coinfections between *Rickettsia* spp. are naturally occurring in tick species (both soft and hard ticks (Dietrich et al., 2014; Duron et al., 2017; Hornok et al., 2019; Qiu et al., 2021), but not necessarily in same specimens. In hard ticks, some coinfection events are associated with a so called interference phenomenon, defined as an inhibition of one *Rickettsia* infection or replication by the other (Socolovschi et al., 2009). It has been illustrated by lower density infection and blocking of transovarial transmission (Burgdorfer et al., 1980; Macaluso et al., 2002), usually involving one maternally transmitted and one vectored *Rickettsia*. Similar resources exploitation or antagonist evolutionary strategies are thought to facilitate emergence of competitive mechanisms (direct or indirect), enabling maintenance of one single strain infection. Similar interactions are suspected between *Rickettsia* spp. and other microorganisms (Cull et al., 2022; Gall et al., 2016; Steiner et al., 2008), as in *R. buchneri* in the hard tick *Ixodes scapularis*, for which detection of this supposed nutritional endosymbiont in salivary glands could be related to its antagonist interactions with the Lyme disease agent, *Borrelia burgdorferi* (Al-Khafaji et al., 2020; Steiner et al., 2008), and not to an infectious transmission. In another hand, previous infections might module the host immune system or modify host permissibility

to a second invading microorganism, facilitating its establishment (Zélé et al., 2018). Host – microbiome and microbiome – microbiome associations in soft ticks are largely unknown to predict such outcomes. Moreover, systemic infection of *Rickettsia* hosts' organs might not be an evidence of pathogenicity towards the arthropod or vertebrate hosts, but rather the feature of a facultative endosymbiotic relationships (e.g. nutritional or defense benefits). Presumably, mutualist nutritional symbionts are highly concentrated in ovaries and bacteriome to ensure metabolic functions, while pathogens are especially present in organs linked to their transmission (salivary glands, gut, and secretory glands). *Rickettsia lusitaniae* described unspecialized tissue tropism could thus be linked to potentially diverse interactions that it can interplay with their host, its microbiome, or its environment; *Wolbachia* being a well-studied model (Pietri et al., 2016).

While our experiments on different species evidenced a high maternal transmission rate of *R. lusitaniae*, our dynamic models demonstrated that its maintenance cannot rely only on it, as its rate is imperfect. Nevertheless our prevalence data on the Carteau island's populations of *O. maritimus* (sampled over two year, but presented together) revealed a detection of *R. lusitaniae* in 61.9 % of the specimens, suggesting, at least, not a strong diminution of its presence between years. This hypothetical maintenance of *R. lusitaniae* is then expected to be partially explained by an environment-dependent beneficial effect. Further experiments could focus on differential gene expression to explore several hypotheses regarding the nature of its advantage, as the expression of particular genes, as *rrrD* which we hypothesize to be related to a specific or generalist defense mechanisms against incoming bacteria. Finally, predictions and previous reports do not exclude the hypothesis that *R. lusitaniae* maintenance is enhanced by mixed transmission routes, not necessarily implying pathogenic infection in soft ticks' hosts. To exclude this possibility, pathogenicity and vectorial competence of *R. lusitaniae* need first to be investigated.

Tick metagenomes' sequencing did not highlight more pronounced diversification between the three *R. lusitaniae* obtained MAGs. However, it is documented that phylogenetically close *Rickettsia* strains do not necessarily share similar phenotypes. For instance, *R. felis* is an emerging insect-borne pathogens worldly detected in fleas, insects, and ticks inducing fever-like symptoms (Brown and Macaluso, 2016). Aside, *R. felis* is an obligate mutualist of the booklouse *Liposcelis bostrychophila* (Perotti et al., 2006; Yusuf and Turner, 2004). Interestingly, considering proteic similarity, reference genomes from each phenotype exhibit low divergence (Gillespie et al., 2014). *Rickettsia lusitaniae* has been detected in 16 soft tick species (17 if considering the isolate from the hard tick *Rhipicephalus*) but its characteristics could only be investigated in three tick species, especially thanks to laboratory maintained colonies. Homogeneity of here-described features and existence of phenotypically divergent strains should be investigated among other *Ornithodoros* species. Furthermore, it is essential to rule out potential over-estimation of *R. lusitaniae* presence in ticks by differentiating living bacteria / maintained infection and DNA presence linked to a blood meal on an infected vertebrate.

Acknowledgements

This study was supported by recurrent funding from CNRS and IRD. We thank the MRI platform at Montpellier University for microscopy and imaging. We also acknowledge members of the TMT (Tiques et Maladies à Tiques) group for fruitful discussions.

References

- Al-Khafaji, A.M., Armstrong, S.D., Varotto Boccazzi, I., Gaiarsa, S., Sinha, A., Li, Z., Sassera, D., Carlow, C.K.S., Epis, S., Makepeace, B.L., 2020. *Rickettsia buchneri*, symbiont of the deer tick *Ixodes scapularis*, can colonise the salivary glands of its host. Ticks Tick. Borne. Dis. 11,

101299. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101299>
- Ali, A., Numan, M., Khan, M., Aiman, O., Muñoz-Leal, S., Chitimia-Dobler, L., Labruna, M.B., Nijhof, A.M., 2022. *Ornithodoros* (Pavlovskyella) ticks associated with a *Rickettsia* sp. in Pakistan. *Parasites and Vectors* 15, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05248-0>
- Alneberg, J., Bjarnason, B.S., de Bruijn, I., Schirmer, M., Quick, J., Ijaz, U.Z., Lahti, L., Loman, N.J., Andersson, A.F., Quince, C., 2014. Binning metagenomic contigs by coverage and composition. *Nat. Methods* 11, 1144–1146. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3103>
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Angelakis, E., Mediannikov, O., Jos, S.-L., Berenger, J.-M., Parola, P., Raoult, D., 2016. *Candidatus* *Coxiella massiliensis* infection. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 285–288. <https://doi.org/10.3201/eid2202.150106>
- Balti, G., Galon, C., Derghal, M., Souguir, H., Guerbouj, S., Rhim, A., Chemkhi, J., Guizani, I., Bouattour, A., Moutailler, S., M'ghirbi, Y., 2021. *Atelerix algirus*, the north african hedgehog: Suitable wild host for infected ticks and fleas and reservoir of vector-borne pathogens in Tunisia. *Pathogens* 10. <https://doi.org/10.3390/pathogens10080953>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A., 2012. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19, 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B.M., Walker, S.C., 2015. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J. Stat. Softw.* 67. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Ben-Yosef, M., Rot, A., Mahagna, M., Kapri, E., Behar, A., Gottlieb, Y., 2020. *Coxiella*-Like endosymbiont of *Rhipicephalus sanguineus* is required for physiological processes during ontogeny. *Front. Microbiol.* 11, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00493>
- Binetruy, F., Bailly, X., Chevillon, C., Martin, O.Y., Bernasconi, M. V., Duron, O., 2019a.

- Phylogenetics of the *Spiroplasma ixodetis* endosymbiont reveals past transfers between ticks and other arthropods. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 10, 575–584.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.02.001>
- Binetruy, F., Dupraz, M., Buysse, M., Duron, O., 2019b. Surface sterilization methods impact measures of internal microbial diversity in ticks. *Parasites and Vectors* 12, 1–10.
<https://doi.org/10.1186/s13071-019-3517-5>
- Blanton, L.S., 2019. The rickettsioses: A practical update. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 33, 213–229.
<https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.010>
- Bonnet, S.I., Binetruy, F., Hernández-Jarguín, A.M., Duron, O., 2017. The tick microbiome: Why non-pathogenic microorganisms matter in tick biology and pathogen transmission. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00236>
- Borowiec, M.L., 2016. AMAS: A fast tool for alignment manipulation and computing of summary statistics. *PeerJ* 2016. <https://doi.org/10.7717/peerj.1660>
- Brown, L.D., Macaluso, K.R., 2016. *Rickettsia felis*, an emerging flea-borne rickettsiosis. *Curr. Trop. Med. Reports* 3, 27–39. <https://doi.org/10.1007/s40475-016-0070-6>
- Burgdorfer, W., Hayes, S.F., Mavros, A.J., 1980. Nonpathogenic rickettsiae in *Dermacentor andersoni*: A limiting factor for the distribution of *Rickettsia rickettsii*. *Rickettsiae Ricketts. Dis.*
- Buysse, M., Duhayon, M., Cantet, F., Bonazzi, M., Duron, O., 2021a. Vector competence of the African argasid tick *Ornithodoros moubata* for the Q fever agent *Coxiella burnetii*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009008>
- Buysse, M., Duron, O., 2021. Evidence that microbes identified as tick-borne pathogens are nutritional endosymbionts. *Cell.* <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.053>
- Buysse, M., Duron, O., 2020. Two novel *Rickettsia* species of soft ticks in North Africa: ‘*Candidatus Rickettsia africaseptentrionalis*’ and ‘*Candidatus Rickettsia mauretana*.’ *Ticks Tick. Borne. Dis.* 11, 101376. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101376>
- Buysse, M., Floriano, A.M., Gottlieb, Y., Nardi, T., Comandatore, F., Olivieri, E., Giannetto, A., Palomar, A.M., Makepeace, B.L., Bazzocchi, C., Cafiso, A., Sasser, D., Duron, O., 2021b. A

- dual endosymbiosis supports nutritional adaptation to hematophagy in the invasive tick *Hyalomma marginatum*. *Elife* 10, 1–19. <https://doi.org/10.7554/eLife.72747>
- Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J.M., Gabaldón, T., 2009. trimAl: A tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* 25, 1972–1973. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348>
- Chegeni, A.H., 2021. *Ornithodoros* (Pavlovskyella) *verrucosus* (Acari: Argasidae) infected to novel spotted fever group rickettsiae (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in Iran. *Syst. Appl. Acarol.* 26, 2426–2432. <https://doi.org/10.11158/saa.26.12.17>
- Chen, D.Q., Campbell, B.C., Purcell, A.H., 1996. A new *Rickettsia* from a herbivorous insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Harris). *Curr. Microbiol.* 33, 123–128. <https://doi.org/10.1007/s002849900086>
- Chitanga, S., Chambaro, H.M., Moonga, L.C., Hayashida, K., Yamagishi, J., Muleya, W., Changula, K., Mubemba, B., Simbotwe, M., Squarre, D., Fandamu, P., Nalubamba, K.S., Qiu, Y., Hirofumi, S., Simulundu, E., 2021. *Rickettsia lusitaniae* in *Ornithodoros porcinus* ticks, Zambia. *Pathogens* 10, 1306. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101306>
- Colombo, V.C., Montani, M.E., Pavé, R., Antoniazzi, L.R., Gamboa, M.D., Fasano, A.A., Félix, M.L., Nava, S., Venzal, J.M., 2020. First detection of “*Candidatus Rickettsia wissemanni*” in *Ornithodoros hasei* (Schulze, 1935) (Acari: Argasidae) from Argentina. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 11, 101442. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101442>
- Cull, B., Burkhardt, N.Y., Wang, X.R., Thorpe, C.J., Oliver, J.D., Kurtti, T.J., Munderloh, U.G., 2022. The *Ixodes scapularis* symbiont *Rickettsia buchneri* inhibits growth of pathogenic Rickettsiaceae in tick cells: Implications for vector competence. *Front. Vet. Sci.* 8, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.748427>
- Cutler, S.J., Browning, P., Scott, J.C., 2006. *Ornithodoros moubata*, a soft tick vector for *Rickettsia* in East Africa? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078, 373–377. <https://doi.org/10.1196/annals.1374.074>
- Darling, A.C.E., Mau, B., Blattner, F.R., Perna, N.T., 2004. Mauve: Multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res.* 14, 1394–1403.

<https://doi.org/10.1101/gr.2289704>

- Darriba, Di., Posada, D., Kozlov, A.M., Stamatakis, A., Morel, B., Flouri, T., 2020. ModelTest-NG: A new and scalable tool for the selection of DNA and protein evolutionary models. *Mol. Biol. Evol.* 37, 291–294. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz189>
- Dietrich, M., Lebarbenchon, C., Jaeger, A., Le Rouzic, C., Bastien, M., Lagadec, E., McCoy, K.D., Pascalis, H., Le Corre, M., Dellagi, K., Tortosa, P., 2014. *Rickettsia* spp. in seabird ticks from Western Indian Ocean islands, 2011-2012. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 838–842. <https://doi.org/10.3201/eid2005.131088>
- Diop, A., Raoult, D., Fournier, P.E., 2018. Rickettsial genomics and the paradigm of genome reduction associated with increased virulence. *Microbes Infect.* 20, 401–409. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.11.009>
- Duron, O., 2013. Lateral transfers of insertion sequences between *Wolbachia*, *Cardinium* and *Rickettsia* bacterial endosymbionts. *Heredity (Edinb.)*. 111, 330–337. <https://doi.org/10.1038/hdy.2013.56>
- Duron, O., Binetruy, F., Noel, V., Cremaschi, J., McCoy, K., Arnathau, C., Plantard, O., Goolsby, J., Perez De Leon, A.A., Heylen, D.J.A., Raoul Van Oosten, A., Gottlieb, Y., Baneth, G., Guglielmone, A.A., Estrada-Pena, A., Opara, M.N., Zenner, L., Vavre, F., Chevillon, C., 2017. Evolutionary changes in symbiont community structure in ticks. *Mol. Ecol.* 26, 2905–2921. <https://doi.org/10.1111/mec.14094>
- Duron, O., Gottlieb, Y., 2020. Convergence of nutritional symbioses in obligate blood-feeders. *Trends Parasitol.* <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.07.007>
- Duron, O., Morel, O., Noël, V., Buysse, M., Binetruy, F., Lancelot, R., Loire, E., Ménard, C., Bouchez, O., Vavre, F., Vial, L., 2018. Tick-bacteria mutualism depends on B vitamin synthesis pathways. *Curr. Biol.* 28, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.04.038>
- El Karkouri, K., Ghigo, E., Raoult, D., Fournier, P.E., 2022. Genomic evolution and adaptation of arthropod-associated *Rickettsia*. *Sci. Rep.* 12, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07725-z>
- Emms, D.M., Kelly, S., 2019. OrthoFinder: Phylogenetic orthology inference for comparative

- genomics. *Genome Biol.* 20, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1832-y>
- Eren, A.M., Kiefl, E., Shaiber, A., Veseli, I., Miller, S.E., Schechter, M.S., Fink, I., Pan, J.N., Yousef, M., Fogarty, E.C., Trigodet, F., Watson, A.R., Esen, Ö.C., Moore, R.M., Clayssen, Q., Lee, M.D., Kivenson, V., Graham, E.D., Merrill, B.D., Karkman, A., Blankenberg, D., Eppley, J.M., Sjödin, A., Scott, J.J., Vázquez-Campos, X., McKay, L.J., McDaniel, E.A., Stevens, S.L.R., Anderson, R.E., Fuessel, J., Fernandez-Guerra, A., Maignien, L., Delmont, T.O., Willis, A.D., 2021. Community-led, integrated, reproducible multi-omics with anvi'o. *Nat. Microbiol.* 6, 3–6. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00834-3>
- Feng, J., Wu, M., Wulan, Huang, T., Zhang, J., Renbatu, N., Riletu, G., 2019. Identification of two genotypes of *Argas persicus* and associated rickettsia-specific genes from different regions of inner Mongolia. *J. Parasitol.* 105, 92–101. <https://doi.org/10.1645/18-27>
- Florian Hartig, 2022. DHARMA: Residual diagnostics for hierarchical (multi-level/mixed) regression models.
- Fongsaran, C., Jirakanwisal, K., Tongluan, N., Latour, A., Healy, S., Christofferson, R.C., Macaluso, K.R., 2022. The role of cofeeding arthropods in the transmission of *Rickettsia felis*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 16, 1–12. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0010576>
- Fox, J., Weisberg, S., 2019. *An R Companion to Applied Regression*, Third. ed. Sage, Thousand Oaks {CA}.
- Fukatsu, T., Shimada, M., 1999. Molecular characterization of *Rickettsia* sp. in a bruchid beetle, *Kytorhinus sharpianus* (Coleoptera: Bruchidae). *Appl. Entomol. Zool.* 34, 391–397. <https://doi.org/https://doi.org/10.1303/aez.34.391>
- Gall, C.A., Reif, K.E., Scoles, G.A., Mason, K.L., Mousel, M., Noh, S.M., Brayton, K.A., 2016. The bacterial microbiome of *Dermacentor andersoni* ticks influences pathogen susceptibility. *ISME J.* 10, 1846–1855. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.266>
- Gaudreault, N.N., Madden, D.W., Wilson, W.C., Trujillo, J.D., Richt, J.A., 2020. African swine fever virus: An emerging DNA arbovirus. *Front. Vet. Sci.* 7, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00215>

- Gerhart, J.G., Moses, A.S., Raghavan, R., 2016. A *Francisella*-like endosymbiont in the Gulf Coast tick evolved from a mammalian pathogen. *Sci. Rep.* 6, 1–6. <https://doi.org/10.1038/srep33670>
- Gillespie, J.J., Drisco, T.P., Verhoeve, V.I., Utsuki, T., Husseneder, C., Chouljenko, V.N., Azad, A.F., MacAluso, K.R., 2014. Genomic diversification in strains of *Rickettsia felis* isolated from different arthropods. *Genome Biol. Evol.* 7, 35–56. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu262>
- Gillespie, J.J., Joardar, V., Williams, K.P., Driscoll, T., Hostetler, J.B., Nordberg, E., Shukla, M., Walenz, B., Hill, C.A., Nene, V.M., Azad, A.F., Sobral, B.W., Caler, E., 2012. A *Rickettsia* genome overrun by mobile genetic elements provides insight into the acquisition of genes characteristic of an obligate intracellular lifestyle. *J. Bacteriol.* 194, 376–394. <https://doi.org/10.1128/JB.06244-11>
- Gillespie, J.J., Kaur, S.J., Sayeedur Rahman, M., Rennoll-Bankert, K., Sears, K.T., Beier-Sexton, M., Azad, A.F., 2015. Secretome of obligate intracellular *Rickettsia*. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 47–80. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12084>
- Gottlieb, Y., Lalar, I., Klasson, L., 2015. Distinctive genome reduction rates revealed by genomic analyses of two *Coxiella*-like endosymbionts in ticks. *Genome Biol. Evol.* 7, 1779–1796. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv108>
- Guizzo, M.G., Parizi, L.F., Nunes, R.D., Schama, R., Albano, R.M., Tirloni, L., Oldiges, D.P., Vieira, R.P., Oliveira, W.H.C., Leite, M.D.S., Gonzales, S.A., Farber, M., Martins, O., Vaz, I.D.S., Oliveira, P.L., 2017. A *Coxiella* mutualist symbiont is essential to the development of *Rhipicephalus microplus*. *Sci. Rep.* 7, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17309-x>
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., Tesler, G., 2013. QUASt: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29, 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Han, S.W., Chae, J.B., Jo, Y.S., Cho, Y.K., Kang, J.G., Shin, N.S., Youn, H.J., Youn, H.Y., Nam, H.M., Kim, H.J., Kang, H.E., Chae, J.S., 2021. First detection of *Borrelia* and *Rickettsia* species from *Ornithodoros* ticks in the Republic of Korea. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 12, 101689. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101689>
- Hornok, S., Szoke, K., Meli, M.L., Sandor, A.D., Gorfol, T., Estok, P., Wang, Y., Tu, V.T., Kovats,

- D., Boldogh, S.A., Corduneanu, A., Sulyok, K.M., Gyuranecz, M., Kontschan, J., Takacs, N., Halajian, A., Epis, S., Hofmann-Lehmann, R., 2019. Molecular detection of vector-borne bacteria in bat ticks (Acari: Ixodidae, Argasidae) from eight countries of the Old and New Worlds. *Parasit. Vectors* 12, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3303-4>
- Hothorn, T., Zeileis, A., Farebrother, R.W., Cummins, C., Millo, G., Mitchell, D., 2022. Package “lmtest.”
- Hugoson, E., Lam, W.T., Guy, L., 2020. MiComplete: Weighted quality evaluation of assembled microbial genomes. *Bioinformatics* 36, 936–937. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz664>
- Hunter, D.J., Torkelson, J.L., Bodnar, J., Mortazavi, B., Laurent, T., Deason, J., Thephavongsa, K., Zhong, J., 2015. The *Rickettsia* endosymbiont of *Ixodes pacificus* contains all the genes of de novo folate biosynthesis. *PLoS One* 10, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144552>
- Izzard, L., Chung, M., Dunning Hotopp, J., Vincent, G., Paris, D., Graves, S., Stenos, J., 2018. Isolation of a divergent strain of *Rickettsia japonica* from Dew’s Australian bat Argasid ticks (*Argas (Carios) dewae*) in Victoria, Australia. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 9, 1484–1488. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.07.007>
- Jain, C., Rodriguez-R, L.M., Phillippy, A.M., Konstantinidis, K.T., Aluru, S., 2018. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nat. Commun.* 9, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9>
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K.I., Miyata, T., 2002. MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 30, 3059–3066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>
- Kawabata, H., Ando, S., Kishimoto, T., Kurane, I., Takano, A., Nogami, S., Fujita, H., Tsurumi, M., Nakamura, N., Sato, F., Takahashi, M., Ushijima, Y., Fukunaga, M., Watanabe, H., 2006. First detection of *Rickettsia* in soft-bodied ticks associated with seabirds, Japan. *Microbiol. Immunol.* 50, 403–406. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2006.tb03807.x>
- Kim, D., Park, S., Chun, J., 2021. Introducing EzAAI: A pipeline for high throughput calculations of prokaryotic average amino acid identity. *J. Microbiol.* 59, 476–480.

<https://doi.org/10.1007/s12275-021-1154-0>

- Kim, H.-C., Jiang, J., Hang, J., Kim, S.Y., Yun, S.-M., Park, C., Kim, M., Chong, S.-T., Farris, C.M., Richards, A.L., Klein, T.A., 2021. Detection of *Rickettsia lusitaniae* among *Ornithodoros sawaii* soft ticks collected from Japanese Murrelet seabird nest material from Gugul Island, Republic of Korea. *J. Med. Entomol.* 1–8. <https://doi.org/10.1093/jme/tjab005>
- Kim, H.C., Kim, M., Kwon, Y.S., Hong, M.J., Park, C.U., Yun, S.M., Lee, W.J., Chong, S.T., Hang, J., Klein, T.A., Robbins, R.G., 2017. New distribution and host records for *Ornithodoros capensis* Neumann and *Ornithodoros sawaii* Kitaoka and Suzuki (Acari: Ixodida: Argasidae) collected from Black-tailed Gull, *Larus crassirostris*, nestlings and nest soil and litter on Hong and Nan Islands, *R. Syst. Appl. Acarol.* 22, 1899–1909. <https://doi.org/10.11158/saa.22.11.9>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lafri, I., Leulmi, H., Baziz-Neffah, F., Lalout, R., Mohamed, C., Mohamed, K., Parola, P., Bitam, I., 2015. Detection of a novel *Rickettsia* sp. in soft ticks (Acari: Argasidae) in Algeria. *Microbes Infect.* 17, 859–861. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.09.010>
- Laukaitis, H.J., Macaluso, K.R., 2021. Unpacking the intricacies of *Rickettsia*–vector interactions. *Trends Parasitol.* 37, 734–746. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.05.008>
- Lawson, E.T., Mousseau, T.A., Klaper, R., Hunter, M.D., Werren, J.H., 2001. *Rickettsia* associated with male-killing in a buprestid beetle. *Heredity (Edinb.)* 86, 497–505. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2001.00848.x>
- Levin, M.L., Killmaster, L., Eremeeva, M.E., Dasch, G.A., 2009. Effects of *Rickettsia conorii* infection on the survival of *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Clin. Microbiol. Infect.* 15, 277–278. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02234.x>
- Li, D., Liu, C.M., Luo, R., Sadakane, K., Lam, T.W., 2015. MEGAHIT: An ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics* 31, 1674–1676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv033>

- Lüdecke, D., 2022. sjPlot: Data visualization for statistics in social science.
- Luz, H.R., Muñoz-Leal, S., de Carvalho, W.D., Castro, I.J., Xavier, B.S., Toledo, J.J., Hilário, R., Acosta, I.C.L., Faccini, J.L.H., Labruna, M.B., 2019. Detection of “*Candidatus Rickettsia wissemanii*” in ticks parasitizing bats (Mammalia: Chiroptera) in the northern Brazilian Amazon. *Parasitol. Res.* 118, 3185–3189. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06442-3>
- Macaluso, K.R., Sonenshine, D.E., Ceraul, S.M., Azad, A.F., 2002. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second *Rickettsia*. *J. Med. Entomol.* 39, 809–813. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-39.6.809>
- McGinn, J., Lamason, R.L., 2021. The enigmatic biology of rickettsiae: Recent advances, open questions and outlook. *Pathog. Dis.* 79, 1–14. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftab019>
- Mendiburu, F. de, 2021. Package “agricolae.”
- Milhano, N., Palma, M., Marcili, A., Núncio, M.S., de Carvalho, I.L., De Sousa, R., 2014. *Rickettsia lusitaniae* sp. nov. isolated from the soft tick *Ornithodoros erraticus* (Acarina: Argasidae). *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 37, 189–193. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2014.01.006>
- Moreira-Soto, R.D., Moreira-Soto, A., Corrales-Aguilar, E., Calderón-Arguedas, Ó., Troyo, A., 2017. ‘*Candidatus Rickettsia nicoyana*’: A novel *Rickettsia* species isolated from *Ornithodoros knoxjonesi* in Costa Rica. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 8, 532–536. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.02.015>
- Muñoz-Leal, S., Marcili, A., Fuentes-Castillo, D., Ayala, M., Labruna, M.B., 2019. A relapsing fever *Borrelia* and spotted fever *Rickettsia* in ticks from an Andean valley, central Chile. *Exp. Appl. Acarol.* 78, 403–420. <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00389-x>
- Murray, G.G.R., Weinert, L.A., Rhule, E.L., Welch, J.J., 2016. The phylogeny of *Rickettsia* using different evolutionary signatures: How tree-like is bacterial evolution? *Syst. Biol.* 65, 265–279. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syv084>
- Nardi, T., Olivieri, E., Kariuki, E., Sasser, D., Castelli, M., 2021. Sequence of a *Coxiella* endosymbiont of the tick *Amblyomma nuttalli* suggests a pattern of convergent genome reduction

- in the *Coxiella* genus. *Genome Biol. Evol.* 13, 1–7. <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa253>
- Niebylski, M.L., Peacock, M.G., Schwan, T.G., 1999. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on its tick vector (*Dermacentor andersoni*). *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 773–778.
<https://doi.org/10.1128/aem.65.2.773-778.1999>
- Novakova, M., Costa, F.B., Krause, F., Literak, I., Labruna, M.B., 2016. *Rickettsia vini* n. sp. (Rickettsiaceae) infecting the tick *Ixodes arboricola* (Acari: Ixodidae). *Parasites and Vectors* 9, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1742-8>
- Olivieri, E., Epis, S., Castelli, M., Varotto Boccazzi, I., Romeo, C., Desirò, A., Bazzocchi, C., Bandi, C., Sasser, D., 2019. Tissue tropism and metabolic pathways of *Midichloria* mitochondria suggest tissue-specific functions in the symbiosis with *Ixodes ricinus*. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 10, 1070–1077. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.05.019>
- Pader, V., Buniak, J.N., Abdissa, A., Adamu, H., Tolosa, T., Gashaw, A., Cutler, R.R., Cutler, S.J., 2012. *Candidatus* *Rickettsia hoogstraalii* in Ethiopian *Argas persicus* ticks. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 3, 338–345. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.10.021>
- Page, A.J., Cummins, C.A., Hunt, M., Wong, V.K., Reuter, S., Holden, M.T.G., Fookes, M., Falush, D., Keane, J.A., Parkhill, J., 2015. Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics* 31, 3691–3693. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>
- Palma, M., de Carvalho, I., Osório, H., Zé-Zé, L., Cutler, S.J., Nuncio, M.S., 2013. Portuguese hosts for *Ornithodoros erraticus* ticks. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 13, 775–777.
<https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1070>
- Palomar, A.M., Veiga, J., Portillo, A., Santibáñez, S., Václav, R., Santibáñez, P., Oteo, J.A., Valera, F., 2021. Novel genotypes of nidicolous *Argas* ticks and their associated microorganisms from Spain. *Front. Vet. Sci.* 8, 637837. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.637837>
- Parola, P., Paddock, C.D., Socolovschi, C., Labruna, M.B., Mediannikov, O., Kernif, T., Abdad, M.Y., Stenos, J., Bitam, I., Fournier, P.E., Raoult, D., 2013. Update on tick-borne rickettsioses around the world: A geographic approach. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 657–702.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00032-13>

- Pellow, D., Zorea, A., Probst, M., Furman, O., Segal, A., Mizrahi, I., Shamir, R., 2021. SCAPP: An algorithm for improved plasmid assembly in metagenomes. *Microbiome* 9, 1–12.
<https://doi.org/10.1186/s40168-021-01068-z>
- Perlman, Steve J, Hunter, M.S., Zchori-Fein, E., 2006. The emerging diversity of *Rickettsia*. *Proc. R. Soc. B* 273, 2097–2106. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3541>
- Perotti, bacteria M.A., Clarke, H.K., Turner, B.D., Braig, H.R., Perotti, bacteria M.A., Clarke, H.K., Turner, B.D., Braig, H.R., 2006. *Rickettsia* as obligate and mycetomic. *FASEB J.* 20, 2372–2374. <https://doi.org/10.1096/fj.06-5870fje>
- Pietri, J.E., DeBruhl, H., Sullivan, W., 2016. The rich somatic life of *Wolbachia*. *Microbiologyopen* 5, 923–936. <https://doi.org/10.1002/mbo3.390>
- Pilgrim, J., Thongprem, P., Davison, H.R., Siozios, S., Baylis, M., Zakharov, E. V., Ratnasingham, S., Dewaard, J.R., Macadam, C.R., Smith, M.A., Hurst, G.D.D., 2021. Torix *Rickettsia* are widespread in arthropods and reflect a neglected symbiosis. *Gigascience* 10, 1–21.
<https://doi.org/10.1093/gigascience/giab021>
- Pokutnaya, D., Molaei, G., Weinberger, D.M., Vossbrinck, C.R., Diaz, A.J., 2020. Prevalence of infection and co-infection and presence of Rickettsial endosymbionts in *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) in Connecticut, USA. *J. Parasitol.* 106, 30–37. <https://doi.org/10.1645/19-116>
- Qiu, Y., Simuunza, M., Kajihara, M., Chambaro, H., Harima, H., Eto, Y., Simulundu, E., Squarre, D., Torii, S., 2021. Ticks and tick-borne diseases screening of tick-borne pathogens in argasid ticks in Zambia : Expansion of the geographic distribution of *Rickettsia lusitaniae* and *Rickettsia hoogstraalii* and detection of putative novel *Anaplasma* species. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 12, 101720. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101720>
- R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. R Core Team., 2019.
- Randolph, S.E., Gern, L., Nuttall, P.A., 1996. Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitol. Today* 12, 472–479.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(96\)10072-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-4758(96)10072-7)

- Rasgon, J.L., Scott, T.W., 2003. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in the California *Culex pipiens* mosquito species complex: Parameter estimates and infection dynamics in natural populations. *Genetics* 165, 2029–2038. <https://doi.org/10.1093/genetics/165.4.2029>
- Reeves, W.K., Loftis, A.D., Sanders, F., Spinks, M.D., Wills, W., Denison, A.M., Dasch, G.A., 2006. *Borrelia*, *Coxiella*, and *Rickettsia* in *Carios capensis* (Acari: Argasidae) from a brown pelican (*Pelecanus occidentalis*) rookery in South Carolina, USA. *Exp. Appl. Acarol.* 39, 321–329. <https://doi.org/10.1007/s10493-006-9012-7>
- Roosaare, M., Puustusmaa, M., Möls, M., Vaher, M., Remm, M., 2018. PlasmidSeeker: Identification of known plasmids from bacterial whole genome sequencing reads. *PeerJ* 6, e4588. <https://doi.org/10.7717/peerj.4588>
- RStudio: Integrated Development for R. RStudio Team., 2019.
- Ryan M. Hope, 2022. Package “Rmisc.”
- Sánchez-Montes, S., Guzmán-Cornejo, C., Martínez-Nájera, Y., Becker, I., Venzal, J.M., Labruna, M.B., 2016. *Rickettsia lusitaniae* associated with *Ornithodoros yumatensis* (Acari: Argasidae) from two caves in Yucatan, Mexico. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 7, 1097–1101. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.09.003>
- Seemann, T., 2014. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Shivaprasad, A., Shivaprasad, H.L., Cadenas, A.F.M.B., Diab, B.S.S., Nordhausen, C.R., Bradway, D.D., 2008. *Coxiella*-like infection in psittacines and a toucan. *Avian Dis.* 52, 426–432. <https://doi.org/10.1637/8192-120707-Reg>
- Smith, T.A., Driscoll, T., Gillespie, J.J., Raghavan, R., 2015. A *Coxiella*-like endosymbiont is a potential vitamin source for the lone star tick. *Genome Biol. Evol.* 7, 831–838. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv016>
- Socolovschi, C., Kernif, T., Raoult, D., Parola, P., 2012. *Borrelia*, *Rickettsia*, and *Ehrlichia* species in bat ticks, France, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1966–1975. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3201/eid1812.111237>

- Socolovschi, C., Mediannikov, O., Raoult, D., Parola, P., 2009. The relationship between spotted fever group rickettsiae and ixodid ticks. *Vet. Res.* 40. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009017>
- Stamatakis, A., 2014. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30, 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Steiner, F.E., Pinger, R.R., Vann, C.N., Grindle, N., Civitello, D., Clay, K., Fuqua, C., 2008. Infection and co-infection rates of *Anaplasma phagocytophilum* variants, *Babesia* spp., *Borrelia burgdorferi*, and the rickettsial endosymbiont in *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) from sites in Indiana, Maine, Pennsylvania, and Wisconsin. *J. Med. Entomol.* 45, 289–297. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2008\)45\[289:iacroa\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2008)45[289:iacroa]2.0.co;2)
- Stothard, P., Wishart, D.S., 2005. Circular genome visualization and exploration using CGView. *Bioinformatics* 21, 537–539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti054>
- Szokoli, F., Castelli, M., Sabaneyeva, E., Schrallhammer, M., Krenek, S., Doak, T.G., Berendonk, T.U., Petroni, G., 2016. Disentangling the taxonomy of Rickettsiales and description of two novel symbionts (“*Candidatus* Bealeia paramacronuclearis” and “*Candidatus* Fokinia cryptica”) sharing the cytoplasm of the ciliate protist *Paramecium biaurelia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 7236–7247. <https://doi.org/10.1128/AEM.02284-16>
- Tahir, D., Socolovschi, C., Marié, J. Lou, Ganay, G., Berenger, J.M., Bompar, J.M., Blanchet, D., Cheuret, M., Mediannikov, O., Raoult, D., Davoust, B., Parola, P., 2016. New *Rickettsia* species in soft ticks *Ornithodoros hasei* collected from bats in French Guiana. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 7, 1089–1096. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.09.004>
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2003. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr. Protoc. Bioinforma.* 2.3.1-2.3.22. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0203s00>
- Tomassone, L., Portillo, A., Nováková, M., Sousa, R. De, Oteo, J.A., 2018. Neglected aspects of tick-borne rickettsioses. *Parasites and Vectors* 11, 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s13071-018-2856-y>
- Trape, J.F., Diatta, G., Arnathau, C., Bitam, I., Sarih, M., Belghyti, D., Bouattour, A., Elguero, E., Vial, L., Mané, Y., Baldé, C., Pugnolle, F., Chauvancy, G., Mahé, G., Granjon, L., Duplantier,

- J.M., Durand, P., Renaud, F., 2013. The epidemiology and geographic distribution of relapsing fever borreliosis in West and North Africa, with a review of the *Ornithodoros erraticus* complex (Acari: Ixodida). PLoS One 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078473>
- Turelli, M., Hoffmann, A.A., 1999. Microbe-induced cytoplasmic incompatibility as a mechanism for introducing transgenes into arthropod populations. Insect Mol. Biol. 8, 243–255. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.1999.820243.x>
- Vapniarsky, N., Barr, B.C., Murphy, B., 2012. Systemic *Coxiella*-like infection with myocarditis and hepatitis in an Eclectus Parrot (*Eclectus roratus*). Vet. Pathol. 49, 717–722. <https://doi.org/10.1177/0300985811409251>
- Von der Schulenburg, J.H.G., Habig, M., Sloggett, J.J., Webberley, K.M., Bertrand, D., Hurst, G.D.D., Majerus, M.E.N., 2001. Incidence of male-killing *Rickettsia* spp. (α -proteobacteria) in the ten-spot ladybird beetle *Adalia decempunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae). Appl. Environ. Microbiol. 67, 270–277. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.270-277.2001>
- Weinert, L.A., 2015. The diversity and phylogeny of *Rickettsia*, in: Morand, S., Krasnov, B.R., Littlewood, D.T.J. (Eds.), Parasite diversity and diversification, evolutionary ecology meets phylogenetics. University Printing House Cambridge, pp. 150-.
- Weinert, L.A., Araujo-Jnr, E. V., Ahmed, M.Z., Welch, J.J., 2015. The incidence of bacterial endosymbionts in terrestrial arthropods. Proc. R. Soc. B 282. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0249>
- Weinert, L.A., Werren, J.H., Aebi, A., Stone, G.N., Jiggins, F.M., 2009. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. BMC Biol. 7, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-6>
- Werren, J.H., Hurst, G.D.D., Zhang, W., Breeuwer, J.A.J., Stouthamer, R., Majerus, M.E.N., 1994. Rickettsial relative associated with male killing in the ladybird beetle (*Adalia bipunctata*). J. Bacteriol. 176, 388–394. <https://doi.org/10.1128/jb.176.2.388-394.1994>
- Wick, R.R., Schultz, M.B., Zobel, J., Holt, K.E., 2015. Bandage: Interactive visualization of *de novo* genome assemblies. Bioinformatics 31, 3350–3352. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv383>

- Woc-Colburn, A.M., Garner, M.M., Bradway, D., West, G., D'Agostino, J., Trupkiewicz, J., Barr, B., Anderson, S.E., Rurangirwa, F.R., Nordhausen, R.W., 2008. Fatal coxiellosis in Swainson's blue mountain rainbow lorikeets (*Trichoglossus haematodus moluccanus*). *Vet. Pathol.* 45, 247–254. <https://doi.org/10.1354/vp.45-2-247>
- Yan, P., Qiu, Z., Zhang, T., Li, Y., Wang, W., Li, M., Yu, Z., Liu, J., 2019. Microbial diversity in the tick *Argas japonicus* (Acari: Argasidae) with a focus on *Rickettsia* pathogens. *Med. Vet. Entomol.* 33, 327–335. <https://doi.org/10.1111/mve.12373>
- Yen, W.Y., Stern, K., Mishra, S., Helminiak, L., Sanchez-Vicente, S., Kim, H.K., 2021. Virulence potential of *Rickettsia amblyommatis* for spotted fever pathogenesis in mice. *Pathog. Dis.* 79, 1–9. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftab024>
- Yusuf, M., Turner, B.S., 2004. Characterisation of *Wolbachia*-like bacteria isolated from the parthenogenetic stored-product pest psocid *Liposcelis bostrychophila* (Badonnel) (Psocoptera). *J. Stored Prod. Res.* 40, 207–225.
- Zélé, F., Magalhães, S., Kéfi, S., Duncan, A.B., 2018. Ecology and evolution of facilitation among symbionts. *Nat. Commun.* 9, 4869. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06779-w>
- Zhao, Shuo, Yang, M., Liu, G., Hornok, S., Zhao, Shanshan, Sang, C., Tan, W., Wang, Y., 2020. Rickettsiae in the common pipistrelle *Pipistrellus pipistrellus* (Chiroptera: Vespertilionidae) and the bat soft tick *Argas vespertilionis* (Ixodida: Argasidae). *Parasit. Vectors* 13, 10. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3885-x>

Tables

Table 1. References of *Rickettsia* spp. described in soft ticks from previous studies.

<i>Rickettsia</i> species reported	Tick species associated and origin	Publications
<i>Rickettsia</i> sp.	<i>Ornithodoros capensis</i> , in seabirds nest, Europa / Tromelin / Reunion islands	Dietrich et al., 2014
<i>Rickettsia</i> sp.	<i>O. faini</i> , cave, Zambia	Qiu et al., 2021
<i>Rickettsia</i> sp.	<i>Argas vespertilionis</i> , in a bat-infested house, France	Socolovschi et al., 2012
<i>Rickettsia</i> sp.	<i>Ornithodoros</i> sp., on <i>Phyllotis darwini</i> rodents, Chile	Muñoz-Leal et al., 2019
<i>Rickettsia</i> sp.	<i>O. rietcorreae</i> , Brazil	Direct submission (Ogrzewalska)
<i>Rickettsia</i> sp.	<i>O. moubata</i> , in dwellings in villages, Tanzania	Cutler et al., 2006
<i>Rickettsia</i> sp.	<i>A. walkerae</i> , chicken coop, Zambia	Qiu et al., 2021
<i>Rickettsia</i> sp.	<i>O. faini</i> , Zambia	Direct submission (Qui)
<i>Rickettsia</i> sp.	<i>O. parkeri</i> , California	Direct submission (Osborne et al.)
<i>Rickettsia</i> sp.	<i>O. faccinii</i> , Brazil	Direct submission (Peckle et al.)
<i>Rickettsia</i> sp.	<i>Ornithodoros</i> sp., in <i>Larus crassirostris</i> seabird nests, South Korea	Han et al., 2021
<i>Rickettsia</i> sp.	<i>Argas</i> sp., nest used by European rollers (<i>Coracias garrulus</i>), Spain	Palomar et al., 2021
<i>Rickettsia</i> sp.	<i>Ornithodoros</i> sp., in animal shelters, Pakistan	Ali et al., 2022
<i>Rickettsia</i> sp.	<i>Ornithodoros</i> sp., Pakistan	Direct submission (Ali)
<i>Rickettsia</i> sp.	<i>O. amblyus</i> , <i>O. costalis</i> , <i>O. maritimus</i> , <i>O. moubata</i> , <i>O. normandi</i> , <i>P. peruvianus</i> , <i>O. rupestris</i> , <i>O. sonrai</i>	Duron et al. 2017
<i>Rickettsia</i> sp.	<i>O. verrucosus</i> , in porcupine burrow, Iran	Chegeni, 2021
<i>Rickettsia</i> sp.	<i>A. japonicus</i> , China	Yan et al., 2019
<i>Rickettsia</i> sp.	<i>O. capensis</i> , <i>O. erraticus</i> , <i>O. rupestris</i> , Algeria	Lafri et al., 2015
<i>Rickettsia</i> sp.	<i>A. persicus</i> , Kazakhstan	Direct submission (Dong et al)
<i>Rickettsia</i> sp.	<i>O. capensis</i> , in seabird nest, Japan	Kawabata et al., 2006
<i>Rickettsia lusitaniae</i>	<i>O. erraticus</i> , in pigpens, Portugal	Milhano et al., 2014
<i>Rickettsia lusitaniae</i>	<i>O. yumatensis</i> , in caves, Mexico	Sánchez-Montes et al., 2016
<i>Rickettsia lusitaniae</i>	<i>Ornithodoros</i> sp., Mexico	Hornok et al., 2019
<i>Rickettsia lusitaniae</i>	<i>A. vespertilionis</i> , on <i>Vespertilio murinus</i> bats, China	Hornok et al., 2019
<i>Rickettsia lusitaniae</i>	Carcasse of <i>Pipistrellus pipistrellus</i> bat	Zhao et al., 2020
<i>Rickettsia lusitaniae</i>	Unknown tick species, in a rodent burrow, Turkmenia	Direct submission (Bondarenko et al.)
<i>Rickettsia lusitaniae</i>	<i>O. papillipes</i> , Uzbekistan	Direct submission (Bondarenko et al.)
<i>Rickettsia lusitaniae</i>	<i>O. papillipes</i> , Iran	Direct submission (Bondarenko et al.)
<i>Rickettsia lusitaniae</i>	<i>O. porcinus</i> , in <i>Phacochoerus africanus</i> warthog burrows, Zambia	Chitanga et al., 2021
<i>Candidatus Rickettsia nicoyana</i>	<i>O. knoxjonesi</i> , on <i>Balantiopteryx plicata</i> bats, Costa Rica	Moreira-Soto et al., 2017
<i>Cand. Rickettsia wissemannii</i>	<i>O. hasei</i> , on <i>Noctilio albiventris</i> bats, French Guiana	Tahir et al., 2016
<i>Cand. Rickettsia wissemannii</i>	<i>O. hasei</i> , Argentina	Colombo et al., 2020
<i>Cand. Rickettsia wissemannii</i>	<i>O. hasei</i> , Brazilian Amazon	Luz et al., 2019
<i>Cand. R. mauretana</i>	<i>O. occidentalis</i> , in rodent burrows, Morocco	Buyse and Duron, 2020
<i>Cand. R. africaseptentrionalis</i>	<i>O. erraticus</i> , <i>O. normandi</i> in rodent burrows, Algeria, Tunisia	Buyse and Duron, 2020
<i>Rickettsia argasii</i>	<i>A. dewae</i> , in nesting boxes of bats, Australia	Izzard et al., 2018
<i>Rickettsia hoogstraalii</i>	<i>A. persicus</i> , in cracks and crevices of human dwellings, Ethiopia	Pader et al., 2012
<i>Rickettsia felis</i>	<i>O. capensis</i> , in brown pelican nests (<i>Pelecanus occidentalis</i>), United States of America	Reeves et al., 2006
<i>Rickettsia bellii</i>	<i>O. talaje</i> , Mexico	Direct submission (Guzman-Cornejo et al.)
<i>Rickettsia bellii</i>	<i>A. persicus</i> , in henhouses, China	Feng et al., 2019
<i>Rickettsia bellii</i>	<i>O. capensis</i> , in seabirds nest, Reunion island	Dietrich et al., 2014

Table 2. Origin of our tick collection further used in the characterization of *R. lusitaniae*. Prevalence of *R. lusitaniae* from different tick species, geographic origin, and between females and males are detailed. Prevalence in species and/or populations for which tick specimens were only used in our phylogenetic analyses are not specified, as not relevant. ND: undetermined; ^a: tick species for which *Rickettsia*-infected specimens were reported by Duron et al. (2017) and Buysse and Duron (2020).

Tick species	Sampling sites	Ticks' host species or habitat	N total	<i>R. lusitaniae</i> prevalence (infected / tested specimens)	<i>R. lusitaniae</i> prevalence in female ticks (infected / tested specimens)	<i>R. lusitaniae</i> prevalence in male ticks (infected / tested specimens)
<i>Ornithodoros amblus</i> ^a	Lobos de Tierra island, Peru, 2009	Peruvian Pelican (<i>Pelecanus thagus</i>), Peruvian Boody (<i>Sula variegata</i>)	2	ND	ND	ND
<i>Ornithodoros capensis</i>	Juan de Nova island, Mozambic Channel, 2011	Sooty Tern (<i>Onychoprion fuscatus</i>)	25	0.04 (1/25)	ND	ND
<i>Ornithodoros costalis</i> ^a	Mostaganem, Algeria, 2012	Rodent burrows	10	0 (0/10)	ND	ND
	TARF	-	11	0 (0/11)	ND	ND
	TUN	-	4	1 (4/4)	ND	ND
	SAF	-	4	0.25 (1/4)	ND	ND
	Kenitra, Morocco, 2006	Rodent burrows	5	0 (0/5)	ND	ND
	LAR	-	2	0 (0/2)	ND	ND
	ARG	-	1	0 (0/1)	ND	ND
	Boujdour, Morocco, 2006	Rodent burrows	2	0 (0/2)	ND	ND
<i>Ornithodotus erraticus</i>	Taher, Algeria, 2010	Rodent burrows	2	ND	ND	ND
	Laboratory colony	ND	12	1 (9/9)	1 (6/6)	1 (3/3)
<i>Ornithodoros maritimus</i> ^a	Medes, Spain, 2009	Yellow-legged gull (<i>Larus michahellis</i>)	20	0.2 (4/20)	ND	ND
	Zembra, Tunisia, 2009	Yellow-legged gull (<i>Larus michahellis</i>)	14	0.357 (5/14)	ND	ND
	Cies, Spain, 2011	Yellow-legged gull (<i>Larus michahellis</i>)	23	0 (0/23)	ND	ND
	Carteau island, France, 2016-2018	Yellow-legged gull (<i>Larus michahellis</i>)	67	0.619 (39/63)	0.692 (36/52)	0.273 (3/11)
<i>Ornithodoros moubata</i> ^a	Laboratory colony (Neuchâtel strain)	ND	87	0.75 (63/84)	0.746 (56/75)	0.778 (7/9)
<i>Ornithodoros normandi</i> ^a	Bizerte, Tunisia, 2010	Rodent burrows	2	ND	ND	ND
	Oudhna, Tunisia, 2010	Rodent burrows	2	ND	ND	ND
<i>Ornithodoros occidentalis</i>	Fez, Morocco, 2010	Rodent burrows	3	No <i>R. lusitaniae</i>	ND	ND
	Taza, Morocco, 2020	Rodent burrows	1	No <i>R. lusitaniae</i>	ND	ND

<i>Ornithodoros peruvianus</i> ^a	Chile, unknown year	Common vampire Bat (<i>Desmodus rotundus</i>)	2	ND	ND	ND
<i>Ornithodoros rupestris</i> ^a	Mostaganem, Algeria, 2012	Rodent burrows	2	ND	ND	ND
<i>Ornithodoros sonrai</i> ^a	Dielmo, Senegal, 2002	Rodent burrows	19	0 (0/19)	ND	ND
	Kanène Khar, Senegal, 2003	Rodent burrows	17	0 (0/17)	ND	ND
	Richard-Toll, Senegal, 2003	Rodent burrows	19	1 (19/19)	ND	ND
	Sogoli, Mali, 2007	Rodent burrows	9	0 (0/9)	ND	ND
	M'Chounèche, Algeria, 2009	Rodent burrows	22	0 (0/22)	ND	ND
<i>Ornithodoros sp.</i>	Cap Vert (Curral Velho), Boa Vista, 2009	-	4	0.25 (1/4)	ND	ND
Total			393			

Table 3. Genes, primers and FISH probes used in this study. Semi-nested and nested PCR amplifications for *Rickettsia* sequencing were performed as described in Buysse and Duron (2020). Known positive and negative individuals were used as controls in each PCR assay. All PCR products were visualized with electrophoresis in a 1.5% agarose gel. qPCR assays for *Rickettsia* relative quantification were conducted as follow: Initial denaturation at 95 °C for 10 min, 40 cycles of denaturation (95 °C, 10 s), annealing (60 °C for both couples of primers, 15 s), and extension (72 °C, 30 s). Standard curves and positive controls were plotted using dilutions of a pEX-A2 vector (Eurofins) containing one copy of fragments of the *act2* and *gltA* genes.

Gene	Hypothetical product	Primers (5'-3')	T _m	Fragment size	Reference	
<i>Rickettsia</i>						
16S rDNA	Small ribosomal unit	R16SF1	CGTGGAATCTGCCCATCAG	55 °C	Semi-nested PCR assay: 1 st round PCR: R16SF1/R16SR2: 989bp	Buysse and Duron, 2020
		R16SR1	GGTGGTYGCGGATCGCAGAG			
		R16SR2	GCCAGCGGGTAATGCCGGAAC	-	2 nd round PCR: R16SF1/R16SR1: 854bp FISH probe and helpers	This study
		16S-Rick-R2-CY3	TTTCTGCAAGTAACGTCATTATC			
		16S-Rick-R2H1	CACGGAGTTAGCCGGGGCT			
		16S-Rick-R2H2	TTCCTTGCTAAAAGAG			
<i>gltA</i>	Citrate synthase	RgltAF1	CCTATGGCTATTATGCTTGCGGC	56 °C	Semi-nested PCR assay: 1 st round PCR: RgltAF1/RgltAR1: 664bp	Duron et al., 2017
		RgltAF2	GGTTCTCTTTCKGCATTTATCC			
		RgltAR1	CTTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATG	60 °C	qPCR assay: Rick-gltA-F-Nw/Rick-gltA-R-Nw: 135bp	This study
		Rick-gltA-F-Nw	GCTATTTGCAGGAGTGGGTTG			
		Rick-gltA-R-Nw	TCCGTTTAGGTTTRATGGGCTT			
<i>ompB</i>	Outer membrane protein	RompBF1	GGCTGGACCTGAAGCTGGAGC	52 °C	Nested PCR assay: 1 st round PCR: RompBF1/RompBR2: 834bp	Buysse and Duron, 2020
		RompBF2	GTTGCTGCAAGTGACGAAGCTG			
		RompBR1	GTCCATCTAACTGAGACTGAG	715bp		
		RompBR2	GCATCAGGTCTTATGCTTGAC			
<i>coxA</i>	Cytochrome C oxydase subunit I	RcoxAF1	CGTGCTTATCACRGCACATGCCG	55 °C	Semi-nested PCR assay: 1 st round PCR: RcoxAF1/RcoxAR2: 989bp	Buysse and Duron, 2020
		RcoxAF2	CCYGATATGGCATTTCACGCC			
		RcoxAR2	AAGCACCGAGCGACATCGTA			

<u><i>Coxiella</i>-LE</u>						
16S rDNA	Small ribosomal unit	16S-Cox-C2-FITC	CTTCTATGGGTAACGTCAGCGCC CACAGAGTTAGCCAGTGCT AAGGATATTACCCTTGAGA	-	FISH probe and helpers	This study
<u><i>Ornithodoros</i> (tick)</u>						
<i>act2</i>	Actin	Omoub-actqF2 Omoub-actqR1	CGGTATTGCCGACCGTATGC GCTGGAAGGTGGACAGGGAG	60 °C	qPCR assay: Omou-actqF2/Omou-actqR1: 140bp	Duron et al., 2018
16S	Small ribosomal unit	16S-Tiq-F 16S-Tiq_R	CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGC CCGGTCTGAACTCAGATCATGTA	50 °C	Simple PSR assay: 16S-Tiq-F/16S-Tiq-R: 461bp	This study

Table 4. Table referencing tick species, sampling details, reported prevalence (when possible), and related studies of all *R. lusitaniae* detection in natural populations, in association with the Figure 2. *: referred to ticks analyzed by pool.

Country	Tick species	Sampling details	<i>R. lusitaniae</i> prevalence (infected/tested specimens)	Reference
<u>Eurasia</u>				
1 France	<i>O. maritimus</i>	In yellow-legged gull nests (<i>Larus michahellis</i>), Carteau island, 2016-2018	0.619 (39/63)	Duron et al., 2017; this study
2 Spain	<i>O. maritimus</i>	In yellow-legged gull nests (<i>Larus michahellis</i>), Medes, 2009	0.2 (4/20)	This study
3 Portugal	<i>O. erraticus</i>	In pigpens, Alentejo, 2009-2010	0.545 (6/11)	Milhano et al., 2014
4 Iran	<i>O. papillipes</i>	Shahriar, 1942	ND	Direct submission
5 Turkmenia	ND	From a tick found in a gerbil burrow, 1948	ND	Direct submission
6 Uzbekistan	<i>O. papillipes</i>	Location unknown, 1945	ND	Direct submission
7 China	<i>A. vespertilionis</i>	On bats (<i>Vespertilio murinus</i>), unknown location, 2016	ND	Hornok et al., 2019
	-	From a bat carcass (<i>Pipistrellus pipistrellus</i>), Shihezi University, 2015-2019	0.018 (1/54)	Zhao et al., 2020
8 South Korea	<i>O. sawaii</i>	In Japanese murrelet nests (<i>Synthliboramphus wumizusume</i>), Gugul island, 2015	0.366 (11/30)	H.-C. Kim et al., 2021
	<i>Ornithodoros</i> sp.	In seabird nests (<i>Larus crassirostris</i>), unknown location, 2017-2018	ND	Han et al., 2021
<u>Africa</u>				
22 Morocco	<i>O. costalis</i>	Sidi Akhfenir, unknown year	0.25 (1/4)	Trape et al., 2013; this study
9 Algeria	<i>O. rupestris</i>	In rodent burrows, Mostaganem, 2012	0.666 (2/3)	Duron et al., 2017
10 Tunisia	<i>O. costalis</i>	Tunis, unknown year	1 (4/4)	Trape et al., 2013; this study
	<i>O. maritimus</i>	In yellow-legged gull nests (<i>Larus michahellis</i>), Zembra, 2009	0.357 (5/14)	This study
	<i>O. normandi</i>	In rodent burrows, Oudhna, 2010	1 (3/3)	Duron et al., 2017
11 Senegal	<i>O. sonrai</i>	In rodent burrows, Richard-Toll, 2003	1 (19/19)	Duron et al., 2017
12 Boa Vista island (Cape Verde)	<i>Ornithodoros</i> sp.	Curral Velho, 2009	0.25 (1/4)	Duron et al., 2017
13 Zambia	<i>O. faini</i>	Near bat guano in Leopards Hill cave, Lusaka, 2006	0.1 (5/50)	Qiu et al., 2021
	<i>O. porcinus</i>	In warthog burrows (<i>Phacochoerus africanus</i>); South Luangwa National Park, unknown year	0.368 (32/87)*	Chitanga et al., 2021
14 Tromelin island (France)	<i>O. capensis</i>	In masked booby (<i>Sula dactylatra</i>) and red-footed booby (<i>S. sula</i>) nests, 2011-2012	0.043 (1/23)	Dietrich et al., 2014
15 Reunion island (France)	<i>O. capensis</i>	In wedge-tailed shearwater nest (<i>Ardenna pacifica</i>), 2011-2012	0.102 (4/39)	Dietrich et al., 2014
16 Europa island (France)	<i>O. capensis</i>	In sooty tern nest (<i>Onychoprion fuscatus</i>), 2011-2012	0.047 (2/42)	Dietrich et al., 2014
17 Juan de Nova island (Mozambic)	<i>O. capensis</i>	In sooty tern nest (<i>Onychoprion fuscatus</i>), 2011	0.04 (1/25)	This study
18 Tanzania	<i>O. moubata</i>	In dwellings in villages, Dodoma Rural District, unknown year	ND	Cutler et al., 2006

South America

19	Chile	<i>O. peruvianus</i>	On common vampire bat (<i>Desmodus rotundus</i>), unknown location, unknown year	0.666 (2/3)	Duron et al., 2017
20	Peru	<i>O. amblus</i>	In peruvian pelican (<i>Pelecanus thagus</i>) and peruvian booby (<i>Sula variegata</i>) nests, Lobos de Tierra island, 2009	1 (3/3)	Duron et al., 2017

North America

21	Mexico	<i>O. yumatensis</i>	In caves, Yucatan, 2014	0.428 (9/21)	Sánchez-Montes et al., 2016
		<i>Ornithodoros sp.</i>	On bats (<i>Balantiopteryx plicata</i>), unknown location, unknown year	ND	Hornok et al., 2019

Figures

Figure 1. Phylogeny of *Rickettsia* based on *gltA* gene sequences associated with some biological traits of *Rickettsia* described in soft tick species. The phylogeny was constructed using maximum-likelihood (ML) estimations on 536 unambiguously aligned nucleotides and a GTR+G model as the best-fit approximation for the evolutionary model. Branch numbers indicate percentage bootstrap support for major branches (1,000 replicates; only bootstrap values > 70 % are shown). The scale bar is in units of substitution/site. Sequences produced in this study are in a bold font. Details regarding added sequences from representative *Rickettsia* spp. are available on GenBank are specified in Tables S1.

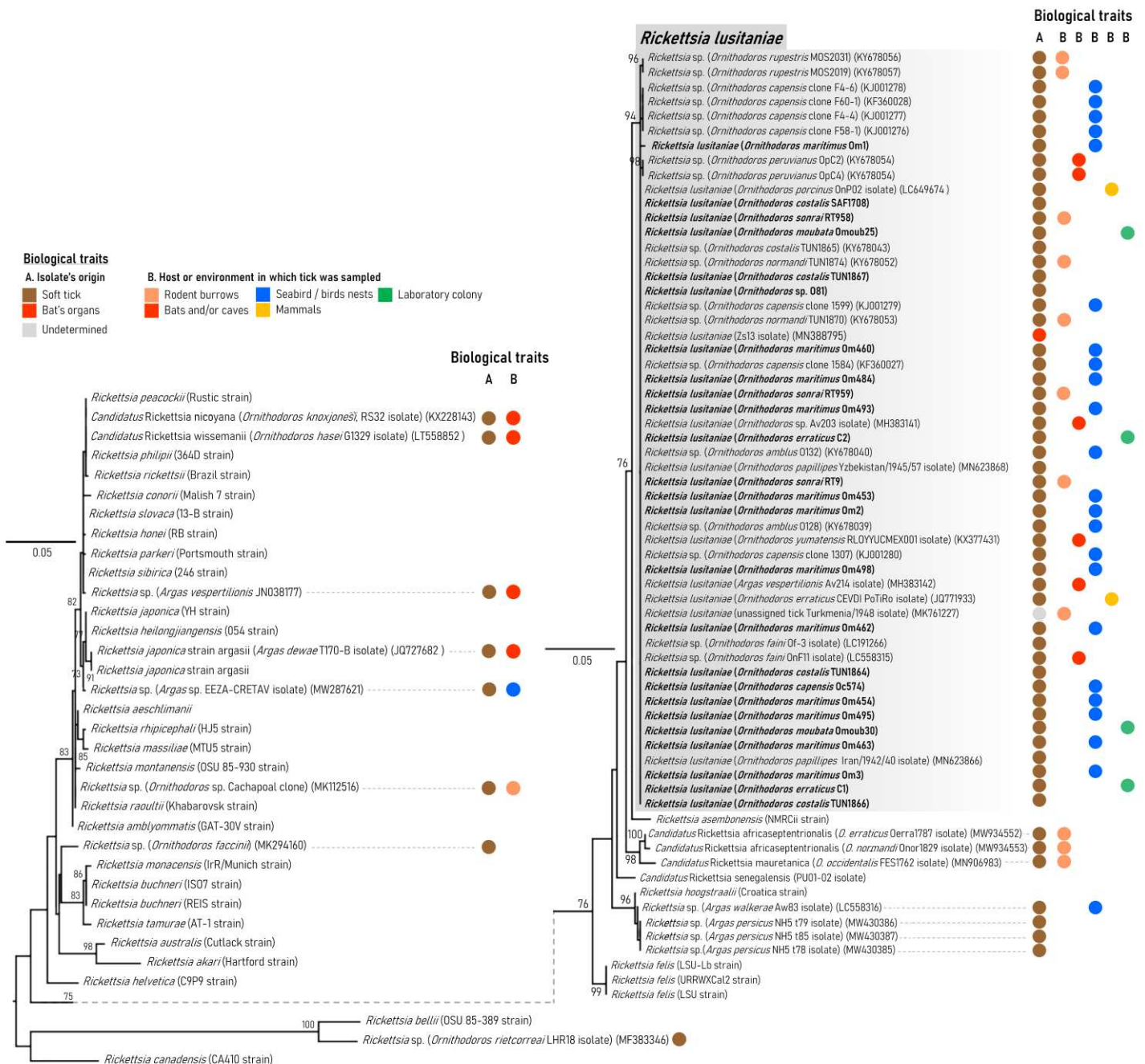


Figure 2. Distribution of all *R. lusitaniae* detection. Countries for which *R. lusitaniae* was detected in Duron et al. (2017) and Buysse and Duron (2020) and this study are colored in dark green; countries for which records originated from other studies are colored in black. Numbers associated with each country refer to the Table 4.

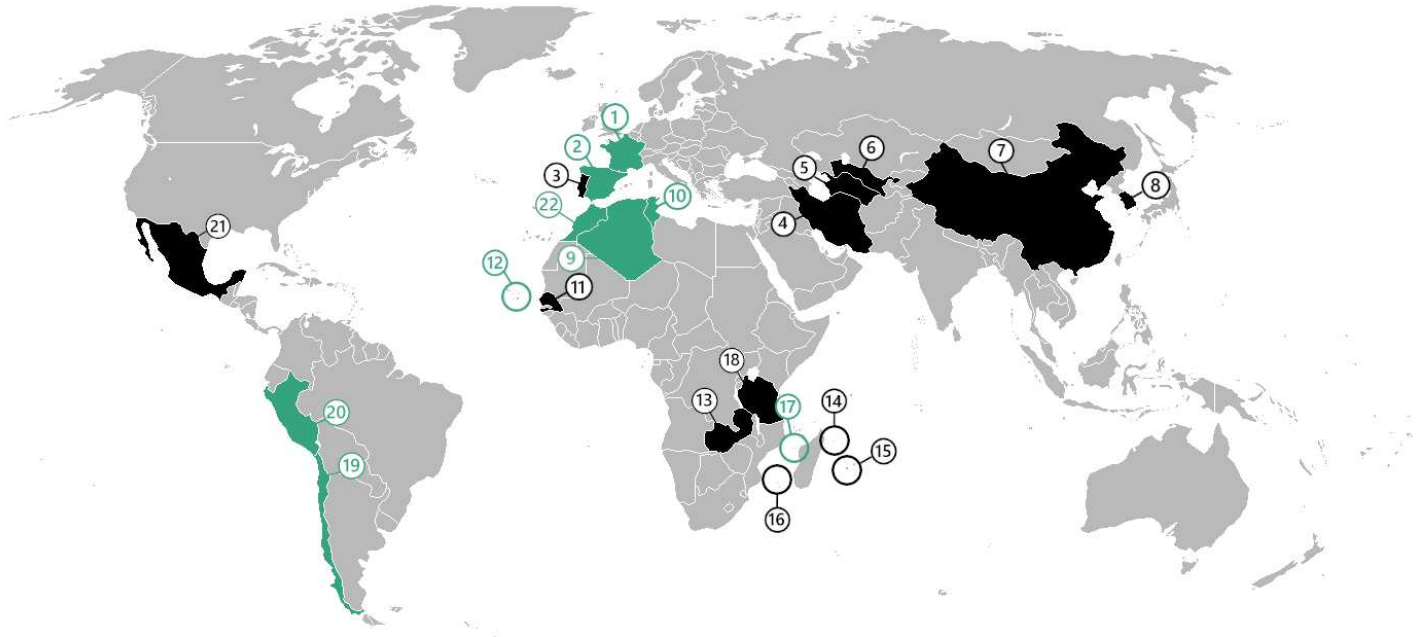


Figure 3. Phylogeny of *Rickettsia* based on concatenated sequences of four genes (16S rRNA, *gltA*, *coxA*, and *ompB*). The phylogeny was constructed using maximum-likelihood (ML) estimations on 2,319 unambiguously aligned nucleotides and a GTR+G+I model as the best-fit approximation for the evolutionary model. Branch numbers indicate percentage bootstrap support for major branches (1,000 replicates; only bootstrap values > 70 % are shown). The scale bar is in units of substitution/site. Sequences produced by Duron et al. (2017) and in this study are in a bold font. *Rickettsia* found in soft ticks are indicated by a brown circle. Details regarding added sequences from representative *Rickettsia* groups, species, and strains available on GenBank are specified in Table S1.

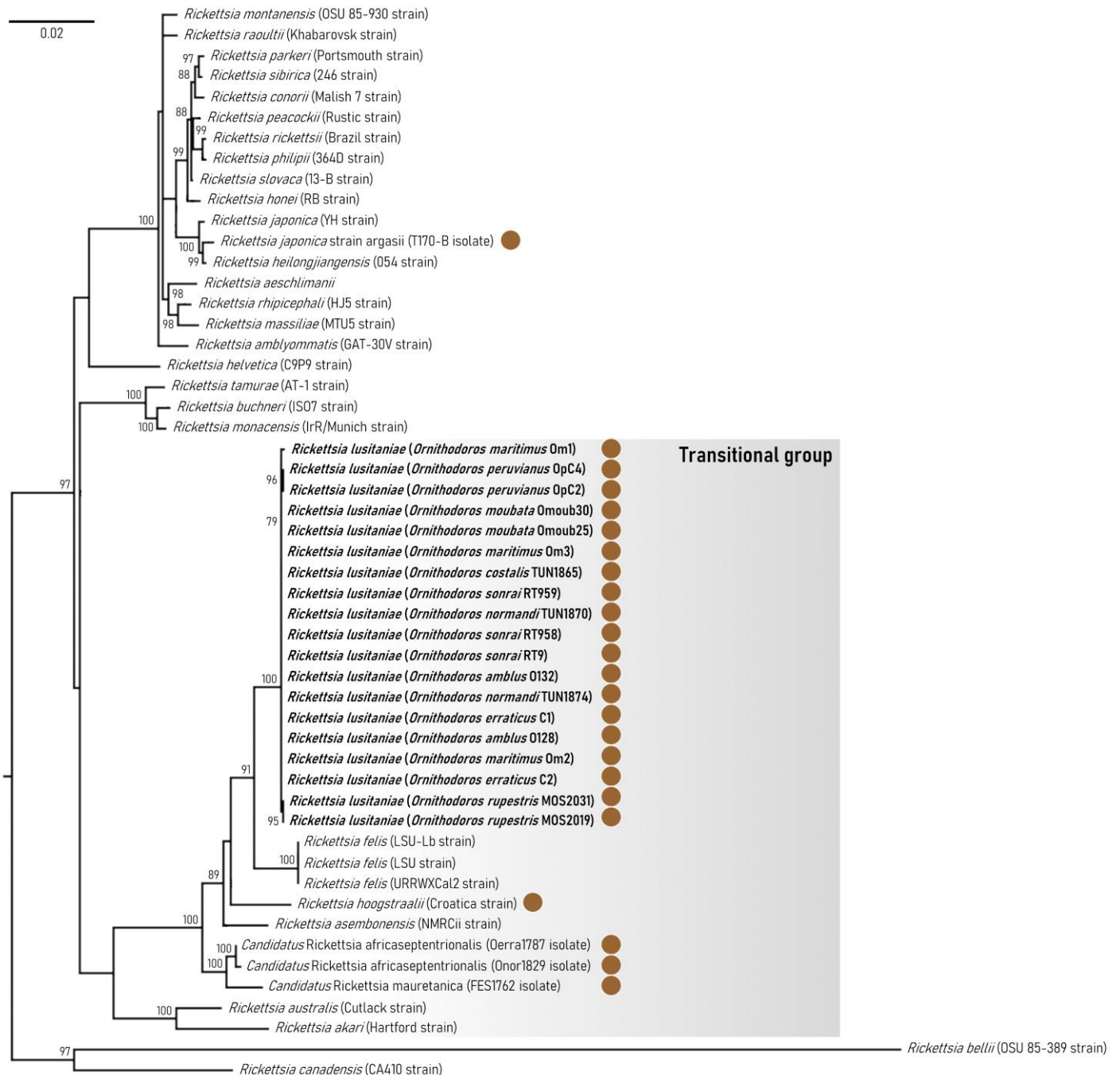


Figure 4. *Rickettsia* densities according to sex and organ in *Ornithodoros maritimus* and *O. moubata* ticks. Infection densities in *O. maritimus* (light gray) and *O. moubata* (dark gray) were quantified in carcasses (C), ovaries (OV), testes (T), salivary glands (GS), midgut (TD), and Malpighian tubules (TM) by using the ratio of bacterial *gltA* gene copies per tick *act2* gene copies and represented as logarithmic values. The red line is the representation of the ratio for which the copies of each gene are equal. */**/***: results of comparison based on ANOVA and post hoc analyses (p-value cut-off of 0.05).

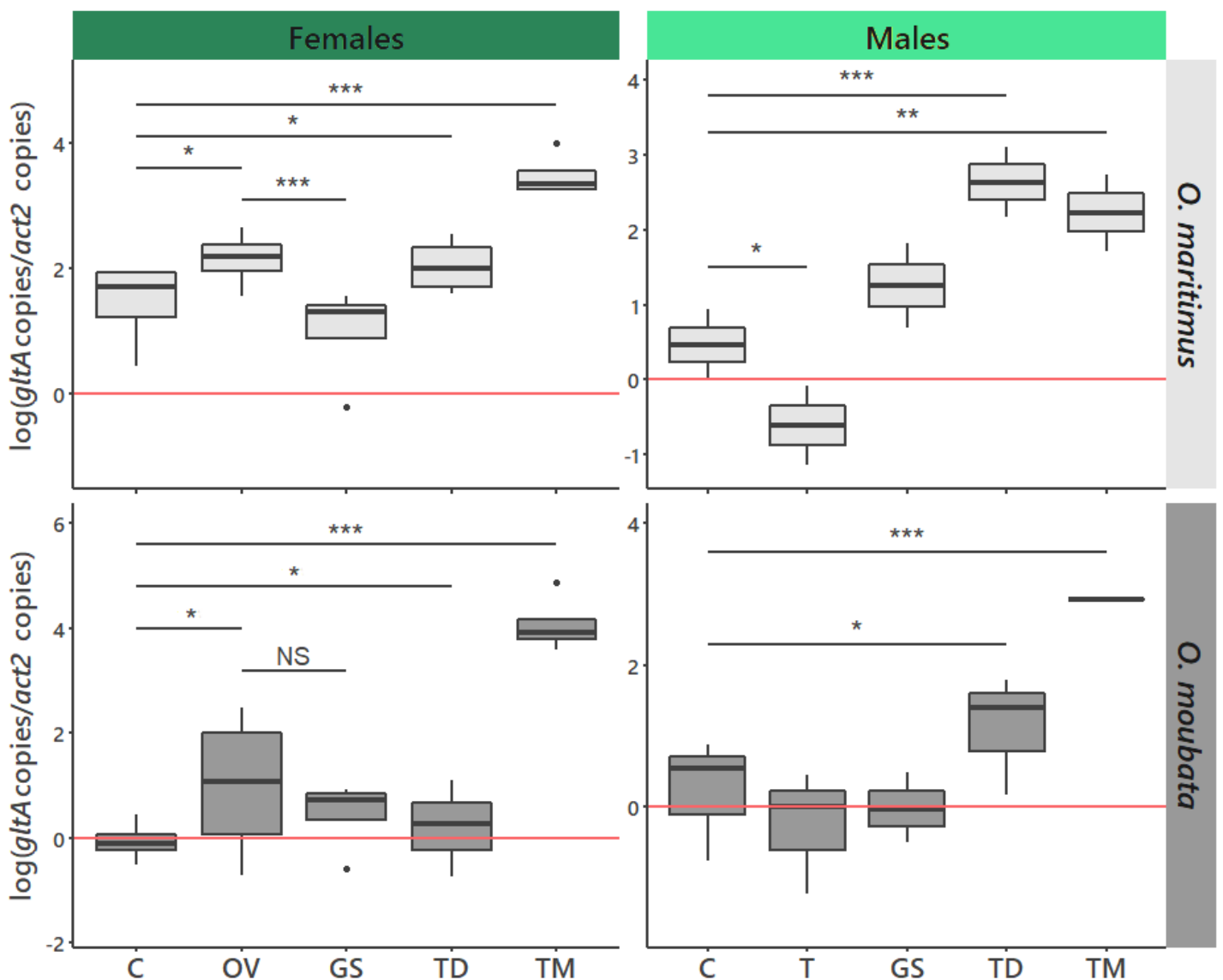


Figure 5. *R. lusitaniae* detection through FISH assays within dissected ovaries and Malpighian tubules of *O. maritimus*. DAPI signal (blue), *Coxiella*-LE probe signal (red), and *Rickettsia* probe (green) are merged to localize *Coxiella*-LE and *R. lusitaniae* within Malpighian tubules (A and B).

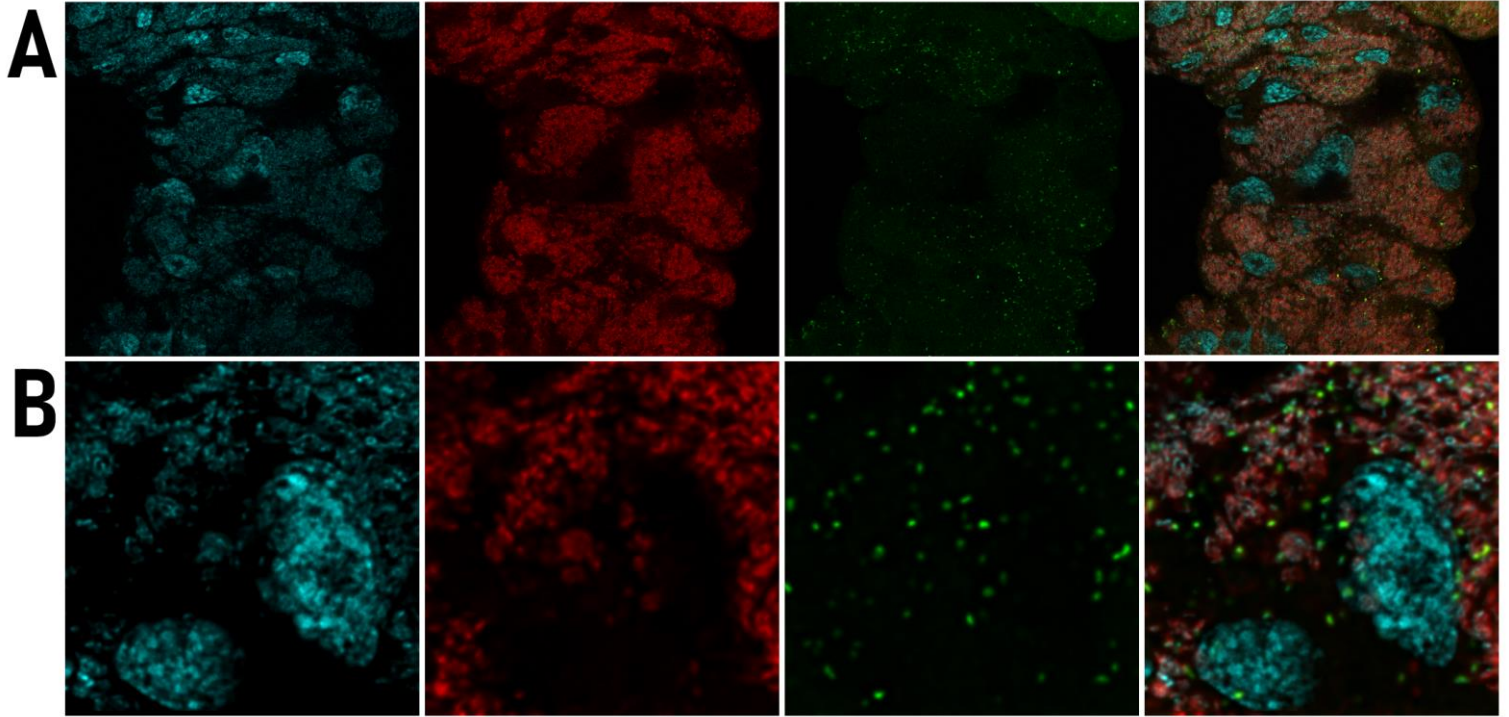


Figure 6. Effects of *R. lusitaniae* infection on life-history traits of *Ornithodoros maritimus*. Values of (A) the anterior-posterior length (mm), (B) the number of laid eggs, and (C) the hatching rate (%) were compared between uninfected and infected females. (D) Representation of the hatching rate according to the antero-posterior length. Regression lines were added using the `geom_smooth` function (`ggplot2` package) with `glm` and `quasibinomial` family parameters.

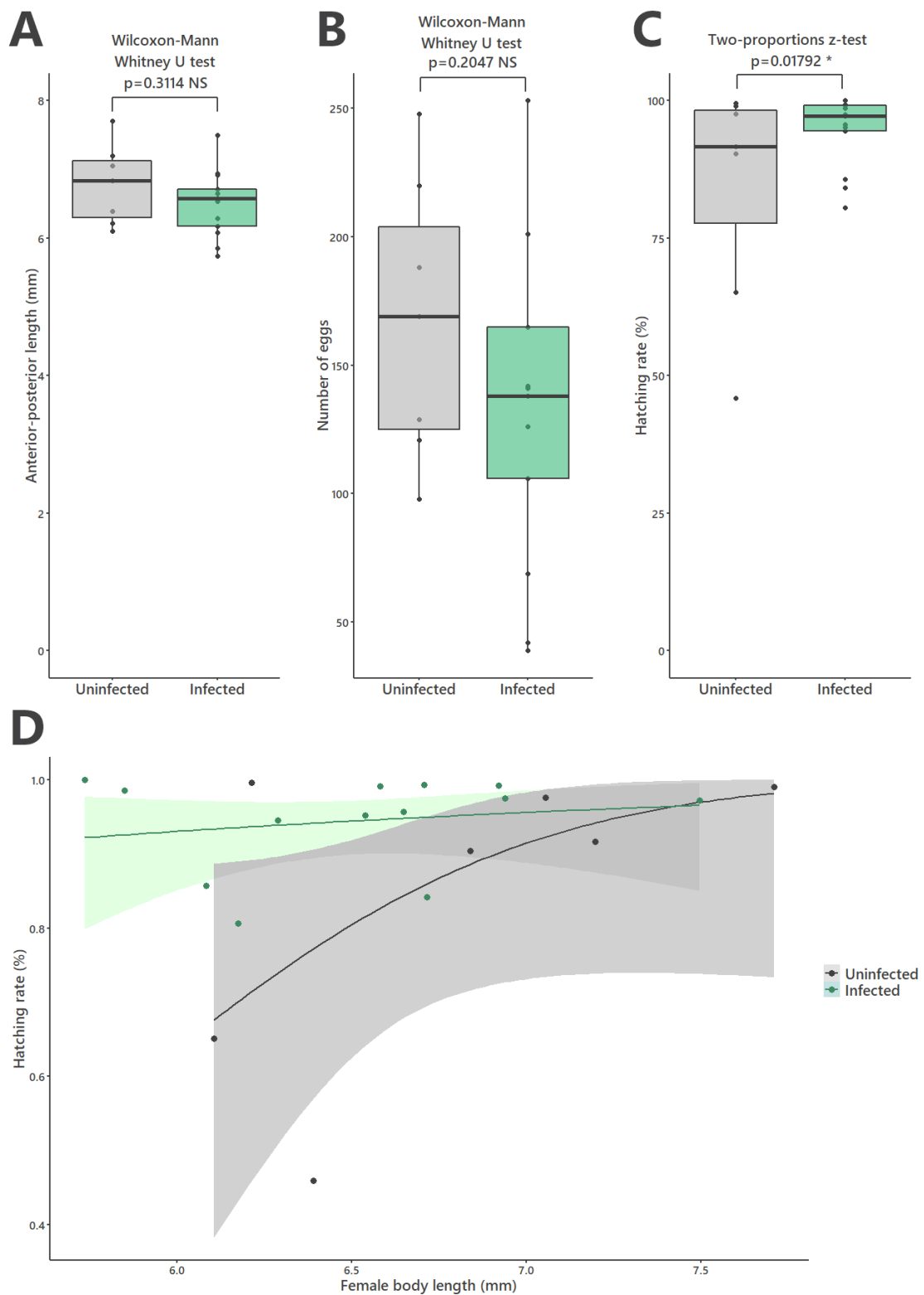


Figure 7. Predicted dynamics of *R. lusitaniae* in an *O. maritimus* natural population.

Predictions were produced using different combinations of parameters values for 100 generations: (i) without positive fitness (FE) on infected specimens ($FE(i) = FE(ni) = 1$) and without horizontal transmission (HT), (ii) with a positive FE on infected specimens (translating by $FE(ni) = 0.89$ while $FE(i) = 1$) and without HT, and (iii) with a positive FE on infected specimens and with HT fixed at 1%. Each combination was tested through different *R. lusitaniae* frequency (F) at introduction fixed at 1%, 10% and 50%. For each combination, *R. lusitaniae* dynamic is calculated with a vertical transmission rate of 0.989 ± 0.011 , delimiting an estimation range specified by the green area (dark green line representing vertical transmission mean rate).

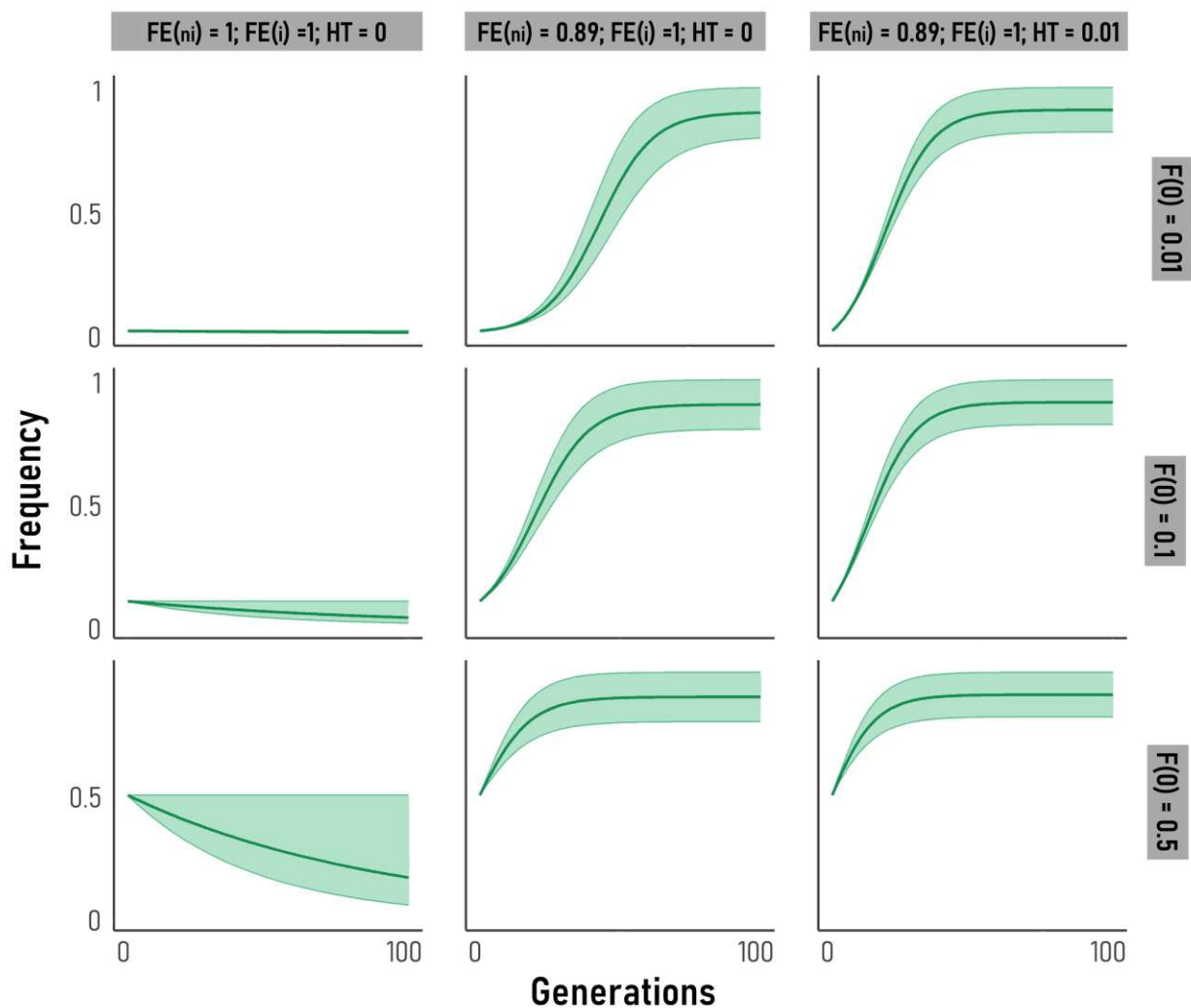


Figure 8. Comparative genomic features between the three *R. lusitaniae* MAGs.

(A) Nucleic sequences' identity matrix between the three *R. lusitaniae* MAGs (in dark green) and three strains of *R. felis* (in black). Identity values are detailed and clusters are determined using the “heatmaply” R package.

(B) Whole-genome synteny of the three MAGs. Each contiguously colored locally collinear block (LCB) represents a region without rearrangement of the homologous backbone sequence. LCBs below the center represent blocks in the reverse orientation. The height of color bars within LCBs corresponds to the average level of similarity (conservation) profile in that region of the genome sequence. Areas that are completely white were not aligned and contained sequence elements specific to a particular genome.

(C) Venn diagram representing orthologs distribution between the three MAGs.

(D) Phylogenetic tree based on ISRpe1 sequences. The phylogeny was constructed using maximum-likelihood (ML) estimations on 445 unambiguously aligned nucleotides and a GTR+G+I model as the best-fit approximation for the evolutionary model. Branch numbers indicate percentage bootstrap support for major branches (1,000 replicates; only bootstrap values > 70 % are shown). The scale bar is in units of substitution/site. Sequences from other arthropods endosymbionts and diverse bacteria were added to our analysis. ISRpe1 clades were indicated on corresponding branches. ISRpe1 copies from *R. lusitaniae* MAGs were indicated in dark green. ISRpe1 copies originated from *Rickettsia* are indicated by a black circle.

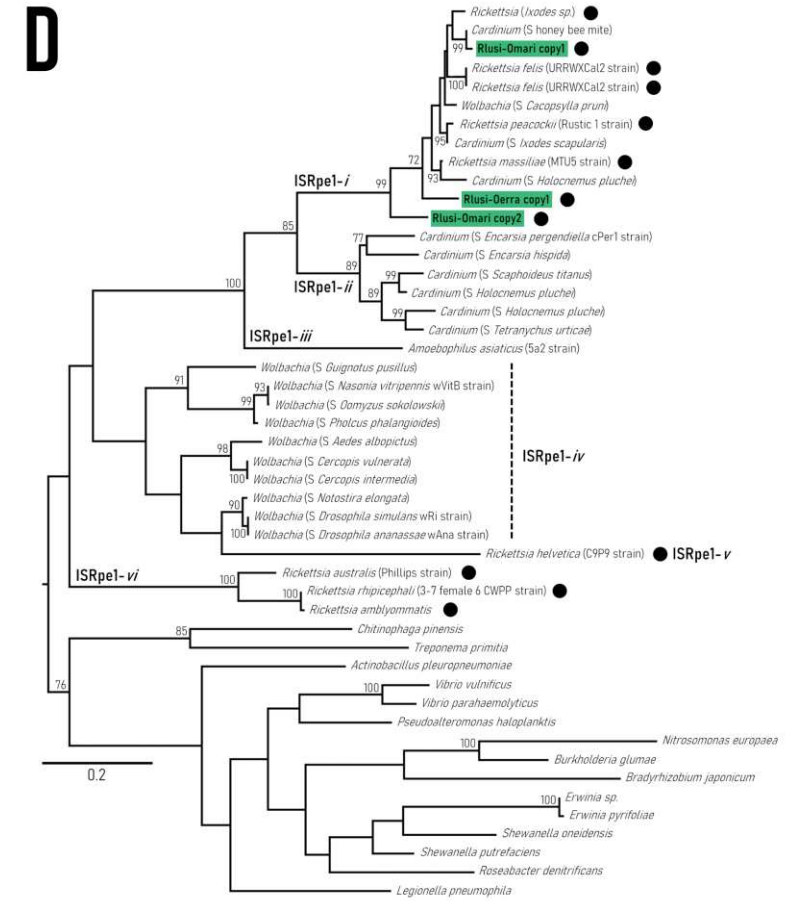
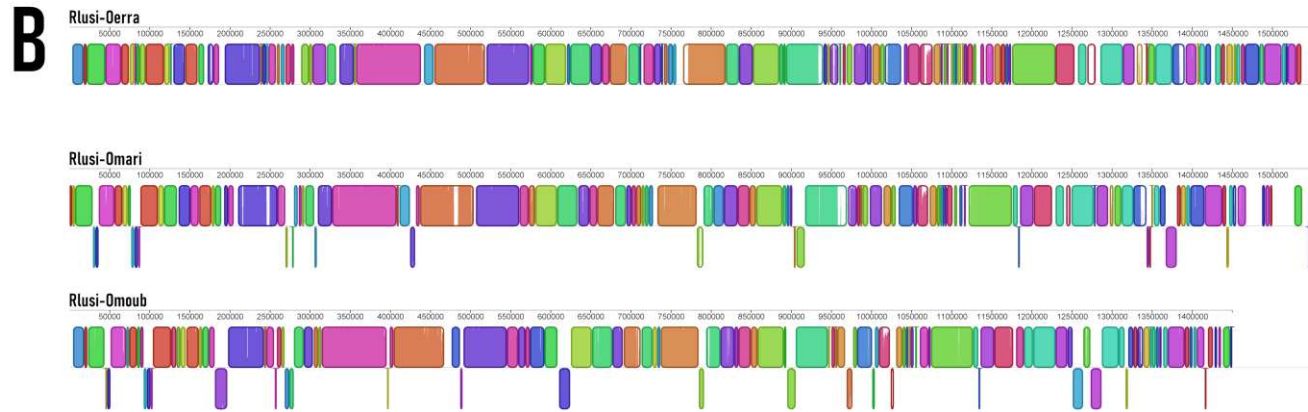
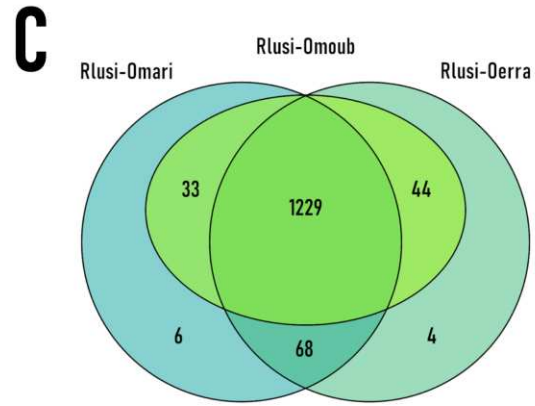
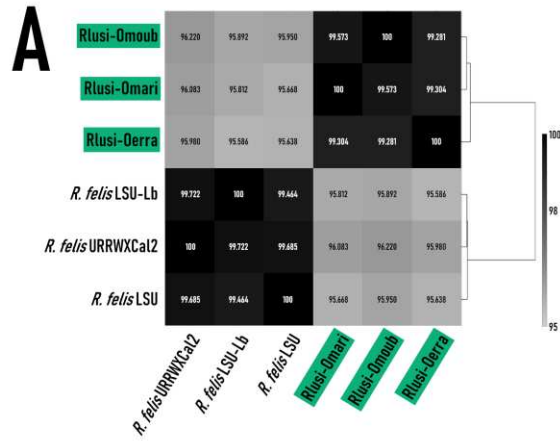


Figure 9. Comparative genomic features between the three *R. lusitaniae* MAGs and other *Rickettsia*.

(A) Whole-genome phylogenetic relationship of the three *R. lusitaniae* MAGs obtained in this study (highlighted by a dark green box) and other *Rickettsia* representatives. The phylogenetic tree was inferred using maximum likelihood from a concatenated alignment of 434 SCO (106,854 amino acids; best-fit approximation for the evolutionary model: JTT+I+G4).

Numbers on each node represent the support of 1,000 bootstrap replicates; only bootstrap values >70% are shown. The scale bar is in units of substitution/site. Species on purple-colored branches belong to the Spotted Fever group, those on orange-colored branches belong to the Transitional group. Previously described *Rickettsia* phenotypes are detailed (in the right) with a black circle for pathogens of vertebrates and a white circle for endosymbionts of arthropods.

(B) Amino acids' identity matrix between the three *R. lusitaniae* MAGs (in dark green) and other *Rickettsia*. Clusters are determined using the “heatmaply” R package, and branches' colors have the same meaning than in Figure 9A.

(C) Genomic size comparisons between categories of reported *Rickettsia* phenotypes and phylogenetic clades. Letters: results of comparison based on ANOVA associated with a HSD tests (p-value cut-off of 0.05).

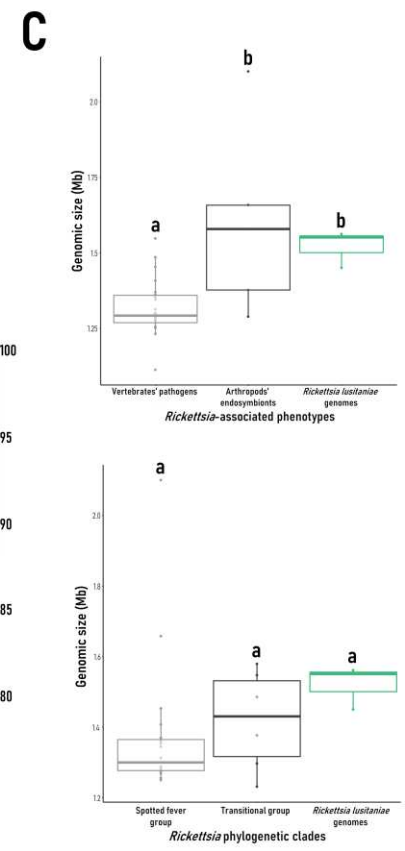
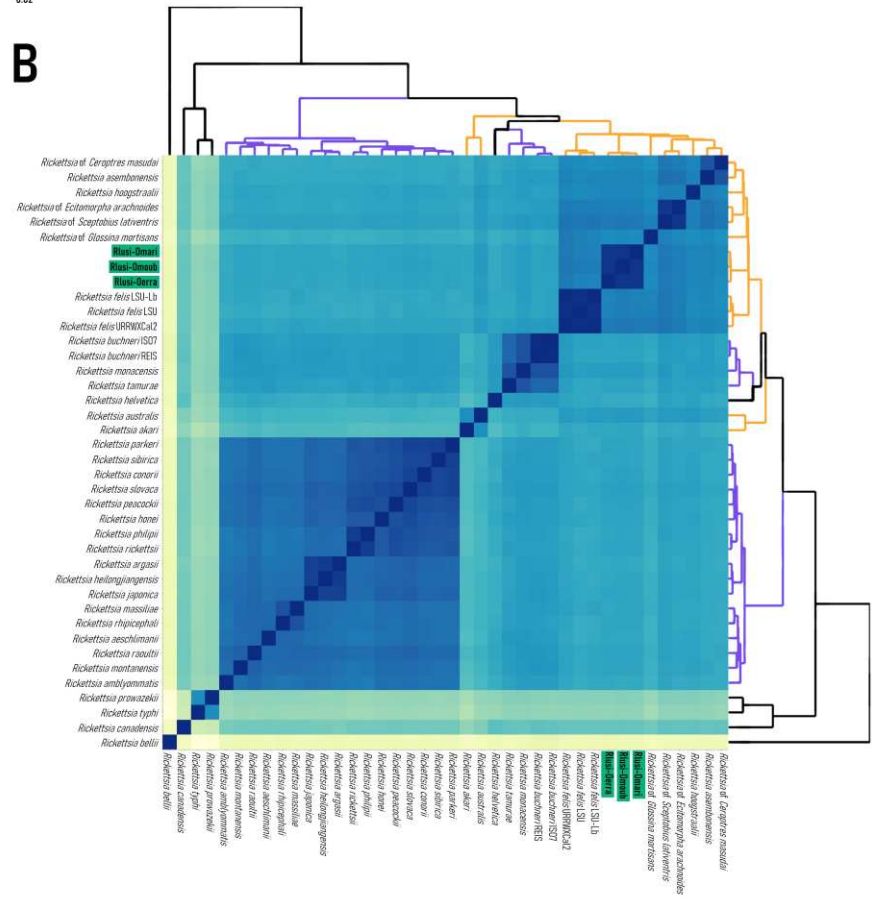
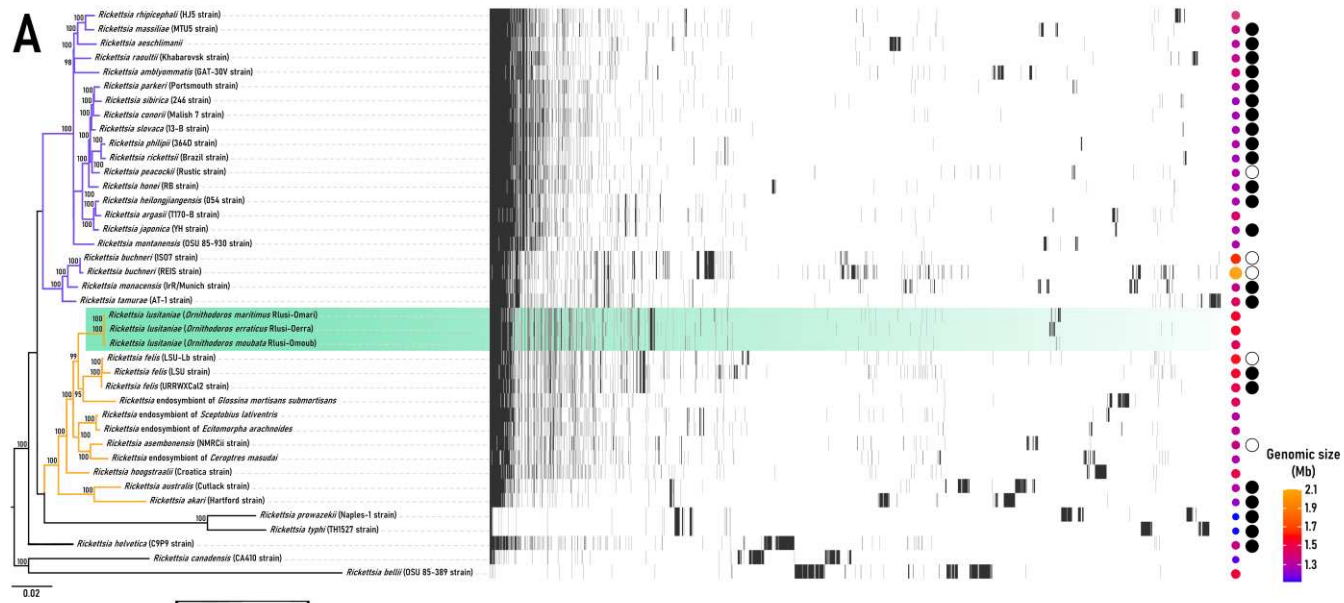


Figure 10. Title. Conservation level of (A) the B vitamins biosynthesis pathways, with (B) their co-factors, and (C) the heme biosynthesis pathway. Only the genes involved in the biosynthesis of the three key B vitamins (biotin, folic acid, and riboflavin) required for tick nutrition are presented. Green squares, functional genes; gray squares, pseudogenes; T: truncated protein; asterisk: protein identical to other *R. lusitaniae* sequences but found in the meta-assembly that might be related to a binning issue; white squares, missing genes.

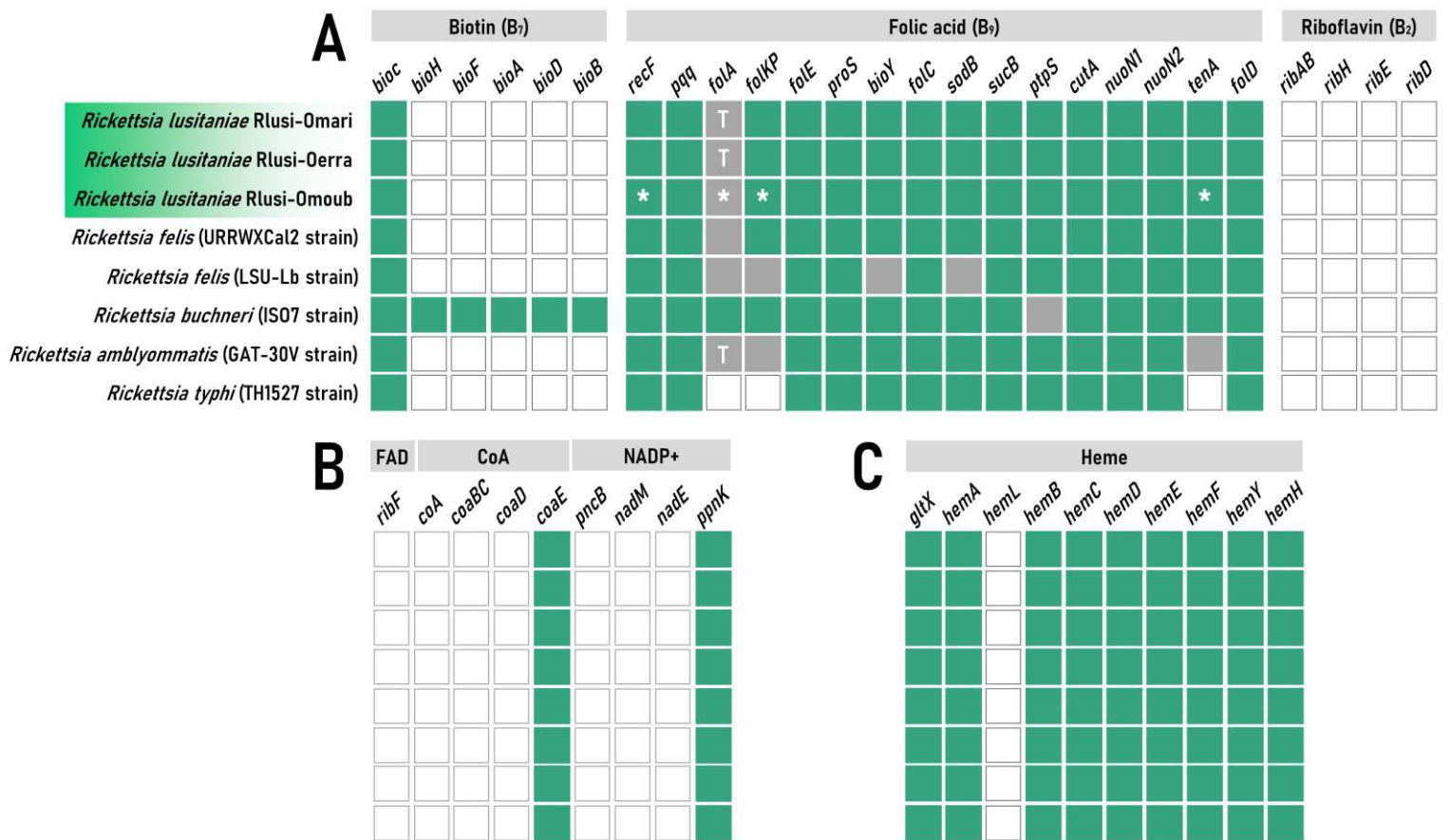


Figure 11. Conservation level of potential genes associated with virulence in vertebrates.

Green squares, functional genes; gray squares, pseudogenes; T: truncated protein; white squares, missing genes.

	<i>R. typhi</i> (TH1527)	<i>R. amblyommatis</i> (GAT-30V)	<i>R. peacockii</i> (Rustic)	<i>R. rickettsii</i> (Brazil)	<i>R. buchneri</i> (REIS)	<i>R. buchneri</i> (IS07)	<i>R. felis</i> (LSULb)	<i>R. felis</i> (URRWXCa12)	<i>Rlusi-Omoub</i>	<i>Rlusi-Oerra</i>	<i>Rlusi-Omari</i>	Potential functions
<i>adr1</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Complement resistance
<i>adr2</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Complement resistance
<i>RARP2</i>	Green	Green	White	Green	White	White	Green	Green	Green	Green	Green	Effector protein of T4SS
<i>pat1</i>	Green	Green	Gray	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Phospholipase with possible role in vacuole escape and/or host cell lysis
<i>pat2</i>	Gray	Gray	Gray	Gray	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Phospholipase with possible role in vacuole escape and/or host cell lysis
<i>tlyA</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Predicted hemolysin with possible role in vacuole escape and/or host cell lysis
<i>tlyC</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Predicted hemolysin with possible role in vacuole escape and/or host cell lysis
<i>rickA</i>	White	Green	White	Green	Green	Green	Green	Green	T	Green	Green	Mimics WASP to activate Arp2/3 to drive actin-based motility
<i>sca2</i>	Green	Green	Green	Green	Gray	Gray	Green	Green	Green	Green	Green	Formin-like activity that directly nucleates actin to promote motility
<i>sca4</i>	Green	Green	Green	Green	T	Green	Gray	Green	Green	Green	Green	Disrupts interaction between vinculin and α -catenin promote cell-to-cell spread
<i>risk1</i>	Green	Green	Green	Green	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Green	Green	Phosphatidylinositol 3-kinase activity promotes host cell colonization
<i>sca0</i>	White	Green	Gray	Green	T	Green	Green	Green	T	T	T	Host cell adhesion
<i>sca1</i>	Green	Green	White	Green	Green	Green	Gray	Gray	Green	Green	Green	Host cell adhesion
<i>sca5</i>	Green	Green	Green	Green	Gray	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Host cell adhesion
<i>ralF</i>	T	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Gray	Green	Green	Green	Green	Guanine nucleotide exchange factor of Arf6 that promotes invasion
<i>ompA</i>	Green	Green	Gray	T	T	Green	T	T	T	Green	Gray	Rickettsial surface protein involved in invasion
<i>ompB</i>	Green	Green	Green	Green	Gray	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Rickettsial surface protein involved in invasion and autophagy avoidance
<i>tlc1</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	ATP/ADP symporter that imports ATP from host cells

Supplementary information

***Rickettsia lusitaniae*, a worldwide distributed maternally inherited
endosymbiont of *Ornithodoros* soft ticks**

Marie Buysse et al.

Supplementary tables

Table S1. Genomes' and isolates' references of representative *Rickettsia* used in this study. Text.

Specimens details				Genome details			
<i>Rickettsia</i> species	Strain	Origin or host	Accession number (NCBI)	Reference	Contigs number	Size (bp)	GC rate (%)
<i>Rickettsia aeschlimannii</i>	-	-	GCA_001051325	Direct submission (Urmité Genomes)	16	1312196	32.20
<i>Rickettsia akari</i>	Hartford	<i>Homo sapiens</i>	CP000847	Direct submission (Madan A. et al.)	1	1231060	32.33
<i>Rickettsia amblyommatis</i>	GAT-30V	-	CP003334	Karpathy et al., 2016	1	1407796	32.43
<i>Rickettsia asembonensis</i>	NMRCii	Cat flea, <i>Ctenocephalides felis</i>	GCA_000828125	Jima et al., 2015	88	1376743	32.24
<i>Rickettsia australis</i>	Cutlack	-	CP003338	Direct submission (Johnson S.L. et al.)	1	1296670	32.25
<i>Rickettsia bellii</i>	OSU 85-389	Hard tick, <i>Dermacentor variabilis</i>	CP000849	Direct submission (Madan A. et al.)	1	1528980	31.63
<i>Rickettsia buchneri</i>	ISO7	Hard tick, <i>Ixodes scapularis</i>	GCA_000696365	Kurtti et al., 2015	207	1657692	32.48
<i>Rickettsia endosymbiont</i>	REIS	Hard tick, <i>Ixodes scapularis</i>	GCA_000160735	Gillespie et al., 2012	20	2100092	32.47
<i>Rickettsia canadensis</i>	CA410	-	GCA_000283915	Direct submission (Johnson S.L. et al.)	1	1150228	31.01
<i>Rickettsia conorii</i>	Malish 7	-	GCA_000007025	Ogata et al., 2000	1	1268755	32.44
<i>Rickettsia felis</i>	URRWXCal2	Cat flea, <i>Ctenocephalides felis</i>	CP000053	Ogata et al., 2005	1	1485148	32.45
<i>Rickettsia felis</i>	LSU-Lb	Booklouse, <i>Liposcelis bostrychophila</i>	GCA_000804505	Gillespie et al., 2014	43	1579101	32.44
<i>Rickettsia felis</i>	LSU	Cat flea, <i>Ctenocephalides felis</i>	GCA_000804525	Gillespie et al., 2014	22	1546970	32.44
<i>Rickettsia heilongjiangensis</i>	054	Scale insect, <i>Dysmicoccus sylvvarum</i>	CP002912	Duan et al., 2011	1	1278471	32.32
<i>Rickettsia helvetica</i>	C9P9	Hard tick, <i>Ixodes ricinus</i>	CM001467	Direct submission (Dong X. et al.)	1	1369927	32.20
<i>Rickettsia honei</i>	RB	-	GCA_000263055	Xin et al., 2012	11	1268758	32.42
<i>Rickettsia hoogstraalii</i>	Croatia	-	GCA_000825685	Direct submission (Urmité Genomes)	2	1484812	32.38
<i>Rickettsia japonica</i>	YH	-	AP011533	Matsutani et al., 2013	1	1283087	32.35
<i>Rickettsia argasii</i>	T170-B	<i>Homo sapiens</i>	GCA_000965185	Direct submission (Daugherty et al.)	30	1437875	32.28
<i>Rickettsia massiliae</i>	MTU5	-	CP000683	Blanc et al., 2007	1	1360898	32.54
<i>Rickettsia monacensis</i>	IrR/Munich	-	GCA_000499665	Direct submission (Felsheim R.F. et al.)	1	1353450	32.39
<i>Rickettsia montanensis</i>	OSU 85-930	-	CP003340	Direct submission (Johnson S.L. et al.)	1	1279798	32.57
<i>Rickettsia parkeri</i>	Portsmouth	-	CP003341	Direct submission (Johnson S.L. et al.)	1	1300386	32.43
<i>Rickettsia peacockii</i>	Rustic	-	CP001227	Felsheim et al., 2009	1	1288492	32.56
<i>Rickettsia philipii</i>	364D	-	CP003308	Direct submission (Johnson S.L. et al.)	1	1287740	32.47
<i>Rickettsia prowazekii</i>	Naples-1	Guinea pig infected with blood from typhus patient	CP014865	Direct submission (Knight B.M. et al.)	1	1111769	29.00
<i>Rickettsia raoultii</i>	Khabarovsk	-	CP010969	El Karkouri et al., 2016	1	1344642	32.51
<i>Rickettsia rhipicephali</i>	HJ#5	Hard tick, <i>Haemaphysalis juxtakochi</i>	CP013133	Direct submission (Felsheim R. et al.)	1	1406075	32.30
<i>Rickettsia rickettsii</i>	Brazil	-	GCA_000283955	Direct submission (Johnson S.L. et al.)	1	1255681	32.45
<i>Rickettsia sibirica</i>	246	-	GCA_000166935	Direct submission (Malek J.A. et al.)	1	1250021	32.47
<i>Rickettsia slovaca</i>	13-B	-	CP002428	Fournier et al., 2012	1	1275089	32.50
<i>Rickettsia tamurae</i>	AT-1	-	GCA_000751075	Direct submission (Urmité Genomes)	27	1453216	32.47
<i>Rickettsia typhi</i>	TH1527	-	CP003397	Direct submission (Johnson S.L. et al.)	1	1112372	28.92
<i>Candidatus R. mauretanicus</i>	FES1762	Soft tick, <i>Ornithodoros occidentalis</i>	MN906983, MN905453, MN906977, MN906987	Buyse and Duron, 2020	-	-	-
<i>Cand. R. africanseptentrionalis</i>	Oerra1787	Soft tick, <i>Ornithodoros erraticus</i>	MW934552, MN905457, MN906981, MN906991	Buyse and Duron, 2020	-	-	-
<i>Cand. R. africanseptentrionalis</i>	Onor1829	Soft tick, <i>Ornithodoros normandi</i>	MW934553, MN905458, MN906982, MN906992	Buyse and Duron, 2020	-	-	-
<i>Rickettsia endosymbiont</i>	Earac4	Beetle, <i>Ecitonomorpha arachnooides</i>	GCA_020881375	Direct submission (Davison H.R. and Siozios S.)	97	1350066	32.43
<i>Rickettsia endosymbiont</i>	RiTSETSE	Tsetse fly, <i>Glossina mortisans submortisans</i>	GCA_020881295	Direct submission (Davison H.R.)	172	1451997	32.44
<i>Rickettsia endosymbiont</i>	Slati1	Rove beetles, <i>Sceptronius lativentris</i>	GCA_020881155	Direct submission (Davison H.R. and Siozios S.)	109	1301763	32.5
<i>Rickettsia endosymbiont</i>	Cmasu2	Hymenoptera, <i>Ceroptres masudai</i>	GCA_020404525	Direct submission (Davison H.R.)	196	1294863	32.51
<i>Cand. Rickettsia senegalensis</i>	PU01-02	Cat flea, <i>Ctenocephalides felis</i>	KF666472 (<i>gltA</i>)	Mediannikov et al., 2015	-	-	-

Table S2. Raw data of *Rickettsia* quantification by qPCR assays in *Ornithodoros maritimus* and *O. moubata*. Total sampling for each species is specified, while not all specimens were *R. lusitaniae*-positive and so kept for qPCR assays.

Tick species	Sampling sites	n	n(infected)	n(females infected/tested)	n(males infected/tested)	Specimens	Quantification by organs (<i>gltA</i> copies/ <i>act2</i> copies)					
							Body	Gut	Salivary glands	Malpighian tubules	Ovaries	Testes
<i>O. maritimus</i>	Carteau island, France	13	6	4/9	2/4	#1	1.58	5.71	0.81	26.41	4.72	ND
						#2	4.36	12.67	3.48	25.74	8.19	ND
						#3	7.02	9.65	4.8	54.97	9.87	ND
						#4	7.01	4.94	3.87	30.33	14.1	ND
						#5	0.99	8.77	1.99	15.44	ND	0.32
						#6	2.56	22.34	6.17	5.57	ND	0.92
<i>O. moubata</i>	Laboratory colony (Neuchâtel strain)	8	7	4/5	3/3	#1	0.86	1.3	1.91	48.01	1.38	ND
						#2	0.6	0	2.51	131.48	12.07	ND
						#3	0.93	2.97	2.25	35.94	6.32	ND
						#4	1.57	0.48	0.56	51.94	0.49	ND
						#5	0.47	6.01	0.6	18.5	ND	0.29
						#6	2.41	4.06	1.61	225.11	ND	1.55
						#7	1.71	1.19	0.97	18.85	ND	1

Table S3. Raw data of PCR assays for the estimation of *R. lusitaniae* maternal transmission rate in *Ornithodoros maritimus* and *O.*

moubata. PCR assays were performed on eggs from *R. lusitaniae*-positive females, as well as on eggs from *R. lusitaniae*-negative females. The transmission rate was calculated on the total of eggs from *R. lusitaniae*-positive females.

Tick species	Sampling sites	Number of tested females	Number of infected females	Transmission rate of <i>Rickettsia lusitaniae</i> (number of eggs infected/number tested)	Female tick specimens	Infected (yes/no)	Number of eggs infected	Number of eggs tested
<i>Ornithodorus erraticus</i>	Laboratory colony	2	2	1 (20/20)	#1	Yes	10	10
					#2	Yes	10	10
<i>Ornithodoros maritimus</i>	Carteau island, France	10	9	0.989 (89/90)	#1	Yes	10	10
					#2	Yes	10	10
					#3	Yes	10	10
					#4	Yes	10	10
					#5	Yes	10	10
					#6	Yes	10	10
					#7	Yes	10	10
					#8	Yes	10	10
					#9	Yes	9	10
					#10	No	0	10
<i>Ornithodoros moubata</i>	Laboratory colony (Neuchâtel strain)	10	10	0.75 (75/100)	#1	Yes	10	10
					#2	Yes	10	10
					#3	Yes	10	10
					#4	Yes	10	10
					#5	Yes	10	10
					#6	Yes	10	10
					#7	Yes	10	10
					#8	Yes	4	10
					#9	Yes	1	10
					#10	Yes	0	10

Table S4. Raw measures of anterior-posterior tick length, laid eggs, and hatched eggs.

Tick species	Sampling site	Number of tested females	Number of infected females	Female tick specimens	Infected (yes/no)	Number of laid eggs	Number of hatched eggs	Hatching rate (%)	Anterior-posterior length (mm)
<i>Ornithodoros maritimus</i>	Carteau island, France	20	13	#1	Yes	253	213	0.842	6.716
				#2	Yes	126	120	0.952	6.538
				#3	Yes	165	156	0.945	6.289
				#4	Yes	141	137	0.972	7.495
				#5	Yes	126	125	0.992	6.921
				#6	Yes	201	162	0.806	6.175
				#7	Yes	69	66	0.957	6.649
				#8	Yes	39	39	1	5.735
				#9	Yes	106	105	0.991	6.582
				#10	Yes	142	141	0.993	6.708
				#11	Yes	201	196	0.975	6.938
				#12	Yes	42	36	0.857	6.084
				#13	Yes	138	136	0.986	5.849
				#14	No	248	247	0.996	6.213
				#15	No	220	101	0.459	6.39
				#16	No	129	84	0.651	6.105
				#17	No	188	170	0.904	6.84
				#18	No	169	165	0.976	7.054
				#19	No	98	97	0.99	7.709
				#20	No	121	111	0.917	7.197

Table S5. Summary of the assembly information and quality analyses of the newly sequenced genomes of Rlusi-Oerra, Rlusi-Omari, and Rlusi-Omoub. OA: ongoing analyses.

Specimens details				Assembling information							
Rickettsia species	Isolate	Host	Origin	Contigs number	Genome size (bp)	N50	L50	GC rate (%)	Completeness (%)	Average coverage	CDs (miComplete)
<i>Rickettsia lusitaniae</i>	Rlusi-Oerra	<i>Ornithodoros erraticus</i>	Laboratory colony	152	1561621	15544	28	32.32	94.29	OA	1689
<i>Rickettsia lusitaniae</i>	Rlusi-Omari	<i>Ornithodoros maritimus</i>	Carteau island, France	144	1551028	18525	24	32.42	94.29	OA	1539
<i>Rickettsia lusitaniae</i>	Rlusi-Omoub	<i>Ornithodoros moubata</i>	Laboratory colony (Neuchâtel strain)	108	1450039	22266	19	32.51	94.29	OA	1452

Supplementary figure

Figure S1. Supplementary *Rickettsia* phylogenetic trees based on *gltA* sequences, including

Rickettsia detected in soft ticks. The phylogenies were constructed using maximum-likelihood

(ML) estimations on (A) 324 unambiguously aligned nucleotides and a GTR+G model as the best-fit approximation for the evolutionary model and (B) 542 unambiguously aligned nucleotides and a

GTR+G model. Branch numbers indicate percentage bootstrap support for major branches (1,000 replicates; only bootstrap values > 70 % are shown). The scale bar is in units of substitution/site.

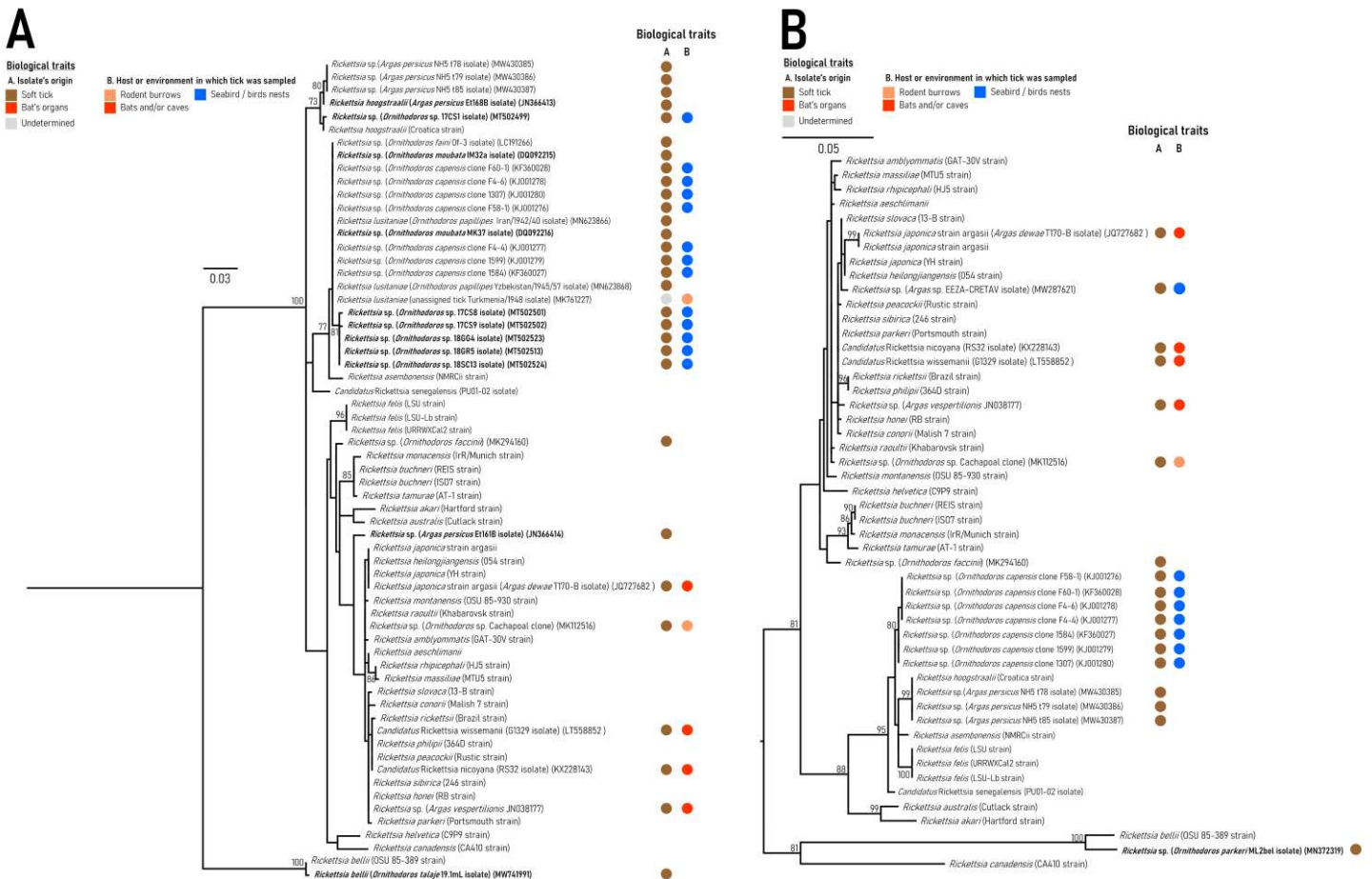
Sequences that were not included in Figure 1 are in a bold font. Details regarding added sequences

from representative *Rickettsia* groups, species, and strains available on GenBank are specified in

Tables S1.

Sequences that were not included in Figure 1 are in a bold font. Details regarding added sequences

Tables S1.



References

- Blanc G, Ogata H, Robert C, Audic S, Claverie J-M, Raoult D. 2007. Lateral gene transfer between obligate intracellular bacteria: Evidence from the *Rickettsia massiliae* genome. *Genome Res* **17**:1657–1664. doi:10.1101/gr.6742107
- Buysse M, Duron O. 2020. Two novel *Rickettsia* species of soft ticks in North Africa: ‘*Candidatus Rickettsia africaseptentrionalis*’ and ‘*Candidatus Rickettsia mauretunica*.’ *Ticks Tick Borne Dis* **11**:101376. doi:10.1016/j.ttbdis.2020.101376
- Duan C, Tong Y, Huang Y, Wang X, Xiong X, Wen B. 2011. Complete genome sequence of *Rickettsia heilongjiangensis*, an emerging tick-transmitted human pathogen. *J Bacteriol* **193**:5564–5565. doi:10.1128/JB.05852-11
- El Karkouri K, Mediannikov O, Robert C, Raoult D, Fournier P-E. 2016. Genome sequence of the tick-borne pathogen *Rickettsia raoultii*. *Genome Announc* **4**. doi:10.1128/genomeA.00157-16
- Felsheim RF, Kurtti TJ, Munderloh UG. 2009. Genome sequence of the endosymbiont *Rickettsia peacockii* and comparison with virulent *Rickettsia rickettsii*: identification of virulence factors. *PLoS One* **4**:e8361. doi:10.1371/journal.pone.0008361
- Fournier P-E, El Karkouri K, Robert C, Médigue C, Raoult D. 2012. Complete genome sequence of *Rickettsia slovaca*, the agent of tick-borne lymphadenitis. *J Bacteriol* **194**:1612. doi:10.1128/JB.06625-11
- Gillespie JJ, Driscoll TP, Verhoeve VI, Utsuki T, Husseneder C, Chouljenko VN, Azad AF, Macaluso KR. 2014. Genomic diversification in strains of *Rickettsia felis* isolated from different arthropods. *Genome Biol Evol* **7**:35–56. doi:10.1093/gbe/evu262
- Gillespie JJ, Joardar V, Williams KP, Driscoll T, Hostetler JB, Nordberg E, Shukla M, Walenz B, Hill CA, Nene VM, Azad AF, Sobral BW, Caler E. 2012. A *Rickettsia* genome overrun by mobile genetic elements provides insight into the acquisition of genes characteristic of an obligate intracellular lifestyle. *J Bacteriol* **194**:376–394. doi:10.1128/JB.06244-11

- Jima DD, Luce-fedrow A, Yang Y, Maina AN, Snesrud EC, Otiang E, Njenga K. 2015. Whole-genome sequence of “*Candidatus Rickettsia asemboensis*” strain NMRCii, isolated from fleas of Western Kenya. *Genome Announc* **3**:3–4. doi:10.1128/genomeA.00018-15. Copyright
- Karpathy SE, Slater KS, Goldsmith CS, Nicholson WL, Paddock CD. 2016. *Rickettsia amblyommatis* sp. nov., a spotted fever group *Rickettsia* associated with multiple species of *Amblyomma* ticks in North, Central and South America. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**:5236–5243. doi:10.1099/ijsem.0.001502
- Kurtti TJ, Felsheim RF, Burkhardt NY, Oliver JD, Heu CC, Munderloh UG. 2015. *Rickettsia buchneri* sp. nov., a rickettsial endosymbiont of the blacklegged tick *Ixodes scapularis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **65**:965–970. doi:10.1099/ijms.0.000047
- Matsutani M, Ogawa M, Takaoka N, Hanaoka N, Toh H, Yamashita A, Oshima K, Hirakawa H, Kuhara S, Suzuki H, Hattori M, Kishimoto T, Ando S, Azuma Y, Shirai M. 2013. Complete genomic DNA sequence of the East Asian spotted fever disease agent *Rickettsia japonica*. *PLoS One* **8**:e71861. doi:10.1371/journal.pone.0071861
- Mediannikov O, Aubadie-Ladrix M, Raoult D. 2015. *Candidatus “Rickettsia senegalensis”* in cat fleas in Senegal. *New microbes new Infect* **3**:24–28. doi:10.1016/j.nmni.2014.10.005
- Ogata H, Audic S, Barbe V, Artiguenave F, Fournier PE, Raoult D, Claverie JM. 2000. Selfish DNA in protein-coding genes of *Rickettsia*. *Science* **290**:347–350. doi:10.1126/science.290.5490.347
- Ogata H, Renesto P, Audic S, Robert C, Blanc G, Fournier P-E, Parinello H, Claverie J-M, Raoult D. 2005. The genome sequence of *Rickettsia felis* identifies the first putative conjugative plasmid in an obligate intracellular parasite. *PLoS Biol* **3**:e248. doi:10.1371/journal.pbio.0030248
- Xin D, El Karkouri K, Robert C, Raoult D, Fournier P-E. 2012. Genomic comparison of *Rickettsia honei* strain RBT and other *Rickettsia* Species. *J Bacteriol* **194**:4145. doi:10.1128/JB.00802-12

Chapitre 4

Symbiotes facultatifs : Diversité de *Spiroplasma ixodetis* et interactions chez les tiques dures

1. Contexte de l'étude

Le genre *Spiroplasma* (classe des Mollicutes) regroupe une importante diversité d'espèces bactériennes, dont la nature des interactions avec leurs hôtes se placent le long du continuum mutualisme-parasitisme (Anbutsu and Fukatsu, 2011; Cisak et al., 2015). Celles-ci se présentent à la fois comme des symbiotes intracellulaires et extracellulaires d'une large gamme d'hôtes arthropodes (Chélicérates, Diptères, Hémiptères, Hyménoptères, Coléoptères, Odonates) (Ballinger et al., 2018b; Gasparich, 2002; Lo et al., 2016), de plantes (Gasparich, 2010, 2002), de crustacés (Liang et al., 2011; Wang et al., 2005) et autre invertébrés (He et al., 2018), chez qui la transmission verticale comme mécanisme de persistance chez l'hôte est souvent rapportée (Cisak et al., 2015). Ces aspects amènent à la considération que, à l'instar de *Wolbachia*, *Spiroplasma* serait l'un des endosymbiotes facultatifs les plus répandus chez les Arthropodes (Anbutsu and Fukatsu, 2011). Si pour beaucoup d'espèces les effets induits chez leurs hôtes restent encore indéterminés, plusieurs mécanismes ont été mis en évidence pour expliquer leur maintien. En effet, plusieurs espèces transmises verticalement ont évolué vers une stratégie de *male-killing* pour persister chez leurs hôtes (Hurst and Jiggins, 2000; Jiggins et al., 2000; Sanada-Morimura et al., 2013; Tabata et al., 2011; Tinsley and Majerus, 2006). L'un des effecteurs de ce phénotype a d'ailleurs été décrit chez *Drosophila melanogaster* infectée par *S. poulsonii* : la toxine Spiroplasma

androcidine Spaid (Harumoto and Lemaitre, 2018). Récemment, un autre mécanisme de manipulation de la reproduction, l'incompatibilité cytoplasmique, a été également mis en évidence chez des guêpes parasitoïdes (Pollmann et al., 2022). Néanmoins, ce phénotype n'est pas ubiquiste parmi les espèces et souches de *Spiroplasma*. En effet, une autre stratégie de maintien a été rapportée et repose sur la protection des hôtes contre des ennemis naturels (Ballinger and Perlman, 2019; Jaenike et al., 2010; Lukasik et al., 2013; Xie et al., 2010). Il a été démontré que des souches de *S. poulsonii* pouvaient induire une protection contre des nématodes et des guêpes parasitoïdes et cela grâce à l'expression de toxines de la famille des Ribosome Inactivating Proteins (RIP) (Ballinger and Perlman, 2017; Hamilton et al., 2016).

Chez les tiques, une espèce de *Spiroplasma* est majoritairement détectée : il s'agit de *S. ixodetis*. La première isolation de cette espèce a d'ailleurs été faite à partir de tiques de l'espèce *Ixodes pacificus* en 1981 (Tully et al., 1981) avant d'être formellement décrite comme une nouvelle espèce de Spiroplasma en 1995 (Tully et al., 1995). *Spiroplasma ixodetis* est aujourd'hui identifiée chez plusieurs genres et espèces de tiques dures (*Ixodes* spp., *Dermacentor* spp., *Rhipicephalus* spp., *Haemaphysalis* spp., *Amblyomma* spp.), mais également chez diverses autres familles d'Arthropodes. L'espèce appartient au clade Ixodetis, le clade basal des *Spiroplasma*, qui ne comporte à ce jour qu'une autre espèce formellement décrite : *S. platyhelix*, isolée à partir de la libellule *Pachydiplax longipennis*. De façon intéressante, les phénotypes décrits précédemment sont retrouvés chez différentes souches de *S. ixodetis* : *male-killing*, incompatibilité cytoplasmique, symbiose défensive sont autant de mécanismes identifiés chez différents arthropodes (Ballinger and Perlman, 2019; Jiggins et al., 2000; Pollmann et al., 2022; Sanada-Morimura et al., 2013; Tabata et al., 2011; Tinsley and Majerus, 2006). Cependant, chez les tiques, aucun de ces effets, aucun biais de sex-ratio n'a été observé lié à *Spiroplasma* (Binetruy et al., 2019a; Van Oosten et al., 2018). Malgré la diversité d'espèces infectées, nous connaissons très peu sur les autres aspects de sa biologie et sur la nature de ses interactions avec les hôtes tiques, en-dehors de sa prévalence variable entre espèces et populations et de sa transmission maternelle (Binetruy et al., 2019a; Duron et al., 2008).

Spiroplasma ixodetis est un endosymbiote héritable « intrigant », tout autant que les autres espèces de *Spiroplasma* ou bien d'autres symbiotes, et pourtant très peu de génomes sont disponibles pour ce clade (Tableau 2). Les génomes sont pourtant des supports d'information génétique et de traces évolutives qui ont déjà permis de mieux comprendre les processus d'évolution des endosymbioses. Avec l'apport de connaissances via l'analyse d'autres systèmes *Spiroplasma*-arthropodes (Bolaños et al., 2015; Gerth et al., 2021; Lo et al., 2016), l'analyse des génomes de *S. ixodetis* infectant des tiques pourrait nous permettre de mieux comprendre les facteurs impliqués dans leur évolution et leur persistance au sein de ce groupe. De plus, plusieurs études relativement récentes ont rapporté des pathologies oculaires humaines liées à la présence de *S. ixodetis* chez des nourrissons immunodéprimés (Eimer et al., 2022; Farassat et al., 2021; Matet et al., 2020), des cas similaires avaient auparavant été décrits mais l'espèce de *Spiroplasma* n'était pas définie (Lorenz et al., 2002; Schroeder et al., 1997). Ces cas décrivent les premières observations d'un phénotype pathogénique de cette espèce. Ce modèle semble donc également être une opportunité d'intégrer la considération d'un continuum entre mutualisme et parasitisme à de futures analyses de génomiques comparatives.

Notre projet se focalise ici sur une étude extensive du génome des Spiroplasmes appartenant au clade Ixodetis. Ce dernier repose avant tout sur l'assemblage de nouveaux génomes isolés à partir d'individus de différentes populations et espèces de tiques et d'autres arthropodes. En se basant sur ces nouveaux génomes, nous avons pour but d'étudier les relations phylogénétiques entre les différentes souches de *S. ixodetis* chez les tiques, et par extension celles entre tous les membres du clade Ixodetis grâce aux autres génomes déjà disponibles dans les banques de données (Tableau 2). D'autre part, nous chercherons à étayer le type de phénotype associé à ces souches en recherchant dans ces génomes les effecteurs liés aux phénotypes de *male-killing* et de protection déjà rapportés chez les *Spiroplasma*, i.e. les gènes des protéines Spaid et RIP.

Dans le but d'obtenir des génomes les plus complets possibles de *Spiroplasma*, il a été décidé de réaliser en amont du séquençage une étape d'isolation par culture bactérienne. Cette

Symbiote	Souche	Hôte	Phénotype	Taille (Mbp)	Contigs	%GC	CDS	Accession number	Références
<i>Spiroplasma</i> of <i>Lariophagus distinguendus</i>		Guêpes parasitoïdes	IC	1,16	198	24,3	1,175	JALMUW000000000	Pollmann et al. (2022)
<i>Spiroplasma</i> of <i>Cephus cinctus</i>	WSS	Cèphes du blé	-	0,71	145	24,9	754	VBWQ000000000	Yeoman et al. (2019)
<i>Spiroplasma</i> of <i>Danaus chrysippus</i>	-	Papillons monarche	MK	1,75	12	23,7	1,782	-	Martin et al. (2019)
<i>Spiroplasma</i> of <i>Dactylopius coccus</i>	DCF	Cochenilles	-	1,19	286	24,21	1215	JACSEQ000000000	Vera-Ponce León et al. (2021)
<i>Spiroplasma</i> of <i>Dactylopius coccus</i>	DCM	Cochenilles	-	1,32	353	24,16	1371	JACSER000000000	Vera-Ponce León et al. (2021)
<i>Spiroplasma</i> of <i>Dactylopius opuntiae</i>	DO	Cochenilles	-	1,28	258	24,63	1260	JACSES000000000	Vera-Ponce León et al. (2021)
<i>Spiroplasma</i> of <i>Apterostigma dentigerum</i>	EntAcro10	Fourmis	-	0,84	13	25,05	776	MVYV02000000	Sapountzis et al. (2018)
<i>Spiroplasma platyhelix</i>	PALS-1	Libellules	-	0,74	3	26,7	1349	CP051215	Green and Klassen (2020)

Tableau 2. Liste des génomes de *Spiroplasma* du clade *Ixodetis* disponibles sur GenBank. IC : incompatibilité cytoplasmique ; MK : *male-killing*.

étape permet ainsi de s'affranchir du génome de l'hôte et des autres symbiotes présents qui pourraient parasiter la quantité de séquences attribuées à *Spiroplasma* obtenues. Nous allons alors nous baser sur le fait que *S. ixodetis* fait partie des rares endosymbiotes intracellulaires à pouvoir être cultivés via des protocoles ne faisant pas appel à des lignées cellulaires. Pour se faire nous allons reproduire la technique expérimentée par Tully et al. dans le cadre de l'isolation de la première souche de *S. ixodetis* (Tully et al., 1981) qui permettrait de cultiver spécifiquement *Spiroplasma in vitro* à partir de broyats de tiques entières. La littérature et études récentes utilisant cette technique était éparse lors du commencement de ce projet. Sa mise en place a nécessité plusieurs tests d'optimisation afin de remplir nos objectifs méthodologiques que nous nous sommes fixés, à savoir :

- (i) Etre capable de pouvoir obtenir un extrait ADN à partir d'une cultureensemencée par une tique unique (adulte ou nymphe), afin de pouvoir étudier finement l'association selon le type d'hôte et appréhender le plus possible la diversité des souches de *Spiroplasma*. La technique décrite par Tully et al. utilisait un broyat d'un pool de 10 femelles adultes pour la mise en culture, la concentration bactérienne d'ensemencement que nous prévoyons serait donc plus faible.
- (ii) Etre capable d'obtenir des extraits ADN suffisamment concentrés pour un séquençage haut débit, en short et long reads. Pour ces techniques, notamment le long reads, la quantité d'ADN nécessaire est soumise à des critères.

2. Méthodologie

2.1. Collection de tiques

Cette étude a été réalisée à partir d'une collection d'échantillons biologiques divers. Tout d'abord, notre collection inclut des tiques et différentes espèces arthropodes qui ont été récupérés vivants (ectoparasites de volailles du super-ordre des Parasitiformes (*Dermanysus gallinae*), des araignées non-identifiées (*Araneae* spp.) et des guêpes parasitoïdes (*Lariophagus distinguendus*)).

Les différents arthropodes ont été échantillonnés entre octobre 2019 et avril 2021, à travers la France et la Belgique grâce à la collaboration de plusieurs collecteurs. Les tiques en particulier étaient soit prélevées (non-gorgées) dans la végétation à l'aide de la technique du drapeau, soit sur hôtes vertébrés (gorgées). Les adultes femelles et mâles, les nymphes et les larves sont considérées pour cette étude. Dans le cas de la récupération de femelles gorgées, les femelles ont été isolées individuellement et conservées à 20°C et 80% d'humidité jusqu'au moment de leur ponte. Les œufs ont été conservés à 20°C jusqu'à leur utilisation. Au total, sept espèces de tiques ont été échantillonnées, deux à sept populations et de deux à 141 individus ont été inclus par espèce dans la suite de notre étude. Nous avons également utilisé des isolats de cultures référencées de deux espèces de *Spiroplasma* du clade Ixodetis (*S. ixodetis* et *S. platyhelix*), commercialisés par LGC Standards et des lignées cellulaires de tiques identifiées comme infectées par *Spiroplasma ixodetis*, fournies par la Tick Cell Biobank de Liverpool. Les Tableaux 3 et 4 récapitulent les effectifs et détails biologiques pour chaque catégorie d'échantillons. A cette collection se rajoute trois extraits d'ADN provenant chacun d'un bébé prématuré ou nouveau-né présentant des pathologies oculaires (décrites notamment dans la publication de Farassat et al., (2021)). Les auteurs ont précédemment caractérisé ces extraits comme présentant de l'ADN de *S. ixodetis* via une PCR sur le gène 16S rARN.

2.2. Isolation, mise en culture et confirmation d'infection

Le protocole général de la mise en culture d'un isolat de tiques, d'autres arthropodes ou de lignées cellulaires ou de cultures de référence de *Spiroplasma* comprend 2 temps majeurs : la préparation du milieu de culture et la préparation de l'isolat.

Pour la culture des *Spiroplasma ixodetis* dans un milieu sans cellule, nous utilisons la formule du milieu d'isolation SP-4 décrit par Whitcomb (1983) et utilisé par Tully et al. (1981). Ce milieu est préparé à partir des différents composants (solutions mères commercialisées et poudres) avant chaque mise en culture. Dans un souci de mise en commun, la liste des

composants, leur référence fournisseur, leur concentration et quantité/volume d'usage et le protocole détaillé de préparation du milieu SP-4 est disponible en annexe de ce Chapitre 3 (en anglais).

Pour la mise en culture de tiques et d'arthropodes vivants, les spécimens ont été soit isolés seuls, soit en pool d'individus, gorgés et non-gorgés. Les tiques nymphes et adultes mises en pool proviennent nécessairement d'une même population (même localité, jour de collecte, et hôte vertébré potentiel). Les larves et les œufs ont été traités en pool systématiquement en raison de leur taille restreinte qui ne permet pas une concentration suffisante d'isolat pour mettre en culture. Les larves sont isolées par deux à 15 et les œufs de 20 à 50. Les spécimens sont passées dans un bain de Javel 1% pendant 30 secondes, puis rincés à l'eau stérile par trois bains successifs de 30s/30s/1min, avant d'être broyés dans un volume de 1 mL d'une solution de PBS - BPA (Bovine Plasma Albumin) (7,5% BPA dans PBS 1X). A ce broyage sont ajoutés 2 mL de solution PBS - BPA, le volume total est filtré par un filtre de 450 nm. Avant d'être filtrés, 250 µL de broyat sont prélevés et conservés à -20°C jusqu'à utilisation. Un volume de 250 µL est également prélevé après filtration et conservé à -20°C. Le volume restant peut alors être mis en culture, comptant 300 µL d'isolat pour 3 mL de milieu de culture, contenus dans un tube de culture en verre à bouchon à vis hermétique. Les cultures sont incubées pendant 20 à 25 jours à 30°C. Pour la mise en culture des lignées cellulaires, les cellules sont en suspension au moment de la réception de l'envoi de la Tick Cell BioBank et sont traitées immédiatement. Au préalable de la mise en culture, les cellules sont lysées par action mécanique via des mouvements de flux à travers une seringue fine (diamètre 0,8 mm). La solution est centrifugée pendant 4min à 14000 rpm, les débris cellulaires sont visibles dans le culot du tube. Le surnageant est retiré délicatement. Le culot est resuspendu dans 300 µL de milieu SP-4 préparé, puis transféré dans un tube de culture contenant 3 mL de milieu de culture. Les cultures sont incubées pendant 20 à 25 jours à 30°C. Les cultures de référence sont préparées comme précisé dans les fiches techniques associées à chaque culture. Généralement, les cultures sont réhydratées dans du milieu SP-4 puis diluées en série. Les tubes de culture peuvent être directementensemencés avec 150 µL de la solution diluée au 1/10000,

toujours pour 3 mL de milieu de culture. Chaque mise en culture d'un isolat est réalisée en triplicats, ainsi que les passages.

Les différentes précautions au moment de la préparation du milieu de culture (ajout de pénicilline, filtration pré-utilisation) et au cours de l'incubation des cultures sont nécessaires pour diminuer les risques de contamination, risques notamment élevés à cause d'un temps d'incubation long.

La nécessité d'amplification des cultures par passage est nécessaire dans le cas d'une faible concentration initiale de *Spiroplasma* (i.e. tique seule, surtout nymphe). Les passages suivent le même protocole de préparation du milieu, l'étape de mise en culture utilise cette fois-ci 350µL de la culture précédente. La présence (suffisante) de *Spiroplasma* dans le milieu de culture est normalement indiquée par un shift colorimétrique du milieu, passant d'orangé à jaune. Pour augmenter la concentration de *Spiroplasma* en culture, un passage supplémentaire est réalisé sur les cultures ayant déjà opérées ce changement.

Pour chaque échantillon mis en culture, l'ADN des deux broyats prélevés (non-filtré et filtré) est extrait via le kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN), selon les recommandations du fournisseur. Chaque extrait est testé via deux PCR spécifiques de deux gènes (16S rARN et *rpoB*) avec des amorces spécifiques de *Spiroplasma*. Les protocoles PCR sont réalisés d'après Binetruy et al. (2019). Les produits PCR positifs ont été purifiés et séquencés (SANGER, Eurofins genomics). Après avoir été inspectées manuellement avec Chromas (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>), les séquences ont été alignées à l'aide de ClustalW (Thompson et al., 2003), mis en œuvre dans le logiciel MEGA X (Kumar et al., 2018), et comparés à la séquence de référence de *S. ixodetis* (souche Y32, accession number NR104852 sur GenBank). Les tests de détection de *Spiroplasma* ne pouvant être réalisés que post-mise en culture via les prélèvements de broyats non-filtrés et filtrés, l'ensemble des isolats d'arthropodes sont mis en culture et au moins un cycle de passage est effectué. Cette temporalité permet de réaliser l'extraction d'ADN des échantillons de broyats, l'amplification spécifique par PCR des deux gènes

de *Spiroplasma*, l'envoi au séquençage des produits PCR obtenus et l'analyse des séquences afin de valider la présence de *S. ixodetis* dans la culture. De plus, laisser l'isolat en culture pour au moins un passage permet de prendre en compte l'éventualité d'une erreur d'amplification PCR ou bien la présence d'une souche divergente dont l'amplification est moins effective avec nos primers.

2.3. Prélèvement des cultures de *Spiroplasma*

Pour les cultures à partir de broyats d'arthropodes et de cultures de référence, un volume de 1,5 mL de culture est prélevé puis centrifugé 4min à 14000 rpm. Le surnageant est retiré afin de resuspendre le culot bactérien dans 200 µL de PBS 1X. La solution est conservée à -20°C jusqu'à extraction. Dans le cas d'une culture faiblement concentrée (shift colorimétrique léger qui n'augmente pas en intensité entre deux passages), il est possible de combiner plusieurs culots bactériens par resuspension successive de 2 à 5 tubes en série. Le volume final du prélèvement correspond ainsi au même volume qu'une resuspension unique. Pour les cultures à partir de lignées cellulaires de tiques, le processus de prélèvement décrit ci-dessus est précédé d'une étape de filtration via un filtre de 5 µm afin de retirer le plus de débris cellulaires potentiellement présents.

Le processus de congélation est identique pour tout type d'isolat. Après prélèvement de la culture, le volume restant de culture est centrifugé 4min à 14000 rpm. Le surnageant est éliminé afin de resuspendre le culot dans une solution composée de 2 volumes de milieu de culture fraîchement préparé et 1 volume de solution de glycérol 60%. Les échantillons sont conservés à -80°C jusqu'à la remise en culture de la souche.

2.4. Extraction ADN, dosage et séquençage

Les critères requis pour les deux techniques de séquençage envisagées sont différents, ceux concernant le séquençage long reads demandant des quantités d'ADN supérieures à 2 µg par

échantillon et une qualité d'extraction permettant la conservation de longs fragments d'ADN. Les différentes cultures de *Spiroplasma* positives n'ont alors pas été traitées de la même façon. Les cultures à faible concentration apparente de *Spiroplasma* (critère décrit ci-dessus) ne sont pas privilégiées pour une perspective de séquençage long reads.

Dans la perspective d'un séquençage short reads, l'extraction ADN est réalisée via le kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN), selon les recommandations du fournisseur. Pour détail, la lyse chimique par protéase K est réalisée sur 2h à 56°C et l'ADN est élué dans un volume de 30µL du tampon d'élution fourni. Dans la perspective d'un séquençage long reads ou hybride (short et long reads), l'extraction d'ADN est faite via un protocole par phénol-chloroforme, adapté d'un protocole publié par Tilak et al. (2019). La liste des composants, leur référence fournisseur, leur concentration et quantité/volume d'usage et le protocole détaillé est disponible en annexe de ce Chapitre 3 (en anglais). Ce protocole a été adapté à la lyse de culots bactériens et à la récupération de quantités faible d'ADN. La resuspension du culot d'ADN est faite via un volume de 30 µL d'eau stérile à 4°C pendant 24h. La qualité et la quantité d'ADN des différents extraits d'ADN sont mesurées par deux techniques : par NanoDrop (Thermo Scientific) pour la mesure de contaminants protéiques et chimiques (respectivement par les ratios spectrophotométriques 260/280 et 260/230) et par QuBit (Invitrogen) pour la mesure de la quantité d'ADN par fluorométrie. Ces mesures ont également été faites pour les trois extraits ADN provenant de cas d'infection humains.

La production des banques et les séquençages short reads et hybride (short et long reads à partir du même échantillon) ont été réalisés par la plateforme MGX de Montpellier (France Génomique National). Les banques short reads ont été séquencées sur une piste d'une flow cell MiniSeq Mid-Output en paired-end 150 nt (Illumina), les banques long reads ont été séquencées par une flow cell MinION (Oxford Nanopore Technologies).

2.5. Typage moléculaire, analyses phylogénétiques et comparaison nucléotidiques

Les trois extraits ADN provenant de cas d'infection humains ont été typés pour plusieurs gènes (16S rARN, *rpoB*, *dnaK*, *epsG* et *gyrA*) par amplification PCR d'après les protocoles décrits par Binetruy et al. (2019). Les relations phylogénétiques ont été évaluées entre ces souches en utilisant les séquences concaténées des gènes. Des séquences supplémentaires de *S. ixodetis* et de *Spiroplasma* spp. disponibles sur GenBank ont été incluses dans cette analyse. Les séquences ont été alignées à l'aide de mafft (v7.450) (Kato et al., 2002), les positions mal alignées ont été supprimées à l'aide de trimal (v1.2rev59) (Capella-Gutiérrez et al., 2009), puis les alignements de séquence non ambigus ont été concaténés à l'aide d'AMAS (Borowiec, 2016). La phylogénie a été construite par la méthode de maximum de vraisemblance sous RAxML (v8.2.12) (Stamatakis, 2014) et d'un test de robustesse par 1000 bootstraps. Le meilleur modèle d'évolution des séquences avait au préalable été déterminé par critère d'Akaike (AICc) à l'aide de modeltest-ng (v0.1.5) (Darriba et al., 2020).

Une première estimation de la diversité des souches séquencées par NGS a été faite par le calcul d'une matrice d'identité des séquences nucléiques via les séquences du gène 16S rARN obtenues lors de la confirmation d'infection des tiques et autres arthropodes. Cette matrice a été calculée à l'aide du logiciel MEGAX et visualisée à l'aide du package R heatmaply.

3. Résultats préliminaires

3.1. Inventaires des souches positives et séquencées

Au cours de deux années d'expérimentation, nous avons mis en culture des isolats d'individus appartenant à 12 espèces d'arthropodes, dont sept espèces de tiques dures, pour un total de plus de 249 individus (larves non incluses dans ce décompte total), le tout réparti en 126 cultures (Tableau 3). Nous avons déterminé à partir d'amplification des gènes 16S rARN et *rpoB* post-mise en culture si des souches de *Spiroplasma* spp. étaient présentes dans ces isolats. Par

Espèce hôte	Localité et détails échantillonnage	Collecteurs	Echantillons					C
			F	M	N	L*	W*	
1 Tiques dures <i>Ixodes ricinus</i>	1 Commune de Gardouch, Haute-Garonne, France, entre 2019 et 2021	Helene Verheyden	9	6	8	5	1	
	1 Site Vallons et Coteaux de Gascogne (CEFS), 2020	Helene Verheyden	14	3			3	
	1 Forêt de Sénart, Ile-de-France, France, 2019	Sarah Bonnet			1	1		
	1 Chizé, Deux-Sèvres, France, 2020	Olivier Plantard	1	13	18			
	1 Forêt du Herrenwald, Bas-Rhin, France, 2020	Nathalie Boulanger		10				
	1 De Dorschkamp, Wageningen, Belgique, 2021	Hein Sprong			50			
	1 Bissy-sur-Fley, Saône et Loire, Bourgogne, France, 2021	Frédéric Jourdain	2					
Espèce totale	7		26	32	77	6	4	46
1 Tiques dures <i>Ixodes frontalis</i>	1 Leg CVFSE Philippe Gourlay, France, 2019-2020	Olivier Plantard	2			1	0	
	1 Chizé, Deux-Sèvres, France, 2019	Olivier Plantard				1		
	1 St-Bauzille-de-Montmel, Hérault, France, 2021	Olivier Duron	1				1	
	1 Saint Père en Retz, Loire-Atlantique, 2021	Olivier Plantard	1					
	1 Commune Saint-Herblain, Loire-Atlantique, 2021	Olivier Plantard			4	1		
	1 Carquefou, Loire-Atlantique, France, 2021	Olivier Plantard	1					
Espèce totale	6		5		4	3	1	15
1 Tiques dures <i>Ixodes hexagonus</i>	1 Hérault, France, 2019	Frédéric Delsuc	1				1	
	1 St Mathieu de Trévières, Hérault, France, 2020	Olivier Duron	1					
Espèce totale	2		2				1	3
1 Tiques dures <i>Dermacentor reticulatus</i>	1 Forêt du Herrenwald, Bas-Rhin, France, 2020-2021	Nathalie Boulanger	7	3				
	1 Chizé, Deux-Sèvres, France, 2020	Olivier Plantard	4					
	1 Bernardswiller, Bas-Rhin, France, 2020	Nathalie Boulanger	3	4				
	1 Commune de Gardouch, Haute-Garonne, France, entre 2019 et 2021	Helene Verheyden	1				1	
Espèce totale	4		15	7			1	8
1 Tiques dures <i>Dermacentor marginatus</i>	1 Pompignan, Gard, France, 2019	Frédéric Stachurski, Laurence Vial & Maxime Duhayon	7	1			3	
	1 Longuiers, Aveyron, France, 2020	Arnaud Robert	4				1	
	1 Corse, France, 2019	Karen McCoy		1				
	1 Versant A, Bissy-sur-Fley, Saône et Loire, Bourgogne, 2021	Frédéric Jourdain	10	10				
	1 Versant B, Bissy-sur-Fley, Saône et Loire, Bourgogne, 2021	Frédéric Jourdain	10	10				
	1 Centre équestre, Hérault, France, 2020-2021	Olivier Duron	3	2				
Espèce totale	6		34	24			4	27

1	Tiques dures	<i>Dermacentor sp.</i>	1	Chizé, Deux-Sèvres, France, 2020	Olivier Plantard	1					
			1	Centre équestre, Hérault, France, 2020	Olivier Duron				1		
			1	Caroux, Hérault, France, 2021	Karen McCoy	2					
Espèce totale			3			2	1	1	1	3	
1	Tiques dures	<i>Rhipicephalus sp.</i>	1	Région Sud, France, 2021	Karen McCoy	2	2				
			1	Tiny House Justine Boutry, Hérault, France, 2021	Justine Boutry		1				
			1	ND	ND	1					
			1	Centre équestre, Hérault, France, 2020	Olivier Duron			1			
			1	Bois de Montmaur, Montpellier, Hérault, France, 2019	Nora Darcherif	2					
			1	Réserve Naturelle du Lez, Montpellier, France, 2020	Olivier Duron & Marie Buisse	1					
			1	Mas-de-Londres, Hérault, France, 2021	Olivier Duron	1					
Espèce totale			7			7	3	1		8	
1	Araignées	<i>Araneae sp. 1</i>	1	Hérault, France, 2020	Olivier Duron & Marie Buisse	ND	ND	ND	ND	ND	8
1	Araignées	<i>Araneae sp. 2</i>	1	Hérault, France, 2020	Olivier Duron & Marie Buisse	ND	ND	ND	ND	ND	1
1	Araignées	<i>Araneae sp. 3</i>	1	Hérault, France, 2020	Olivier Duron & Marie Buisse	ND	ND	ND	ND	ND	1
1	Guêpes	<i>Lariophagus distinguendus</i>	1	Strain STU	Marie Pollman	ND	ND	ND	ND	ND	1
				Strain SWD	Marie Pollman	ND	ND	ND	ND	ND	1
				Strain VAI	Marie Pollman	ND	ND	ND	ND	ND	1
				Strain CAN	Marie Pollman	ND	ND	ND	ND	ND	1
1	Acariens	<i>Dermanysus gallinae</i>	1	Elevage de CEFE à Montpellier, Hérault, France, 2020	Lise Roy	ND	ND	ND	ND	ND	2
12											126

Tableau 3. Inventaire des différentes espèces d'arthropodes utilisées dans le cadre de cette étude. F : femelles ; M : mâles ; N : nymphes ; L : larves ; W : œufs ; C : cultures ; * : utilisés en pool.

Espèce hôte		Localité et échantillonnage	Détails de l'échantillon			
1	Tiques dures	<i>Ixodes ricinus</i>	Slovaquie, 2013	Tick Cell Biobank	IRE/CTVM19/Sp. Brastislava1	1
			Slovaquie, 2013	Tick Cell Biobank	IRE/CTVM20/Sp. Brastislava2	1
			Slovaquie, 2013	Tick Cell Biobank	IRE/CTVM20/Sp. Brastislava3	1
			Pays-Bas, 2005-2006	Tick Cell Biobank	IRE/CTVM19/SP. IXRI5-7	1
			Pays-Bas, 2005-2006	Tick Cell Biobank	IRE/CTVM20/Sp. IXRI8	1
1	Tiques dures	<i>Ixodes persulcatus</i>	Russie, 2015	Tick Cell Biobank	BME/CTVM23/Sp. Irkutsk1	1
			Russie, 2015	Tick Cell Biobank	BME/CTVM23/Sp. Irkutsk2	1
			Russie, 2015	Tick Cell Biobank	BME/CTVM23/Sp. Irkutsk3	1
1	Tiques dures	<i>Ixodes pacificus</i>	Oregon (Etats-Unis d'Amerique), 1979-1980	LGC ATCC	Y32 (ATCC-33835)	1
1	Tiques dures	<i>Dermacentor reticulatus</i>	Pays-Bas, 2005-2006	Tick cell Biobank	BME/CTVM23/Sp. DRET6	1
			Pays-Bas, 2005-2006	Tick cell Biobank	BME/CTVM23/Sp. DRET8	1
			Pologne, 2014	Tick Cell Biobank	BME/CTVM23/Sp. Bialystok1	1
1	Tiques dures	<i>Dermacentor marginatus</i>	Espagne, 2015-2016	Tick Cell Biobank	BME/CTVM23/Sp. DMAR11	1
1	Libellules	<i>Pachydiplax longipennis</i>	-	LGC ATCC	PALS-1 (ATCC-51748)	1
6						12 2

Tableau 4. Inventaire des lignées cellulaires de tiques et cultures de référence de *Spiroplasma* utilisées dans le cadre de cette étude.

comparaison avec la séquence de référence de la souche *S. ixodetis* Y32, nous reportons la présence de *S. ixodetis* chez des individus des espèces de tiques *I. ricinus*, *I. frontalis*, *D. marginatus*, *Dermacentor* sp., chez des individus de l'espèce de guêpes parasitoïdes *Lariophagus distinguendus* et chez une espèce d'araignées *Araneae* sp. Aucun isolat provenant de populations naturelles des espèces de tiques *I. hexagonus*, *D. reticulatus* et *Rhipicephalus* spp. et d'acariens *Dermanysus gallinae* ne s'est révélé positif en PCR ou en culture (aucun shift colorimétrique après plus de 4 passages).

La présence de *S. ixodetis* est détectée à partir du broyat d'arthropodes mis en culture par PCR, nous permettant de réguler notre stock de cultures et la mobilisation des efforts autour de cultures « prometteuses ». Sur les 46 mises en culture d'isolats d'*I. ricinus*, 15 provenaient d'au moins un individu infecté (32,6%), pour *I. frontalis* ce nombre est de 5 sur 15 cultures (33,3%). Pour *D. marginatus* et *Dermacentor* sp., les taux d'isolats positifs étaient plus forts (24 sur 27 pour *D. marginatus* (88,9%); 2 sur 3 pour *Dermacentor* sp. (66,7%)). Nous n'avons pas réalisé d'analyses de prévalence à partir des tiques échantillonnées en raison du comportement sporadique, aussi bien temporel que spatial, de notre échantillonnage. Néanmoins, ces résultats suggéraient une prévalence forte de *S. ixodetis* dans les populations échantillonnées de *D. marginatus*. Dans le cadre de la vérification de présence de *S. ixodetis* dans les lignées cellulaires et cultures de *Spiroplasma* post-mise en culture, toutes les souches étaient positives par amplification PCR.

Les cultures de *S. ixodetis* ont montré des signes de croissance à différentes temporalités selon les espèces de tiques. Les cultures à partir de *D. marginatus* présentent un shift colorimétrique entre le premier et le troisième passage. Il est fortement supposé que la concentration d'ensemencement des cultures influence ce facteur, plusieurs pools d'adultes déclarant ce shift avant des cultures de nymphes seules, pour donner un résultat illustratif. Le développement à partir des deux cultures de référence de *Spiroplasma* du clade *Ixodetis* est également rapide, dès la première mise en culture, sûrement influencé par une concentration importante de *Spiroplasma* ensemencés. C'est une observation également faite pour les lignées

Espèce hôte	Localité et détails échantillonnage	Types d'échantillons séquencés	Technique de séquençage utilisée		
			Illumina	Hybride (Illumina + MinION)	MinION
<i>I. ricinus</i>	Site Vallons et Coteaux de Gascogne (CEFS), 2020	Pool de femelles	1		
	Forêt du Herrenwald, Bas-Rhin, France, 2020	Pool de mâles	1		
	Commune de Gardouch, Haute-Garonne, France, entre 2019 et 2021	Pool de larves	1		
	Chizé, Deux-Sèvres, France, 2020	Pool de larves, pool de nymphes	2		
	Slovaquie, 2013	IRE/CTVM19/Sp. Brastislava1	1		
	Slovaquie, 2013	IRE/CTVM20/Sp. Brastislava2	1		
	Slovaquie, 2013	IRE/CTVM20/Sp. Brastislava3	1		
	Pays-Bas, 2005-2006	IRE/CTVM19/SP. IXRI5-7	1		
	Pays-Bas, 2005-2006	IRE/CTVM20/Sp. IXRI8	1		
<i>I. frontalis</i>	St-Bauzille-de-Montmel, Hérault, France, 2021	Femelle individuelle	1		
	Commune Saint-Herblain, Loire-Atlantique, 2021	Pools de nymphes	2		
<i>I. persulcatus</i>	Russie, 2015	BME/CTVM23/Sp. Irkutsk1	1		
	Russie, 2015	BME/CTVM23/Sp. Irkutsk2	1		
	Russie, 2015	BME/CTVM23/Sp. Irkutsk3	1		
<i>I. pacificus</i>	Y32 (ATCC-33835)	Culture de référence		1	
<i>D. marginatus</i>	Pompignan, Gard, France, 2019	Pools de femelles, femelles & mâles individuels	4	2	
	Longuiers, Aveyron, France, 2020	Pools de femelles	1	1	
	Corse, France, 2019	Mâle individuel	1		
	Versant A, Bissy-sur-Fley, Saône et Loire, Bourgogne, 2021	Pools de femelles, pools de mâles	2		
	Versant B, Bissy-sur-Fley, Saône et Loire, Bourgogne, 2021	Pools de femelles, pools de mâles		3	
	Centre équestre, Hérault, France, 2020-2021	Femelles individuelles	2		
	Espagne, 2015-2016	BME/CTVM23/Sp. DMAR11	1		1
<i>D. reticulatus</i>	Pays-Bas, 2005-2006	BME/CTVM23/Sp. DRET6	1		1
	Pays-Bas, 2005-2006	BME/CTVM23/Sp. DRET8	1		1
	Pologne, 2014	BME/CTVM23/Sp. Bialystok1	1		1
<i>Araneae sp. 1</i>	Hérault, France, 2020	Pool d'adultes	1		
<i>L. distinguendus</i>	Strain SWD	Femelle individuelle	1		
	Strain VAI	Femelle individuelle	1		
	Strain CAN	Femelle individuelle	1		
<i>P. longipennis</i>	PALS-1 (ATCC-51748)	Culture de référence		1	
ND	Isolats de <i>Spiroplasma</i> chez des cas humains	ND	2		
			36	8	4

Tableau 5. Tableau récapitulatif des échantillons envoyés au séquençage NGS, avec le détail des techniques utilisées.

cellulaires, mais uniquement pour les lignées créées à partir d'individus des espèces *D. marginatus* et *D. reticulatus*. En effet, les culturesensemencées avec les différentes lignées cellulaires d'*I. ricinus* et *I. persulcatus* n'ont présenté que de faibles changements colorimétriques, et ce même jusqu'à un troisième passage. Ce phénomène était similaire pour les cultures d'isolats d'individus de populations naturelles d'*I. ricinus* et *I. frontalis*. Pour obtenir des quantités d'ADN suffisantes à partir de ces cultures moins développées, plusieurs tubes de prélèvement d'une même culture et passage sont combinés avant l'extraction d'ADN. Ces différences de développement entre souches se retrouvent néanmoins au niveau de la quantité d'ADN récupérée (Tableaux S1 à S3), et peuvent par conséquent influencer le type de séquençage possible et/ou sa faisabilité (construction effective des banques de séquences pré-séquençage).

Toutes les cultures issues d'individus infectés par *S. ixodetis* n'ont pas permis la récupération d'échantillons d'ADN. A partir des broyats de tiques, sur les 24 cultures de *D. marginatus*, 16 échantillons de souches distinctes ont pu être prélevés et extraits (66,7%). Cette proportion d'échantillons ADN prélevés est plus basse chez *I. ricinus*, où la mise en culture de *S. ixodetis* n'a permis que l'obtention de cinq extraits d'ADN (5 sur 15, 33,3%). La quantité d'ADN dans ces échantillons est faible, se situant dans l'intervalle inférieur des critères exigés par une plateforme de séquençage (Tableaux S1 à S3). Trois extraits à partir d'isolats d'*I. frontalis* ont été récupérés (3 sur 5, 60%). Toutes les mises en culture à partir des lignées cellulaires et cultures de référence ont permis l'obtention d'extraits d'ADN fortement concentrés. Enfin, les cultures de broyats d'araignées et de guêpes parasitoïdes ont donné lieu à un et trois échantillons d'ADN, respectivement. Les concentrations en ADN varient selon les échantillons, mais plusieurs échantillons remplissent néanmoins les critères de séquençage long reads (Tableau 5). Avant leur séquençage, les extraits ADN sont testés par amplification PCR spécifique du gène 16S rARN afin de valider la présence de séquences de *S. ixodetis*. Au total, 44 isolats de *S. ixodetis*, dont 37 provenant de 6 espèces différents de tiques et 20 localités géographiques, ont pu être donnés à la plateforme de séquençage MGX pour la réalisation de techniques de séquençage NGS (Tableau 5).

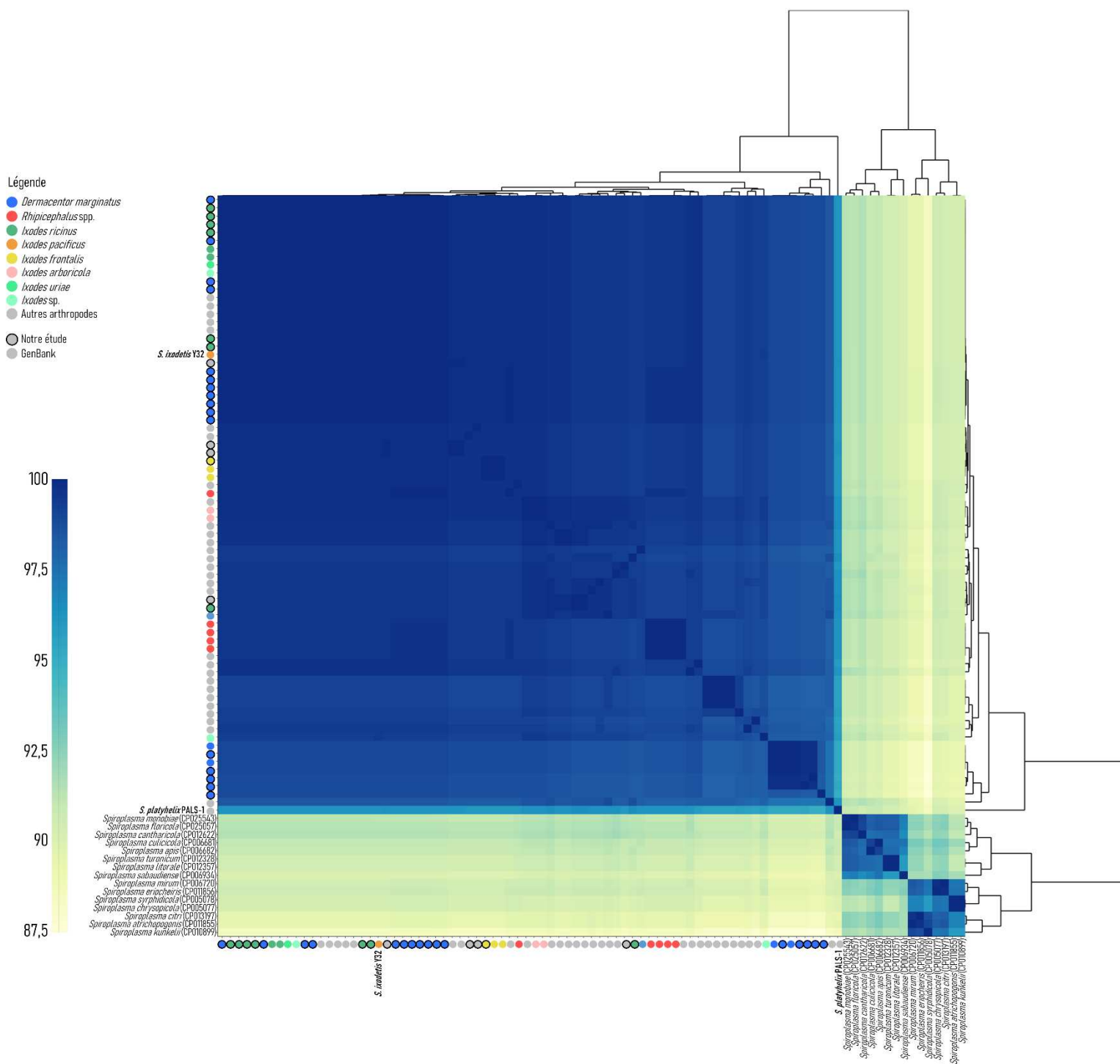


Figure 7. Matrice d'identité des séquences nucléiques entre les séquences du gène 16S rARN (709 bp) des souches de *S. ixodetis* séquencées, d'autres séquences de *S. ixodetis* et de *Spiroplasma* spp. Les clusters sont déterminés à l'aide du package R "heatmply".

Deux extraits d'ADN provenant de patients présentant des symptômes oculaires liés à une infection par *S. ixodetis* présentaient les critères requis pour un séquençage NGS.

Une majorité des échantillons remplissaient les critères pour un séquençage short reads Illumina MiniSeq. L'ensemble de nos extraits ont alors été séquencés par cette technique. Pour préserver un nombre suffisant de reads par échantillon, leur séquençage s'est réparti sur trois runs. Pour augmenter les chances d'obtenir des génomes complets présentant peu de contigs (voire circularisés), nous avons opté pour l'utilisation de la technique de séquençage hybride Illumina MiniSeq couplée à du Nanopore MinION. Un nombre plus restreint d'échantillons a pu être séquencé via cette procédure. Les Tableaux S1 et S2 et S3 détaillent la liste des échantillons séquencés par run et par technique.

Les différents runs de séquençage au sein de la plateforme MGX ont été achevés, le séquençage MinION de 4 échantillons est en cours de finalisation. Sur les 44 extraits gérés par la plateforme MGX, 9 ne présentaient finalement pas assez de quantité d'ADN pour réaliser la construction des banques de séquences et leur analyse ne s'est pas poursuivie. Finalement, nous sommes en possession actuellement de 33 jeux de données bioinformatiques, avec comme objectif l'assemblage et l'analyse des génomes de *S. ixodetis*.

3.2. Première estimation de la diversité des souches séquencées

L'assemblage des différents génomes de *S. ixodetis* est en cours et ne sera discuté plus bas que dans une approche méthodologique en l'absence de résultats les concernant. Néanmoins, à partir des séquences du gène 16S rARN obtenus lors du contrôle des cultures, nous avons analysé sommairement la diversité des souches de *S. ixodetis* présentes dans nos différents spécimens arthropodes via une matrice d'identité nucléotidique (Figure 7). Comme identifié par comparaison avec la souche de référence Y32, tous nos isolats partagent une plus grande similarité avec les autres membres du clade *Ixodetis* des Spiroplasma disponibles sur GenBank, plutôt avec d'autres espèces de *Spiroplasma* comme *S. mirum* ou *S. citri*. Les variations

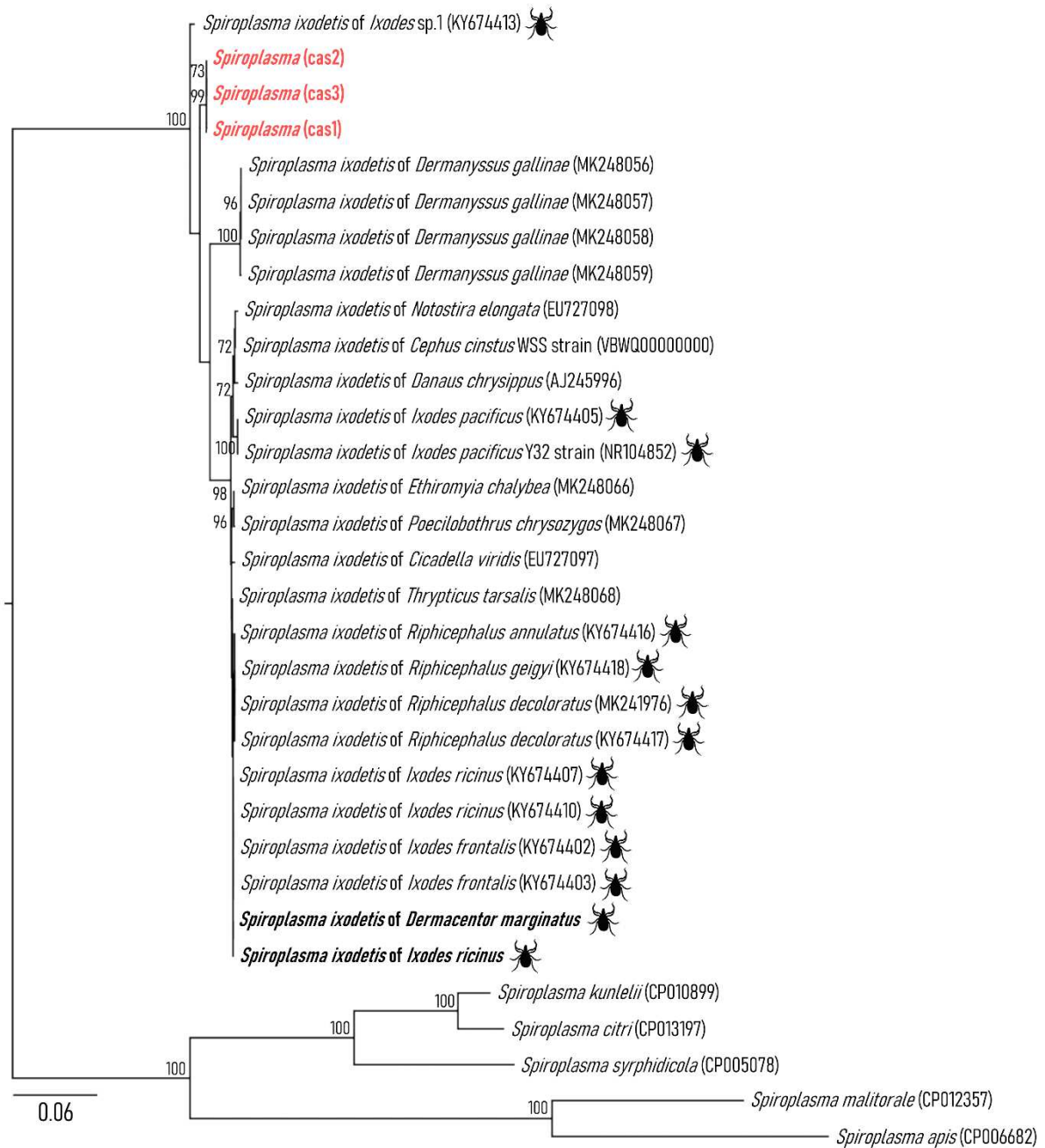


Figure 8. Arbre phylogénétique d'espèces du genre *Spiroplasma* basé sur les séquences concaténées des gènes *rpoB*, *dnaK*, *epsG* et *gyrA* (1934 bp) et construit par maximum de vraisemblance (modèle GTR+G, 1000 bootstraps). Les séquences de *Spiroplasma* identifiées chez des tiques sont représentées par le symbole d'une tique. Les séquences obtenues dans le cadre de cette étude sont en gras. Les séquences correspondantes aux extraits prélevés lors des cas humain d'infection à *Spiroplasma* sont représentées par une police rouge (gras).

nucléotidiques sont faibles au sein du cluster Ixodetis ici (d'après 709 bp du 16S rARN), ce qui impose une précaution à l'analyse de structuration de ce clade d'après le type d'hôte de *S. ixodetis*. Néanmoins, au sein des espèces *D. marginatus* et *I. ricinus*, il existerait une variation intra-spécifique. De plus, cette analyse ne met pas évidence de regroupement de séquences en fonction du type d'hôte, tiques versus autres arthropodes par exemple. Pour finir, ces variations sur le gène 16S rARN laissent présager comme nous pourrions observer également une variation intra- et interspécifique lors d'analyses se basant sur les génomes entiers.

Les extraits d'ADN provenant de cas pathologiques liés à la présence de *Spiroplasma* ont précédemment été testés par Farassat et al. (2021) dans le cadre de leur étude et ont démontré leur assignation en tant que *S. ixodetis* sur la base du gène 16S rARN. Ici, en dehors du séquençage NGS de ces échantillons, nous avons cherché à amplifier des séquences pour d'autres gènes, dont à nouveau 16S rARN pour obtenir une séquence plus grande, afin d'étudier plus finement l'assignation de ceux-ci au sein du clade Ixodetis. Nous avons amplifié avec succès les séquences pour quatre des gènes pour les trois extraits (i.e. le gène 16S rARN n'a pas été amplifié), permettant de produire une phylogénie à partir de leurs séquences concaténées. Celles-ci ont été comparées à des séquences de *S. ixodetis* provenant de tiques et autres arthropodes. La souche de *S. platyhelix* PALS-1 n'a pas été incluse dans cette analyse pour cause de manque d'un des gènes dans le seul génome déposé sur GenBank (CP051215), produit par Green and Klassen (2020). Les souches de *Spiroplasma* impliquées dans ces trois cas sont phylogénétiquement proches, se regroupant ensemble au sein du clade Ixodetis (Figure 8). Si ces trois souches appartiennent bien au clade Ixodetis, elles semblent divergentes ; au même titre que les *Spiroplasma* isolés chez *Dermanyssus gallinae*, elles sont regroupées ensemble et sur une branche différente des autres *S. ixodetis* de tiques, de papillons, de cicadelles et autres arthropodes.

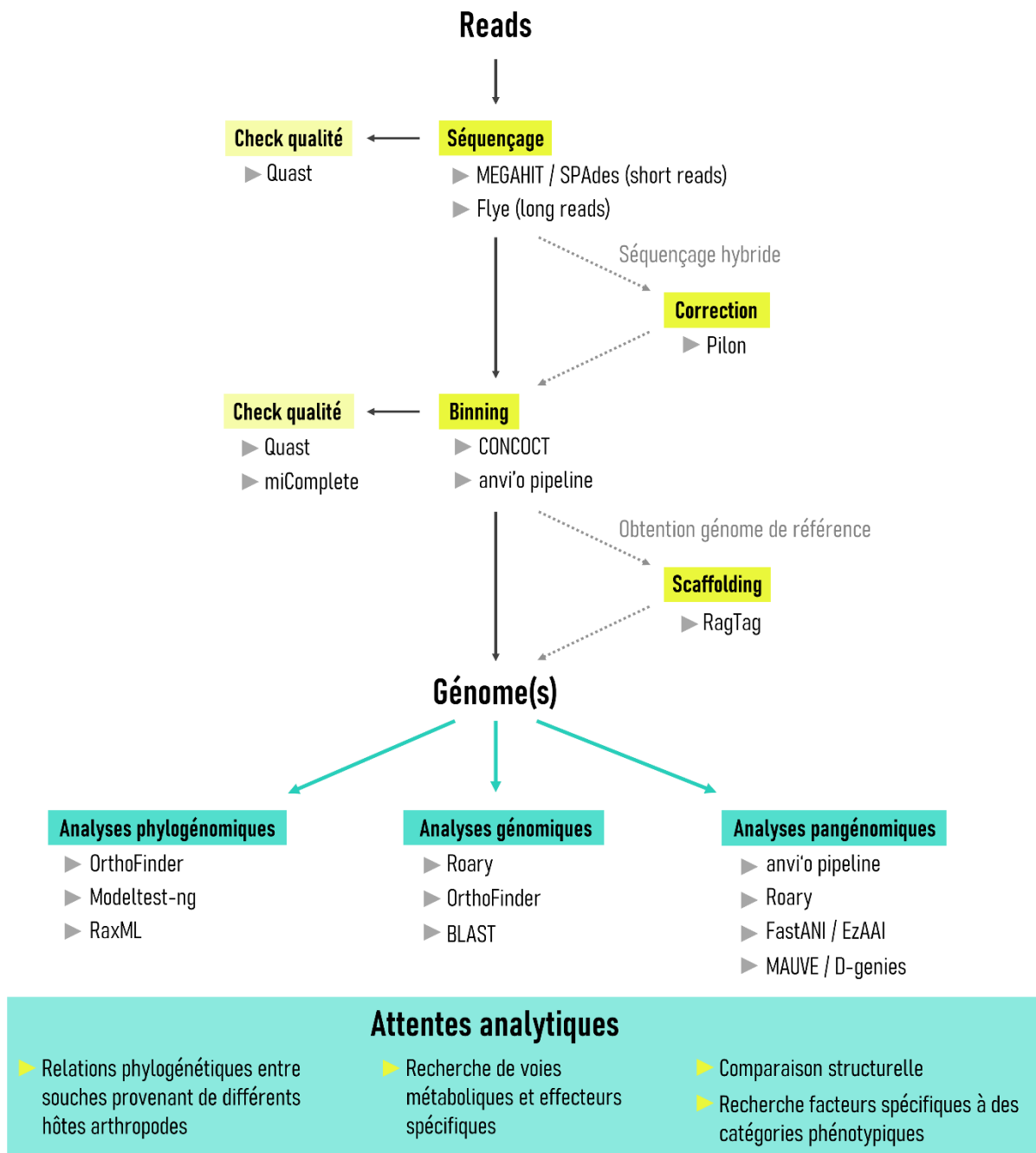


Figure 9. Méthodologie prévisionnelle dans le cadre de l'assemblage et l'analyse des génomes de *Spiroplasma*. Les outils bio-informatiques sont précisés pour chaque étape.

4. Perspectives

Les perspectives à court terme des travaux présentés ici sont l'assemblage et l'analyse des génomes obtenus. D'après le retour d'expérience sur différents outils bio-informatiques liés à ce type d'objectifs via des projets similaires (précédemment présentés en Chapitre 1, 2 &3), les étapes suivantes (et les outils associés) sont identifiées et prêtes à être mises en place (Figure 9). La chronologie imposée par le temps de cultures et le temps de séquençage fait que ces résultats ne seront pas rapportés au cours de cette thèse mais feront l'objet de publications postérieures. L'obtention des premiers génomes de *Spiroplasma* du clade Ixodetis par d'autres équipes n'est que très récente (2019), mais depuis, plusieurs autres sont disponibles. Ces génomes seront évidemment intégrés à nos analyses. Les génomes isolés chez *Danaus chrysippus* (*male-killing*) et *Lariophagus distinguendus* (incompatibilité cytoplasmique) pourraient notamment nous aider lors de la recherche des effecteurs des mécanismes de manipulation de la reproduction. Plusieurs autres génomes de *Spiroplasma* d'autres clades seront inclus dans nos analyses, en essayant d'avoir au moins un représentant des différents phénotypes de *Spiroplasma* identifiés (mutualistes et pathogènes). Comparés à ces génomes, l'analyse des génomes de *S. ixodetis* associés à des cas d'infections humaines pourrait nous aider à comprendre les particularités de ces souches. Ils seront assurément un support pour étudier plus finement leurs relations phylogénétiques avec les autres *S. ixodetis*. Ici, nous avons comparé les séquences de quatre gènes à d'autres *Spiroplasma*, mais nous n'avons pas été capables de récupérer des séquences pour le gène 16S rARN. C'est pourtant sur ce gène que les autres cas décrits de *S. ixodetis* liés à une infection chez des nourrissons ont été assignés, nous empêchant alors de pouvoir comparer l'ensemble des cas entre eux. Il sera déterminant d'identifier si les infections sont dues à des souches diverses ou à seulement un type de souches.

Au-delà de mieux comprendre les relations phylogénétiques entre les membres du clade Ixodetis, obtenir ces génomes pourrait nous permettre de rechercher la présence d'effecteurs et voie métaboliques associés à des phénotypes chez les Arthropodes (e.g. toxines RIP ou Spaid, voies de biosynthèse d'acides aminés, de vitamines), mais aussi de caractéristiques génomiques (e.g.

densité codante, taux de mutation) (Gerth et al., 2021). Ce travail serait alors une première étape pour mieux comprendre les interactions *S. ixodetis* – arthropodes et les effets phénotypiques qui pourraient expliquer leur persistance dans les espèces de tiques. D'autre part, d'autres caractéristiques de ces associations sont peu connues et pourraient faire l'objet d'études complémentaires. Celles-ci pourraient s'attacher à étudier la distribution tissulaire de *S. ixodetis* ou encore sa quantification au cours des stades de vie de la tique, pendant des challenges nutritionnels (repas sanguin, carences), des challenges biotiques (infection d'un ennemi naturel ou présence d'un autre symbiote) ou encore des challenges abiotiques (e.g. changements de température). Plusieurs études sont disponibles à propos d'autres espèces de *Spiroplasma* où ces éléments ont été décrits. Par exemple, dans le système drosophile *Drosophila hydei* – *S. poulsonii* où le symbiote joue un rôle défensif contre l'invasion de guêpes parasitoïdes, il a été observé une modulation de l'effet protecteur en fonction de la température de développement des hôtes (Corbin et al., 2021). Des données sont également disponibles sur la localisation tissulaire de *Spiroplasma*, qui peut être retrouvé dans divers compartiments, dont l'hémolymphe (Blow and Douglas, 2019) et le milieu extracellulaire (Bell-Sakyi et al., 2015). Des études corrélatives basées sur la présence des membres du microbiome des tiques soulèvent l'existence d'interactions positives et/ou négatives entre *S. ixodetis* et d'autres mutualistes et agents pathogènes de vertébrés (Aivelo et al., 2019; Lejal et al., 2021). Il pourrait également être possible de quantifier la densité d'infection d'un agent pathogène de vertébrés et la comparer à celle de *S. ixodetis*. Ces études devraient cependant se baser, théoriquement, sur des cohortes de tailles importantes ce qui pourrait limiter leur réalisation. En effet, en populations naturelles, les prévalences à la fois de *Spiroplasma* et d'autres symbiotes facultatifs sont variables, parfois basses, ce qui imposerait un taux de co-infection probablement faible, engageant à de grandes campagnes de collectes de tiques. Pour se réaliser, ces études pourraient se baser sur une collection de tiques dont le microbiome est déjà déterminé, par métabarcodage bactérien 16S rARN par exemple, puis sélectionner des individus non-infectés, mono-infectés et co-infectés.

Remerciements

Dans le cadre de ce projet, des collaborations avec des équipes de l'Université de Hohenheim (Allemagne ; Johannes Steidle et Marie Pollmann), de l'Université de Wageningen (Belgique ; Hein Sprong), de l'Université de Liverpool (Angleterre ; Lesley Bell-Sakyi et Ben Makepaece) et de l'Hôpital Universitaire de Fribourg (Allemagne ; Navid Farassat, Wolf A. Lagrèze et Johannes Camp) ont été initiées. Ces différentes collaborations nous ont permis d'initier des mises en culture à partir de divers échantillons biologiques. Nous remercions également toutes les personnes ayant participé à la collection de tiques : H. Verheyden, S. Bonnet, O. Plantard, N. Boulanger, F. Jourdain, F. Delsuc, F. Stachurski, L. Vial, M. Duhayon, A. Robert, K. McCoy, J. Boutry, N. Darcherif et L. Roy.

Annexes du Chapitre 3

[1] Protocole de mise en culture

Spiroplasma's culture protocol

Protocol adapted from Whitcomb (1983) and Tully et al. (1981), by Marie Buysse

Technical information

SP-4 *Spiroplasma* culture medium formulation according to Whitcomb (1983):

MEDIUM SP-4

Liquid Medium (total volume, 300 ml)

1. Prepare autoclavable fraction: mycoplasma broth base (Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD), 1.0 g; Bacto-Peptone (Difco), 1.60 g; Bacto-Tryptone (Difco), 3.00 g; deionized H₂O, 197.0 ml. Stir ingredients until dissolved and adjust pH to 7.8 (0.6 ml 2 N NaOH). Autoclave 30 minutes at 15 lb/in². Cool to room temperature.

2. Add the following sterile components: phenol red, 0.5% solution, 1.2 ml; potassium penicillin, 100,000 units/ml, 3.0 ml; Yeastolate (Difco), 2%, pre-filtered through 0.45- μ m and 0.22- μ m filters after stirring for 15 minutes, 30.0 ml; CMRL-1066 (10 \times), with glutamine, without NaHCO₃ (Gibco), 15.0 ml; fresh yeast extract (Flow Laboratories), 25%, 10.5 ml; fetal bovine serum, heat treated 1 hour at 56°C, 50.0 ml; glucose, 50% solution, 3 ml. Add fetal bovine serum and sterile glucose solution aseptically to autoclaved fraction. Remaining ingredients can be filtered directly into medium through a sterile 0.22- μ m filter. Final pH should be 7.4.

3. Final filtration (0.22 μ m) of the complete medium under positive pressure is desirable.

Solid Medium

1. Add 2.4 to 6.8 g Difco Noble agar (depending on spiroplasma) to autoclavable fraction before autoclaving and after adjusting pH.

2. After autoclaving, place in a 56°C water bath.

3. Allow sterile nonautoclavable fraction to warm to 56°C, and then add aseptically immediately before pouring plates.

TABLE II

COMPOSITION OF GROWTH MEDIA FOR SPIROPLASMA ISOLATION AND MAINTENANCE^a

Component	Medium								
	M1A	SP-4	SMC	BSR	C-3	C-3G	DSM4	DG-2	SM-1
Inorganic salts	—	—	—	—	—	—	—	—	+ ^b
Broth base ^c	7B	3.5B	21B	25H	15D	15D	15D	20B	
Tryptone (Difco)	3.3 g	10 g	10 g					1 g	
Peptone (Difco)	2.7 g	5.3 g						1 g	
Glucose	0.3 g	5 g	1 g	1 g				1 g	5 g
Fructose	0.3 g		1 g	1 g				1 g	
Sucrose	3.3 g		10 g	10 g	160 g	120 g	80 g	1 g	
Sorbitol	23.3 g		70 g	70 g				50 g	
Tissue culture medium ^d	533S	50C			5C, 10T			10C	
Fresh yeast extract	33 ml	35 ml	100 ml		100 ml	200 ml		10 ml	
Yeastolate		2 g						2 g	6.25 g
Lactalbumin hydrolysate									8.13 g
Serum ^e	167F	170F	200H	100H	200H	200H	100H	170H	100F
Osmolarity	545	330	670	700	735	700	472	610	465

^a Quantities for 1 liter of medium. May also contain 20–30 mg phenol red and 1.0 to 2.5 $\times 10^6$ units penicillin G.

^b SM-1 medium contains 250 mg CaCl₂ · 2 H₂O; 250 mg KCl; 125 mg MgCl₂ · 6 H₂O; 8.75 g NaCl; 150 mg NaHCO₃; and 250 mg NaH₂PO₄ · 6 H₂O per liter.

^c Grams of heart infusion broth (H), or mycoplasma broth base supplied by Difco (D) or Baltimore Biological Laboratories (B).

^d Milliliters of Schneiders *Drosophila* medium (1 \times) (Gibco) (=S); CMRL-1066 (10 \times) (with glutamine) (Gibco) (=C); TC 199 (1 \times) (=T).

^e Milliliters of fetal bovine (=F) or horse (=H) serum. Heating of serum for 30 minutes at 56°C is recommended.

Supplies and solutions preparation:

Supplies	Supplier	Reference
PBS 10X (1L)	Sigma-Aldrich	P5493-1L
Yeast extract (Fisher BioReagents™ BP1422-500 (500g))	Fischer Scientific	10225203
CMRL Medium (10X), no glutamine (500mL)	Thermo Scientific	21540026
Difco TC Yeastolate, ultra-filtered (UF) (500g)	Thermo Scientific	292804
Fetal Bovine Serum, qualified, United States (500mL)	Thermo Scientific	26140079
Penicillin G potassium salt (100 000 000 units)	Sigma-Aldrich	P7794-10MU
Bovine Serum Albumin solution (10% in DPBS, 50mL)	Sigma-Aldrich	A1595-50ML
Frey mycoplasma broth base (500g)	Sigma-Aldrich	F6797-500G
L-Glutamine solution 200mM (20mL)	Sigma-Aldrich	G7513-20ML
Tryptone	Sigma-Aldrich	T7293-250G
Peptone from casein, pancreatic digest (500g)	Sigma-Aldrich	70169-500G
Nystatin Suspension (100mL with 10 000U/mL in DPBS)	Sigma-Aldrich	N1638-100ML
Filter-seringue PES 0,2 µm 25 mm sterile (50 units)	Dominique Dutscher	725-2520
Filter-seringue Whatman UNIFLO stérile - ø : 25 mm - 0,45 µm - PVDF (45 units)	Dominique Dutscher	9913-2504
Terum Seringues Luer-Lock (50 mL) (25 units)	Fischer Scientific	15349067
Seringue 20 mL (50 units)	Dominique Dutscher	MDSS20ESE
Tick crusher (white plunger only for 1.5 ml microtube) (100 units)	Dominique Dutscher	44468-19

PBS-BPA 7.5%: 7.5 mL of BPA solution 10% + 2.5 mL of PBS 1X (10 mL of PBS-BPA 7.5%)

By sample: 3mL → adjust the prepared volume to the samples' number

Filter the solution with a 220 nm sterile membrane filter

2 M of NaOH: 80 g of NaOH powder in 1L of sterile water

As it will be autoclave with the autoclavable fraction, it is possible to prepare an important volume (100 mL)

Glucose 50%: 50 g of glucose in 100 mL of sterile water

As we need 3mL, prepare 5 mL → 2.5 g in 5 mL of sterile water

Don't forget to filter the solution with a 450 nm and a 220 nm sterile membrane filter

Penicillin 100 000 u/mL:

Knowing that the product is at 1590 u/mg, there is 100 000 u in 62.89 mg

As we need 3 mL, prepare 4 mL → 251.56 mg of penicillin powder in 4 mL of sterile water

Nystatin 10 000u/mL (not mandatory):

As we want 50 mg/L and that we consider that 10 000 u/mL is 10 000 u/mg, we put 15 mL in 300 mL of final medium

Yeastolate 2%: 2 g of yeastolate powder in 100 mL of sterile water

As we need 30 mL, prepare 50mL → 1 g of yeastolate powder in 50 mL of sterile water

Stir during 15 min then filter with a 450 nm and a 220 nm sterile membrane filter

Fresh yeast extract 25%: 25 g of yeast extract powder in 100 mL of sterile water

As we need 10.5 mL, prepare 15 mL → 3.75 g of yeast extract in 15 mL of sterile water

CMRL-1066 10X with the addition of L-glutamine to 100 mg/L

Solution L-glutamine 200 mM with 146.14 g/mol, with these data, there is 0.58456 g in 20 mL. As we need 100 mg for a liter of CMRL-1066, we need 3.42 mL. As we have 500 mL of CMRL-1066, we need 1.71 mL of L-glutamine.

Main protocol**Prepare SP-4 medium:**

In advance (the afternoon before), prepare the autoclavable fraction:

- a. Clean deeply your work station and bring the sterilized material
- b. Prepare the autoclavable fraction: for one medium (300mL final), 1g of Mycoplasma Broth Base, 1.6 g of peptone, 3 g of tryptone in 197 mL of deionized water; stir until dilution, adjust the pH at 7.8 by adding 0.6 mL of a 2 M NaOH solution and control by a sensor
- c. Store the fraction

The D-day:

- a. Prepare the sterilized material, do a classical solid autoclave cycle and let cool the material
- b. Autoclave the autoclavable fraction and sterile water 30min at 1 bar and let cool the fraction

When the liquid autoclave is cooled:

- c. Heat-treat the fetal bovine serum 60 mL during an hour at 56°C, let cool the solution
- d. During the treatment of the FBS solution, prepare all the solutions following the previous instructions (PBS-PBA 7.5%, glucose 50%, penicillin 100000u/mL, yeastolate 2%, fresh yeast extract 25%) – start with the solutions containing temperature non-sensitive components
- e. When the FBS solution is cooled, add the FBS to the autoclavable fraction, add the glucose solution to the fraction, add the remaining solutions (don't forget to filter each with a 220 nm sterile membrane filter before adding)
- f. If necessary adjust the pH, it need to be at 7.4 (do the check in a small volume of medium) – generally, add 0.5 mL of NaOH 2 M, or if necessary XmL of HCl – don't forget to filter with a 220 nm sterile membrane filter if the tested fraction is added to the medium
- g. Filter the final solution with a 220 nm sterile membrane filter – generally, it is done before and so it isn't necessary

How to wash a tick:

Put the ticks in a 1.5mL tube, add 1mL bleach 1%, stir during 30sec, remove the bleach, rinse 3 times with 1mL of sterile water, and then remove water.

For larvae/nymph/adult tick (or other specimens): prepare four 1.5mL tubes (1 bleach and 3 sterile water)

For eggs: put the eggs in a 5mL tube, wash/crush in the same tube (more simple because the eggs of hard ticks are too electrostatic and have the tendency to stay on the surface of the tip – be careful when you wash)

How to crush a tick:

Put in a 1.5 mL tube, add 1mL of PBS-BPA7.5% solution, crush the specimen with a sterile piston, and add this 1 mL to a 5mL tube containing 2 mL of PBS-BPA7.5% solution.

For smaller specimen (like *Dermanysus*): you can adjust the volume of the PBS-BPA 7.5% solution reducing to a final volume of 1mL

Finish by filtering the solution: filter the solution with a 450 nm sterile membrane filter, and put in a new 5 mL tube

Put in the *Spiroplasma* culture media:

Add 0.3 mL of the filtered solution to 3 mL of SP-4 medium

Incubation: 20 to 25 days at 30°C

[2] Protocole d'extraction

DNA extraction phenol-chloroform from bacterial cultures for long reads sequencing

Protocol adapted from Marie-Ka Tilak, Rémi Allio and Frédéric Delsuc (An optimized protocol for sequencing mammalian roadkill tissues with Oxford Nanopore Technology (ONT) - V.1), by Rachid Koual and Marie Buysse

Technical information

- Home-made lysis buffer: 100 mL solution (storage at 4°C) with 1 mL 1M Tris HCl (Sigma-Aldrich, T3253-500G); 0.2 mL 5M NaCl (Sigma-Aldrich, S9888-500G); 0.5 mL 0.5M EDTA (Sigma-Aldrich, EDS-100G); autoclave solution; after autoclaving, add 10 mL 20% SDS (Sigma-Aldrich, 05030-500 ML-F); add 100 mL sterile QSP water
- Proteinase K
- RNase (Sigma-Aldrich, R6513-10MG)
- Phenol:chloroform:isoamyl alcohol (Sigma-Aldrich, 77617-100ML)
- Chloroform:isoamyl alcohol (Sigma-Aldrich, 25666-100ML)
- Sodium acetate (3 M)
- Isopropanol
- Ethanol 70% (3 M)

Main protocol

Lysis

Take out the home-made lysis buffer 1h in advance and leave it at RT. Take out the culture tube conserved at -20°C, centrifuge for 3 min at 14000 rpm, and then remove the PBS. Add 180 µL of lysis buffer and 20 µL of proteinase K. Lysate at 56°C for 2h. Add 2.2 µL of RNase and incubate at RT for 5 min. Add an equal volume of phenol:chloroform:isoamyl alcohol, mix gently by inversion for 30 strokes until an emulsion is formed. Separate the 2 phases by centrifugation at 12 000 rpm for 5 min at RT. Recover the upper phase and put it in a new tube. Add an equal volume of chloroform:isoamyl alcohol, mix gently by inversion for 30 strokes until an emulsion is formed. Separate the 2 phases by centrifugation at 12 000 rpm for 5 min at RT. Recover the upper phase and put it in a new tube.

DNA precipitation

Add a 1/3 volume of sodium acetate into the tube, incubate at room temperature for 30 min, and then centrifuge at 14 500 rpm for 15 min. Collect the supernatant without breaking the pellet and put it in a new tube. In the recovered supernatant, add 2.5 volume of isopropanol at room temperature, and mix a few times by inversion. A pellet may form. If it doesn't, centrifuge at 14 500 rpm for 5 min at 4°C. A DNA pellet should form then. Transfer the supernatant to a low binding tube while keeping the tube containing the pellet. Add 1 mL of ice-cold 70% ethanol to each tube. Shake lightly and centrifuge both tubes at 14 500 rpm for 5 min at 4°C. Remove the ethanol and let air dry until all traces of ethanol are removed. Add 20 µL of DNase free water to each tube and let the DNA rehydrate for 3 to 4 days at 4°C. Store DNA at -20°C. Check for DNA quality and quantity in order to choose the tube with the higher DNA amount, or combine the tubes to optimize DNA quantity (but the concentration might slightly drop if there is a high difference between tubes).

[3] Données de dosage et nombre de reads obtenus après le séquençage des échantillons

Espèce hôte	Localité et détails échantillonnage	Echantillon	Concentration par Nanodrop (ng/μl)	Concentration par Qubit dsDNA (ng/μL)	Quantité ADN (ng)	Illumina + MinION	Illumina	Nombre reads total
<i>D. marginatus</i>	Longuiers, Aveyron, France, 2020	16PF	4,2	0,034	1,156		1	503 074
<i>D. marginatus</i>	Longuiers, Aveyron, France, 2020	15PF	151,7	25,4	482,6	1		777 842 + 134 741
<i>D. marginatus</i>	Pompignan, Gard, France, 2019	6PF	1,5	0,043	1,462		1	578 986
<i>D. marginatus</i>	Pompignan, Gard, France, 2019	9F	34,5	24	456	1		820 202 + 253 839
<i>D. marginatus</i>	Pompignan, Gard, France, 2019	14F	322,5	51,5	927		1	695 093
<i>D. marginatus</i>	Pompignan, Gard, France, 2019	4F	256,3	33,2	630,8		1	793 637
<i>D. marginatus</i>	Pompignan, Gard, France, 2019	7PF	5,3	10	180		1	1 217 522
<i>D. marginatus</i>	Pompignan, Gard, France, 2019	5M	88,8	53,8	968,4	1		510 314 + 175 510
<i>D. marginatus</i>	Versant A, Bissy-sur-Fley, Saône et Loire, Bourgogne, 2021	108PF	214	88,3	1589,4		1	1 266 717
<i>D. marginatus</i>	Versant A, Bissy-sur-Fley, Saône et Loire, Bourgogne, 2021	111PM	140,5	94,5	1701		1	958 241
<i>D. marginatus</i>	Versant B, Bissy-sur-Fley, Saône et Loire, Bourgogne, 2021	113PF	106,8	23,9	454,1	1		1 166 848 + 237 526
<i>D. marginatus</i>	Versant B, Bissy-sur-Fley, Saône et Loire, Bourgogne, 2021	114PM	29,1	25,6	486,4	1		2 213 749 + 257 956
<i>D. marginatus</i>	Versant B, Bissy-sur-Fley, Saône et Loire, Bourgogne, 2021	115PM	26,7	17,1	324,9	1		576 348 + 250 086
<i>D. marginatus</i>	Corse, France, 2019	10MR	4,5	0,029	0,986		1	512 809
<i>D. marginatus</i>	Centre équestre, Hérault, France, 2020-2021	48F	3,1	0,062	1,178		1	587 939
<i>I. frontalis</i>	Commune Saint-Herblain, Loire-Atlantique, 2021	89PN	185,3	45,3	815,4		1	658 275
<i>I. frontalis</i>	St-Bauzille-de-Montmel, Hérault, France, 2021	74F	1,1	0,015	0,285		1	ND
<i>I. pacificus</i>	Y32 (ATCC-33835)	Y32	175	85,1	1531,8	1		1 375 367 + 298 668
<i>P. longipennis</i>	PALS-1 (ATCC-51748)	PALS-1	250,9	241,02	6748,56	1		887 828 + 577 388
<i>Araneae sp. 1</i>	Hérault, France, 2020	A52PA	1	0,018	0,612		1	397 793

Tableau S1. Détails des échantillons envoyés au premier run de séquençage, dont les concentrations et quantités d'ADN récupérées et le nombre de reads obtenus. ND : non déterminé, ce qui signifie que les banques n'ont pas pu être construites à partir de la quantité d'ADN disponible.

Espèce hôte	Localité et détails échantillonnage	Echantillon	Concentration par Nanodrop (ng/μl)	Concentration Qubit dsDNA HS	Quantité ADN (ng)	Illumina	Nombre reads totaux
ND	Isolats de <i>Spiroplasma</i> chez des cas humains	Cas1	9,3	0,7007	19,62	1	258 629 776
ND	Isolats de <i>Spiroplasma</i> chez des cas humains	Cas3	15,9	0,6227	17,43	1	229 936 030

Tableau S2. Détails des échantillons envoyés au second run de séquençage, dont les concentrations et quantités d'ADN récupérées et le nombre de reads obtenus.

Espèce hôte	Localité et détails échantillonnage	Echantillon	Concentration par Nanodrop (ng/μl)	Concentration Qubit dsDNA HS	Quantité ADN (ng)	MinION	Illumina	Nombre reads total
<i>D. reticulatus</i>	Pologne, 2014	Biaxystok1	103,6	13	455		1	37 434 813
<i>D. reticulatus</i>	Pologne, 2014	Biaxystok1	112,5	12,3	430,5	1		AEC
<i>D. reticulatus</i>	Pays-Bas, 2005-2006	DRET6	696,1	TOO HIGH	TOO HIGH	1		AEC
<i>D. reticulatus</i>	Pays-Bas, 2005-2006	DRET6	307,2	TOO HIGH	TOO HIGH		1	38 434 593
<i>D. reticulatus</i>	Pays-Bas, 2005-2006	DRET8	351,9	TOO HIGH	TOO HIGH	1		AEC
<i>D. reticulatus</i>	Pays-Bas, 2005-2006	DRET8	237,1	TOO HIGH	TOO HIGH		1	46 441 951
<i>D. marginatus</i>	Espagne, 2015-2016	DMAR11	2,6	1,2	39,6		1	60 150 063
<i>D. marginatus</i>	Espagne, 2015-2016	DMAR11	188,3	TOO HIGH	TOO HIGH	1		AEC
<i>D. marginatus</i>	Centre équestre, Hérault, France, 2020-2021	119F	49,2	10,8	378		1	36 077 027
<i>I. ricinus</i>	Pays-Bas, 2005-2006	IXRI5-7	-0,3	0,044	1,452		1	ND
<i>I. ricinus</i>	Pays-Bas, 2005-2006	IXRI8	0,2	0,0492	1,6236		1	ND
<i>I. ricinus</i>	Slovaquie, 2013	Bratislava1	1	0,0748	2,4684		1	ND
<i>I. ricinus</i>	Slovaquie, 2013	Bratislava2	32,1	10,7	256,8		1	38 647 033
<i>I. ricinus</i>	Slovaquie, 2013	Bratislava3	39,8	15,1	362,4		1	29 509 640
<i>I. ricinus</i>	Site Vallons et Coteaux de Gascogne (CEFS), 2020	24PF	5,3	0,066	1,32		1	35 753 223
<i>I. ricinus</i>	Forêt du Herrenwald, Bas-Rhin, France, 2020	71PM	3,4	0,0322	0,644		1	ND
<i>I. ricinus</i>	Commune de Gardouch, France, entre 2019 et 2021	53PL	3	0,0198	0,396		1	ND
<i>I. ricinus</i>	Chizé, Deux-Sèvres, France, 2020	41PN	3	0,0495	0,99		1	35 662 919
<i>I. ricinus</i>	Chizé, Deux-Sèvres, France, 2020	45PM	4,1	0,014	0,28		1	ND
<i>I. frontalis</i>	Commune Saint-Herblain, Loire-Atlantique, 2021	87PN	4,2	0,026	0,52		1	20 016 396
<i>I. persulcatus</i>	Russie, 2015	Irkutsk1	40,5	20,1	482,4		1	38 255 561
<i>I. persulcatus</i>	Russie, 2015	Irkutsk2	24,3	7,27	174,48		1	37 317 197
<i>I. persulcatus</i>	Russie, 2015	Irkutsk3	27,2	12,2	292,8		1	32 641 056
<i>L. distinguendus</i>	Strain SWD	SWDF	3,8	0,0292	0,584		1	25 453 416
<i>L. distinguendus</i>	Strain VAI	VAIF1	3,1	0,022	0,44		1	ND
<i>L. distinguendus</i>	Strain CAN	CANF1	5	TOO LOW	NO VALUE		1	ND

Tableau S3. Détails des échantillons envoyés au troisième run de séquençage, dont les concentrations et quantités d'ADN récupérées et le nombre de reads obtenus. ND : non déterminé, ce qui signifie que les banques n'ont pas pu être construites à partir de la quantité d'ADN disponible ; AEC : acquisition en cours.

Discussion et perspectives

Parmi la diversité des microorganismes composant le microbiome des tiques, nous avons consacré nos projets à étudier des bactéries héritables qui engageraient *a priori* des interactions durables et étroites avec les tiques par leur hébergement dans leurs cellules. Nous avons étudié deux grandes catégories de bactéries : des bactéries obligatoires, appartenant aux genres *Coxiella*, *Francisella* et *Midichloria*, et des bactéries facultatives, telles que *Rickettsia* et *Spiroplasma*. Des concepts communs d'évolution et d'écologie des interactions guidaient nos différents projets, mais l'étude de différents systèmes a permis d'aborder différents aspects des symbioses chez les tiques.

Caractériser les membres du microbiome des tiques : un enjeu aux retombées multiples

D'un point de vue médical ou vétérinaire, identifier et caractériser un agent pathogène lié à une pathologie est primordial pour améliorer la santé de l'organisme infecté : cette étape est nécessaire au diagnostic et la mise en place d'un traitement spécifique en vue d'une rémission. Pouvoir identifier de tels agents pathogènes dans des sources environnementales ou biologiques permet également d'étudier les sources de contamination et par la suite établir des moyens de prévention et de surveillance. Si cet agent a une transmission vectorielle, les arthropodes compétents pour cet agent, participant à sa transmission et à sa persistance, dans l'environnement sont à inclure dans cette surveillance afin d'identifier le risque lié à leur contact avec des populations susceptibles. A ce titre, plusieurs agents pathogènes de l'humain et d'autres animaux font l'objet d'une surveillance forte chez les espèces de tiques qui en sont vectrices, comme *Borrelia burgdorferi*, l'agent de la Borréliose de Lyme, le virus TBE de l'encéphalite à tiques, des espèces d'*Anaplasma* et d'*Ehrlichia* responsables d'anaplasmoses, des espèces de *Theileria*

associées aux theilérioses ou encore de multiples espèces de *Rickettsia* associées à des rickettsioses. La liste des agents pathogènes présents et transmis chez les tiques est en effet diverse mais surtout différente selon l'espèce de tiques considérée, toutes les espèces n'étant pas compétentes pour chaque agent. Cependant, il est aujourd'hui évident que les tiques ne véhiculent pas que des agents pathogènes mais aussi des microorganismes mutualistes et commensaux. Les tiques hébergent des bactéries mutualistes dont les genres incluent des bactéries pathogènes, certaines mêmes dont la transmission vectorielle peut être assurée par les tiques. Cette proximité phylogénétique entre formes mutualistes et pathogènes est une source de confusion qui conduit à surestimer le risque sanitaire associé aux tiques. Ainsi, nous avons mis en évidence par la ré-analyse de l'étude récemment parue de Jia et al. (2020) qu'aujourd'hui cette confusion pouvait occasionnellement persister via l'utilisation d'outils dont la spécificité ne permettait pas de discriminer la souche pathogène de celle mutualiste. D'autres études expérimentales et articles de reviews mettent en avant que plusieurs outils de détection basés sur des techniques de PCR peuvent induire des amplifications non-spécifiques de par la proximité de la séquence amplifiée chez les souches bactériennes (Körner et al., 2021; Kugeler et al., 2005). La considération de la présence d'un symbiote mutualiste proche de la souche pathogène recherchée, et ce dès l'optimisation du protocole de détection, permet d'orienter par exemple le choix du gène à amplifier ou la séquence des primers PCR qui peuvent être spécifiques à une souche afin de ne pas amplifier l'autre. Le séquençage de produits PCR est parmi la meilleure alternative pour s'assurer de la spécificité du protocole, permettant de comparer cette séquence à une référence et ouvrant également la voie à une assignation taxonomique par phylogénie et la comparaison d'autres séquences bactériennes. Néanmoins, le séquençage a un coût certes faible à l'échelle d'un échantillon mais dont la réalisation lors d'une étude de screen de populations importantes de tiques peut s'avérer rapidement onéreuse. La spécificité d'un protocole de PCR, qPCR ou puce à ADN reste encore la solution la plus économique, mais demande de l'optimisation et l'aval de plusieurs tests sur plusieurs contrôles négatifs et positifs afin de ne pas sur-estimer ou sous-estimer la prévalence de l'agent recherché chez les tiques. Les techniques basées sur la détection

d'ADN sont d'ailleurs souvent utilisées dans le cadre de la recherche de bactéries chez les tiques, des quantités minimales de matériel génétique permettant une détermination rapide d'un résultat visuel.

Dans le cadre de bactéries pathogènes, une question supplémentaire doit s'imposer : La présence d'ADN pour cette bactérie dans une tique est-elle révélatrice de son caractère vivant et infectieux ? La présence d'une bactérie vivante suppose-t-elle nécessairement un risque épidémiologique si la tique n'est pas compétente pour sa transmission ? Chez un arthropode hématophage une question supplémentaire se pose : l'ADN détecté démontre-t-il l'infection de la bactérie dans la tique ou juste sa présence dans le repas sanguin précédent ? Ces mêmes questions se posent dans le cadre de bactéries endosymbiotiques de tiques où plusieurs études ont établi que la présence de *Wolbachia* et *Arsenophonus* était associée à la présence de de larves ou œufs de guêpes parasitoïdes (infectées par ces endosymbiotes) dont les larves se développent dans le corps des tiques (Bohacsova et al., 2016; Plantard et al., 2012). Ce questionnement pourrait s'appliquer à la fois à des agents pathogènes déjà décrits chez une espèce tique mais détectée chez une nouvelle, ou à la description de nouveaux agents de par leur présence à la fois chez des cas pathologiques et des tiques retrouvées à proximité. D'autre part, l'existence de biais anthropocentrés autour de certains genres bactériens chez les tiques, comme *Rickettsia* auquel l'agent du typhus appartient (Labruna and Walker, 2014), conduisent à décrire prioritairement les nouvelles espèces comme des formes pathogènes ou en tout cas potentiellement pathogènes. Nous avons néanmoins vu que la reconsidération de *R. lusitaniae* et son étude via différentes caractéristiques a permis de souligner plutôt l'existence chez les tiques molles d'un endosymbiote héritable qui pourrait participer à l'adaptation locale de certaines populations de tiques. Pouvoir identifier si une bactérie est présente chez les tiques, comment elle l'infecte, s'y réplique chez l'hôte tique et se transmet aux individus est une pierre angulaire pour intégrer par la suite son implication chez les tiques en tant holobiome et les tiques en tant que vecteurs compétents.

De plus en plus d'études s'intéressent à l'impact d'un microbiome perturbé (dysbiose), notamment à la suite d'une exposition à des antibiotiques, des molécules auxquels les hôtes

vertébrés, et nous-mêmes, sont de plus en plus exposés. Une étude de Narasimhan et al. (2014) démontre notamment que ce déséquilibre en composition taxonomique du microbiome influence négativement l'intégrité de la matrice pérित्रophique (entre la lumière du tube digestif et l'épithélium), ce qui inhibe la colonisation de la bactérie *Borrelia burgdorferi* dans l'intestin et donc sa capacité d'infection de son hôte tique *Ixodes scapularis*. Mais de façon intéressante, chez ce même modèle *I. scapularis*, un traitement antibiotique des tiques s'est traduit par une meilleure colonisation de l'agent de l'anaplasmose granulocytaire humaine, la bactérie *Anaplasma phagocytophilum* (Abraham et al., 2016). Une seconde étude chez la tique *Haemaphysalis longicornis* démontre que la susceptibilité des tiques à l'infection par l'agent pathogène protozoaire *Babesia microti* augmente chez des tiques après exposition à des antibiotiques (Wei et al., 2021). Ces différentes études soulignent ainsi que les retombées d'une dysbiose chez les tiques peuvent être variables selon le type d'agents pathogènes mais également que le microbiome intestinal pourrait jouer un rôle important dans cette modulation. Déterminer la composition de ce microbiome mais aussi les processus influençant sa structuration apparaissent alors comme des enjeux majeurs dans notre compréhension du rôle de vecteur des tiques. De prochaines études pourraient par exemple s'intéresser à la caractérisation phénotypique des membres de ce microbiome, quels membres participeraient à la stabilité de la matrice pérित्रophique et si ces membres sont similaires entre espèces de tique susceptibles à un même agent pathogène. Si on observe des différences de susceptibilité lors d'une dysbiose, il pourrait être intéressant de déterminer les agents pathogènes qui seraient avantagés par ces changements mais également si ce phénomène concerne l'ensemble de leurs espèces vectrices. La question également de l'acquisition de ces membres du microbiome, notamment commensaux, se pose : si ces espèces microbiennes ne sont pas héréditaires, des facteurs environnementaux seraient-ils responsables de ces assemblages communautaires, et pourraient influencer ainsi indirectement les capacités vectrices des tiques ? Une étude pourrait comparer des groupes élevés dans différentes conditions environnementales et s'intéresser aux compositions de communautés microbiennes qui en résulteraient.

Les symbioses nutritionnelles : des systèmes dynamiques chez les tiques

L'application de techniques de séquençage haut-débit chez les tiques a conduit à une meilleure compréhension de leur microbiome et de sa réelle importance biologique. Les analyses par métabarcodage, basées sur des méthodes de détection sans *a priori*, ont mis en lumière que leur microbiome incluait une multiplicité de microorganismes autres que des agents pathogènes. L'accessibilité grandissante des analyses de métagénomique a ensuite été un tremplin pour séquencer les génomes de microorganismes à l'intérieur des tiques, puis pour discuter leur rôle phénotypique et leur évolution. Ainsi, en une dizaine d'années, notre vision sur le microbiome des tiques a changé : si elles sont infectées par des agents pathogènes de vertébrés, leur microbiome est lui dominé par des symbiotes nutritionnels qui sont nécessaires à l'accomplissement du cycle de vie de leur hôte.

Les tiques et leurs symbiotes nutritionnels obligatoires sont engagés dans une relation endosymbiotique mutualiste, où des processus de co-évolution s'opèrent. Pourtant, plusieurs aspects de ces systèmes les définissent comme dynamiques. Au sein d'un même genre de tique, toutes les espèces ne présentent pas le même symbiote : si certaines espèces ont des *Coxiella*-LE, d'autres ont des *Francisella*-LE, ou plus rarement différents genres de Rickettsiales. Pour le genre *Amblyomma*, les analyses phylogénétiques ont montré que si *Coxiella*-LE apparaît comme le symbiote ancestral, des remplacements par *Francisella*-LE se sont opérés indépendamment dans plusieurs clades d'*Amblyomma*, définissant aujourd'hui leur répartition entre les différentes espèces de tiques (Binetruy et al., 2020b). Ces remplacements de *Coxiella*-LE par *Francisella*-LE se sont produits au sein de différents genres de tiques dures et molles (Binetruy et al., 2020b; Duron et al., 2017a), et la distribution actuelle de ces deux endosymbiotes est la conséquence de ce processus. Une plus forte réduction génomique est détectée chez les *Coxiella*-LE (les plus petits génomes sont <600kb, notamment celles présentes dans le genre *Amblyomma*). Cette forte réduction génomique aurait-elle impactée négativement l'implication des *Coxiella*-LE dans les apports

bénéfiques à leurs hôtes, déséquilibrant la symbiose nutritionnelle ? Le génome des *Francisella*-LE confèrerait-il un avantage métabolique à l'hôte facilitant le remplacement des *Coxiella*-LE ? Par ailleurs, l'analyse génomique de deux endosymbiotes, *Francisella*-LE et *Midichloria*, chez l'espèce de tiques *Hyalomma marginatum* a permis de mettre en évidence que la co-infection chez cette espèce n'est pas liée à un effet stochastique ou un remplacement d'hôtes mais qu'elle illustre la formation d'un système multipartenaire stable. Décrits dans plusieurs localités provenant de plusieurs pays à travers le bassin méditerranéen, ce système illustre que l'érosion génomique est à l'œuvre chez les endosymbiotes nutritionnels des tiques et que ce phénomène peut aller jusqu'à la perte de fonctions essentielles dans le cadre de leur symbiose avec leurs hôtes. Seuls les génomes de *Francisella*-LE chez *H. marginatum* sont dépourvus de la voie de biosynthèse de la biotine par rapport aux autres génomes disponibles. Cette voie métabolique est alors codée dans le génome de *Midichloria* grâce à un opéron biotine, ancestralement acquis par un transfert horizontal depuis d'autres bactéries intracellulaires. L'acquisition de cet opéron biotine par transfert a sûrement joué à un rôle essentiel dans l'établissement des systèmes symbiotiques nutritionnels *Midichloria*-tiques, tout comme son acquisition par *Wolbachia* par le même type de transfert l'a été pour l'établissement de son association mutualiste avec des punaises de lits (Nikoh et al., 2014). La mise en place d'un tel système chez *H. marginatum* soulève plusieurs questions au sujet de la « chronologie » des évènements et des différentes pressions qui ont contribué à celle-ci. Le phénomène de co-infection et transmission de ces deux endosymbiotes qui participent à la supplémentation des trois vitamines B essentielles à l'hôte a-t-il contribué à diminuer les pressions de sélection sur des voies redondantes menant à la fixation de mutations délétères par dérive sur ces voies normalement conservées ? Nous pourrions imaginer qu'un tel scénario ici pour la voie de la biotine chez *Francisella*-LE participerait à la fixation de la co-infection avec *Midichloria*, cette dernière ne portant pas l'une des trois voies de biosynthèse des vitamines - ce n'est que l'ensemble des deux génomes qui codent pour les trois voies nécessaires, imposant leur présence mutuelle. Ce n'est qu'un des scénarios possibles évidemment, *Midichloria*

aurait également pu persister dans un système où *Francisella*-LE présentait une capacité de biosynthèse de biotine altérée ou non suffisante pour la tique.

Des questions demeurent évidemment encore dans ce système. Ces deux endosymbiotes sont reconnus pour infecter deux organes majeurs, les tubes de Malpighi et les ovaires dans le cas de mono-infections (Duron et al., 2018; Olivieri et al., 2019). En revanche, leur tropisme tissulaire dans le cadre de leur co-infection, comme chez *Hyalomma marginatum*, pose question. Des études mettent en lumière les rôles et expressions différenciés de la biotine, la folate et l'acide folique entre les ovaires et les tubes de Malpighi, dans d'autres systèmes endosymbiotiques nutritionnels (*Coxiella*-LE chez la tique *Rhipicephalus sanguineus* (Cibichakravarthy et al., 2022) ; *Midichloria* chez *Ixodes ricinus* (Olivieri et al., 2019)). Leurs capacités métaboliques étant initialement différentes, *Francisella*-LE et *Midichloria* infectent-ils de façon homogène ces organes ? Des analyses par hybridation in situ en fluorescence (FISH) pourraient nous aider à identifier finement à l'aide de sondes spécifiques à chaque symbiote leur localisation à l'échelle d'un organe. D'après nos analyses de qPCR, la densité des *Francisella*-LE est supérieure à celles des *Midichloria* dans les ovaires de *H. marginatum* mais cette expérimentation n'a pas été réalisée dans les tubes de Malpighi et pourrait être complémentaire à la visualisation de leurs infections via les expérimentations par FISH. A une échelle plus fine, ces deux endosymbiotes infectent-ils les mêmes cellules ou encore la même niche intracellulaire ? Il est par exemple à noter que le genre *Midichloria* contient des symbiotes infectant les mitochondries de *I. ricinus* (Sassera et al., 2006), mais qu'en est-il pour *H. marginatum* ? Cette fois-ci la microscopie électronique en transmission est un outil qui permettrait de visualiser une infection intramitochondriale. Enfin, face à la redondance de la voie de biosynthèse de l'acide folique chez *Francisella*-LE et *Midichloria*, la question de la contribution de chacun dans l'approvisionnement à la tique se pose. Leurs contributions respectives sont-elles à l'image de leur densité, celle de *Francisella*-LE supérieure à celle de *Midichloria* ? Dans les 6 génomes, nous n'avons identifié qu'une copie de chaque gène impliqué dans cette voie, mais la sur-expression génétique chez un symbiote pourrait-elle influencer son apport ? Pour déterminer cet aspect, il est possible de quantifier l'expression

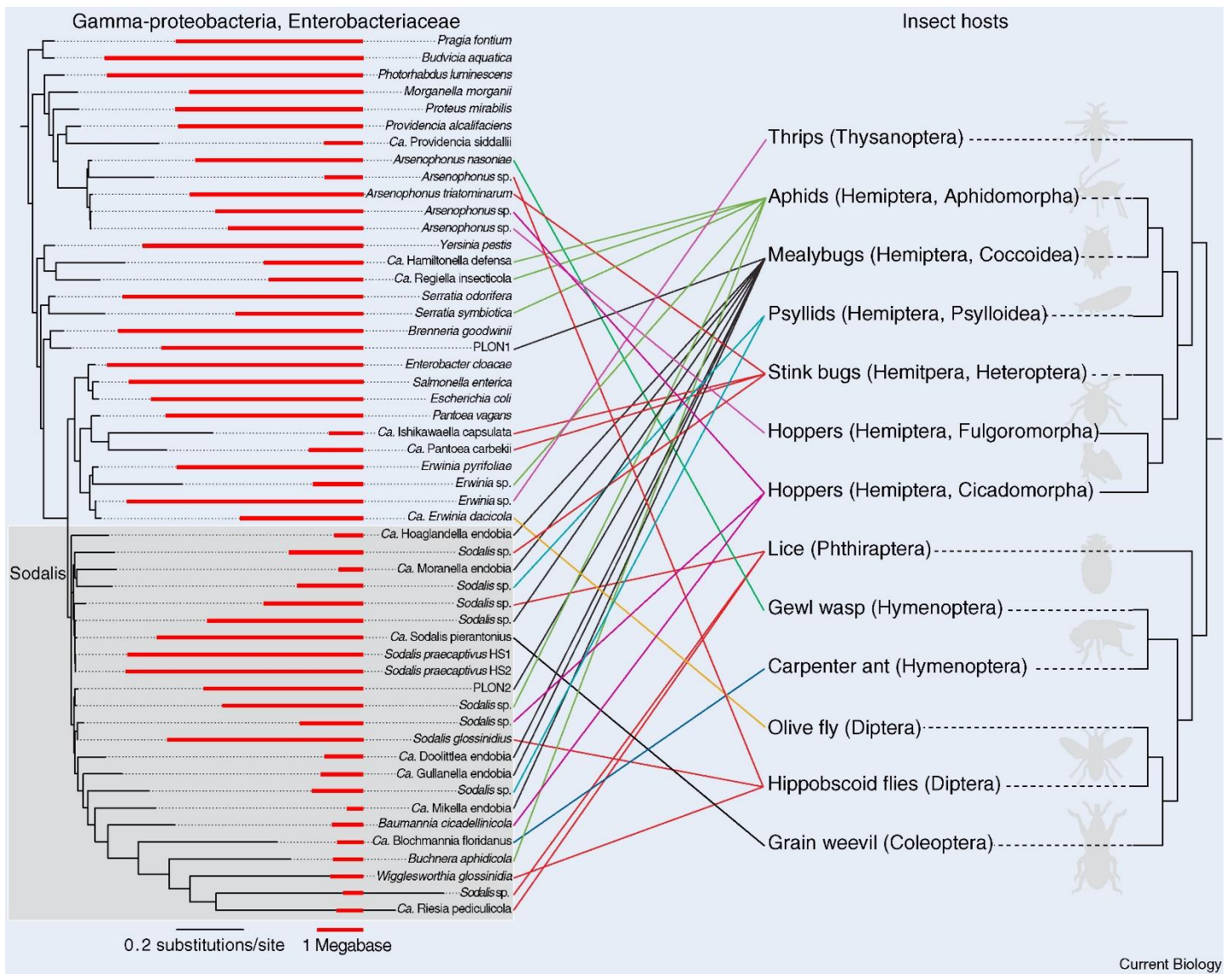


Figure 10. Les relations évolutives diverses et enchevêtrées de certaines symbioses mutualistes, leurs divers insectes hôtes et la gamme de tailles des génomes associés. La taille des génomes bactériens est représentée par des barres rouges. Les lignes colorées relient les groupes d'insectes aux symbiotes bactériens connus. La phylogénie des Enterobacteriaceae est basée sur l'analyse du maximum de vraisemblance de 130 gènes codant pour des protéines concaténées provenant de 93 taxons (la construction de la base de données, la recherche d'arbres, l'ajustement du modèle et les méthodes d'affinement des arbres sont présentés dans les informations supplémentaires). La phylogénie des insectes a été adaptée de Misof et al. (2014). Ca. : *Candidatus*, PLON : symbiote *Pseudococcus longipinus*, sp. : espèce. D'après McCutcheon et al. (2019).

de chaque vitamine d'après son origine symbiotique, les séquences protéiques de chaque bactérie étant divergentes, par la mise en place d'une PCR quantitative précédée d'une reverse transcriptase sur un extrait ARN.

Les tiques sont des modèles biologiques remarquables pour l'étude des symbioses nutritionnelles chez des organismes hématophages stricts, mais beaucoup d'interrogations persistent encore. Plusieurs de ces aspects ont déjà été intensivement documentés et explorés chez les insectes, notamment phloémophages. Des microorganismes symbiotiques chez ceux-ci sont décrits depuis le début du XX^{ème} siècle, historiquement les premiers chez des cochenilles, des pucerons et des cicadelles (Pierantoni, 1922, 1913, 1911; Sulc, 1910) par Umberto Pierantoni et Karel Sulc, puis mis en évidence chez une grande diversité d'autres classes et familles d'insectes (Figure 10). Une diversité de symbiotes obligatoires et facultatifs est rapportée (Figure 10) : rien que chez les pucerons par exemple au moins 9 symbiotes facultatifs sont identifiés au travers des différentes familles d'hôtes (Manzano-Marín et al., 2022). Les remplacements de symbiotes ont été décrits à de nombreuses reprises, entre bactéries différentes (remplacement de *Buchnera* par *Cand. Skilesia alterna* chez les pucerons (Chong and Moran, 2018)), entre bactéries similaires (remplacement d'une souche de *Sodalis* par une autre chez des cochenilles (Husnik and Mccutcheon, 2016), ou encore entre bactéries et champignons (Nishino et al., 2016)). Plusieurs systèmes multi-partenaires sont également décrits, ces systèmes présentant différentes caractéristiques d'interaction (Douglas, 2016), comme par exemple leur tropisme tissulaire allant de l'infection de bactériocytes différents à un extrême où est observée une infection imbriquée d'un partenaire dans l'autre. Par exemple, la cochenille *Planococcus citri* possède deux endosymbiotes bactériens, *Moranella endobia* et *Tremblaya princeps*, qui présentent cet arrangement imbriqué inhabituel : le premier vit dans le cytoplasme du second (Husnik and Mccutcheon, 2016). Dans ce système, cette proximité se traduit également par des interactions étroites entre les trois partenaires où certaines voies de biosynthèse sont codées non pas par un mais les deux partenaires. L'intégration des endosymbiotes chez l'hôte peut même aller à un autre extrême qui est le transfert de gènes du partenaire microbien à son hôte insecte, lui permettant

l'acquisition de nouvelles capacités adaptatives sans infection par un symbiote (Husnik and McCutcheon, 2018; Ren et al., 2020).

Dans quelle mesure des processus et évènements similaires s'opèrent chez les tiques ? Avant tout, des caractéristiques assez descriptives restent à approfondir chez les tiques. Est-ce que toutes les espèces de tiques hébergent un symbiote nutritionnel ? Celui-ci est-il toujours de nature bactérienne ? Dans le cadre du projet PHYLOTIQUE (voir détails en ANNEXE), nous sommes en train d'analyser et de comparer le microbiome de plusieurs espèces de tiques du genre *Ixodes*, et des premiers résultats par métabarcodage confirment la présence de plusieurs endosymbiotes bactériens déjà décrits chez les tiques, mais révèlent surtout qu'aucun autre partenaire bactérien n'est retrouvé de façon constitutive chez tous les individus. Des résultats dont nous poursuivons l'étude. D'autre part, aucun organe ou cellule n'est formellement reconnu comme les batériomes et bactériocytes chez les tiques. Les tubes de Malpighi et ses cellules remplissent-ils ces fonctions ? L'une des principales fonctions des tubules de Malpighi est d'agir comme des organes excréteurs, les déchets azotés s'y accumulant avant d'être éliminés à la suite d'un repas sanguin. Ces organes seraient ainsi une source pour les symbiotes qui y tireraient des composés nécessaires à la production des vitamines B notamment ou à recycler pour la tique (e.g. l'hème) (Gottlieb et al., 2015; Hamdy, 1977; Olivieri et al., 2019; Sonenshine and Roe, 2014). Un autre aspect à explorer pourrait être la persistance des endosymbiotes nutritionnels au cours des différents stades du cycle de vie des tiques et si celle-ci est variable entre les espèces de tiques. Par exemple, chez l'espèce *Ixodes ricinus*, les individus mâles adultes ne se nourrissent pas (ou peu) et présentent une prévalence plus faible pour leur symbiote *Midichloria* que les femelles (Lo et al., 2006; Sassera et al., 2006). Cette différence de prévalence se traduit également par des densités d'infection plus faibles chez les nymphes mâles, et pourraient s'expliquer par des besoins nutritionnels plus réduits (Daveu et al., 2021). Existe-t-il des effets modérateurs de l'hôte sur son partenaire symbiotique, notamment chez des individus ne participant pas à sa transmission verticale (les mâles) ou chez qui son rôle nutritionnel est plus limité selon le stade de vie ?

Les symbioses facultatives chez les tiques

La présence de symbiotes facultatifs chez les tiques soulève tout autant d'interrogations que les endosymbiotes nutritionnels, voire plus. Malgré leur occurrence fréquente et leur diversité, aucun phénotype ne leur est associé à ce jour chez les tiques. Nous avons évoqué au travers de nos projets la possibilité d'effets nutritionnels ou encore défensifs ; ceux-ci pourraient en effet être les plus prédictibles étant donné le contexte écologique, biologique et évolutif des tiques. D'une part, nous avons discuté plus haut de la possibilité de la participation des co-infections entre endosymbiotes nutritionnels pour l'établissement d'un remplacement ou d'un système multi-partenaires, l'endosymbiote « récent » pouvant notamment être acquis par des transferts horizontaux et apparaître comme un endosymbiote facultatif. D'autre part, les tiques interagissent avec une diversité d'organismes et microorganismes, des prédateurs, des guêpes parasitoïdes, des champignons entomopathogènes, des microorganismes dans leur environnement (végétation, sol, hôte), des microorganismes dans leur microbiome. Certains de ceux-ci ont des effets bénéfiques pour elles, d'autres des effets délétères. Nous avons vu que le microbiome des tiques comptait parmi ses membres des genres bactériens comme *Rickettsia* (Hendry et al., 2014), *Spiroplasma* (Ballinger and Perlman, 2019) et *Wolbachia* (Kambris et al., 2009; Moreira et al., 2009; Wong et al., 2011) chez qui des interactions antagonistes avec différents organismes (i.e. symbiose défensive, où le symbiote protège son hôte contre les ennemis naturels) étaient reportées pour d'autres arthropodes. Dans le cas où ces bactéries auraient une transmission verticale, des stratégies antagonistes envers des organismes à transmission horizontale impactant négativement la valeur sélective de l'hôte pourraient être sélectionnées. Or des infections par des guêpes parasitoïdes et des agents pathogènes de vertébrés peuvent être délétères pour les hôtes tiques (Mwangi et al., 1997; Niebylski et al., 1999). De plus, il a été démontré que des souches de *S. poulsonii* induisaient une protection contre des nématodes et des guêpes parasitoïdes grâce à l'expression de toxines de la famille des Ribosome Inactivating Proteins (RIP) (Ballinger and Perlman, 2017; Hamilton et al., 2016). Ces toxines RIP

inhibent la synthèse de protéines et sont retrouvées chez différents organismes (plantes, bactéries (Stirpe, 2004), moustiques *Aedes aegypti* (Lapadula et al., 2013)) mais il est généralement admis que cette diversité résulterait d'un transfert horizontal de gènes des plantes aux bactéries (Peumans and Van Damme, 2010). Ces toxines selon leurs types ont des effets antifongiques, antibactériens, anti-viraux et insecticides (Stirpe, 2004; Zhu et al., 2018). Ces toxines pourraient-elles être conservées dans les génomes de *S. ixodetis* chez les tiques ? Les conditions d'interactions entre les tiques, *S. ixodetis* et des cibles potentielles seraient en tout cas réunies chez certaines espèces de tiques comme *I. ricinus*, qui est parasitée par des guêpes du genre *Ixodiphagus*. Nous explorerons bientôt cette hypothèse grâce à l'analyse des différents génomes séquencés de *S. ixodetis*. Il est cependant à noter que la présence de *S. ixodetis* pourrait aussi être liée à un maintien par la manipulation de la reproduction des tiques, comme observé chez les drosophiles et des guêpes parasitoïdes (Harumoto and Lemaitre, 2018; Pollmann et al., 2022). Cette hypothèse sera également explorée par la recherche d'effecteurs génomiques de la manipulation de la reproduction, notamment du *male-killing* (e.g. induits par les protéines Spaid de *Spiroplasma*).

Un autre facteur méconnu chez les endosymbiotes facultatifs de tiques concerne les mécanismes de transmission sous-jacents à leur maintien chez les tiques. Leur dynamisme est pourtant fort : plusieurs études phylogénétiques pointent la similarité forte entre deux souches bactériennes chez des hôtes phylogénétiquement distants (Binetruy et al., 2019a; Duron et al., 2017a; Tian et al., 2021) et cela pour plusieurs genres bactériens (*Rickettsia*, *Spiroplasma*, *Cardinium*). Chez les insectes se nourrissant de sève, les transferts horizontaux sont reconnus pour occuper un rôle important pour les systèmes impliquant un symbiote facultatif (Russell et al., 2003; Sandström et al., 2001), car ceux-ci permettent aux symbiotes d'étendre leur gamme d'hôtes et aux hôtes d'acquérir de nouvelles adaptations avec le nouveau symbiote (Sudakaran et al., 2017). Chez les insectes, plusieurs voies interviennent dans ces transferts. Les guêpes parasitoïdes représentent une première voie d'échange pour elles mais également leurs hôtes où elles peuvent s'infecter en se développant dans un hôte infecté (Chiel et al., 2009) ou avec des congénères infectés (Duron et al., 2010), et infecter des hôtes « sains » (Gehrer and Vorburger,

2012). Ces transferts peuvent également suivre d'autres relations trophiques comme la prédation ou le cannibalisme (chez les isopodes, Le Clec'h et al. (2013)). Mais ces transferts pourraient également se faire par leur ressource alimentaire et notamment les plantes (Chrostek et al., 2017). Ces mécanismes pourraient-ils intervenir chez les tiques, dont de nombreux genres sont infectés par des guêpes parasitoïdes par exemple (*Ornithodoros*, *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* et *Rhipicephalus* (Davis, 1986; Gaye et al., 2020)) ?

Nombreuses sont les questions qui demeurent encore. Pour plusieurs symbiotes facultatifs présumés, nos connaissances sont souvent limitées à des séquences nucléotidiques, qui plus est chez des espèces de tiques sous-étudiées. Chez *I. ricinus*, l'espèce vectrice de la Borréliose de Lyme en Europe, plusieurs études s'intéressent aux réseaux d'association entre les différents membres du microbiome, notamment si certaines de ces associations sont négativement corrélées entre le-dit symbiote et *Borrelia burgdorferi* (l'agent de la Borréliose de Lyme). Des premières études visant à décrire plusieurs caractéristiques des interactions tiques-symbiotes (la localisation de ces symbiotes chez l'hôte, leurs voies de transmission, leur dynamique au cours du cycle de vie de l'hôte, leurs effets sur leur hôte arthropode, les relations phylogénétiques avec d'autres représentants du même genre bactérien, etc.) sont une étape à franchir pour ensuite étayer les aspects fonctionnels et phénotypiques de leur association (modulation d'une condition abiotique, exposition à un ennemi naturel, modulation du microbiome, transcriptomique selon différentes conditions d'exposition, etc.). Néanmoins, des contraintes méthodologiques peuvent entraver la réalisation de certaines de ces expérimentations. Les tiques sont des modèles remarquables mais aussi contraignants. Les tiques ont un temps de génération long, généralement supérieur à un an, notamment pour les tiques dures. Leur cycle de vie nécessite plusieurs repas de sang à 37°C, avec un changement régulier du sang dans le cas des tiques dures. Les prévalences en populations des endosymbiotes facultatifs sont variables au sein d'une espèce. Dans ce contexte, comment savoir quelles tiques correspondent à la condition « infectée » par exemple requise dans une étude ? Dans notre cas pour nos projets sur *R. lusitaniae* et *S. ixodetis*, nous avons choisi l'option d'augmenter l'effort d'échantillonnage et d'analyser sans *a priori* toutes les tiques,

conservant dans nos analyses finales les tiques infectées. Ce processus n'est cependant pas optimal pour une prévalence de 10% dans une population par exemple. L'infection expérimentale des tiques est une option mais il faudrait être capable de cultiver ou isoler le symbiote voulu (et d'une souche adaptée au modèle), en sachant que beaucoup sont des intracellulaires obligatoires. Plusieurs contraintes qui sont plus légères chez des modèles insectes, comme les moustiques par exemple pour comparer avec un arthropode, en partie, hématophage.

Acquisition, sauts d'espèces et co-infections : quel rôle joue l'hôte vertébré pour les communautés d'endosymbiotes ?

Au cours de leur repas sanguin, les tiques vont modifier localement la biologie de leurs hôtes vertébrés dans leur propre intérêt. Les composés salivaires qu'elles vont inoculer permettent la mise en place d'un puits sanguin où les capacités anticoagultrices et les défenses immunitaires de son hôte sont inhibées, lui assurant un approvisionnement en sang sur les plusieurs jours nécessaires pour son développement et, potentiellement, sa reproduction (Chmelař et al., 2016). Ce moment est considéré comme l'étape fatidique pour la transmission des agents pathogènes chez leurs hôtes vertébrés. Néanmoins, si cette transmission horizontale lors du repas sanguin est déterminante pour la transmission vectorielle, il est important de considérer que pour plusieurs agents pathogènes ceux-ci sont également transmis maternellement et ainsi les deux mécanismes permettraient de participer à leur maintien dans les populations de tiques. Mais ce moment d'échange lors du repas sanguin sur un hôte peut-il également être une composante importante pour d'autres membres du microbiome des tiques ?

Une tique est un hôte aux ressources limitées qui héberge déjà (pour la majorité des espèces) une espèce endosymbiotique, mutualiste et obligatoire, et qui est souvent co-infectée avec d'autres endosymbiotes facultatifs. Nous l'avons vu, certains de ces symbiotes infectent même les mêmes cellules que les endosymbiotes obligatoires (*Coxiella-LE* et *R. lusitaniae* dans les mêmes cellules des tubes de Malpighi). Du fait de la tragédie des biens communs (i.e. la

surexploitation d'une ressource commune, ici la tique), ces différents endosymbiotes pourraient venir à s'exclure, plus particulièrement s'ils n'apportent pas chacun un avantage à leur hôte et s'ils ne sont pas parfaitement transmis à la descendance de leur hôte. L'apport d'un avantage serait d'autant plus modulé chez les endosymbiotes facultatifs, ceux-ci n'apportant un bénéfice en fonction que de certaines conditions écologiques. L'établissement et le maintien des symbioses facultatives devraient alors dépendre de nouvelles infections, mais non pas par transmission verticale, mais par transmission horizontale.

Chez les insectes phloémophages, plusieurs études se sont intéressées aux mécanismes sous-jacents à la transmission d'endosymbiotes facultatifs par les plantes, celle-ci ayant été décrite pour plusieurs bactéries intracellulaires héréditaires comme *Wolbachia*, *Rickettsia* et *Cardinium* (Caspi-Fluger et al., 2012; Gonella et al., 2015; Li et al., 2017). Certains, comme *Arsenophonus*, peuvent même se développer dans le phloème des plantes sur lesquelles leurs insectes hôtes se sont nourris et devenir ainsi des agents pathogènes opportunistes (Bressan, 2014). La revue de Chrostek et al. (2017) fait état des différentes étapes de ce processus. Un point critique pour ce mécanisme est évidemment le passage du symbiote de l'hôte à la plante qui se baserait sur deux aspects majeurs : une capacité de transmission par l'hôte et un « lieu » réceptacle pour le symbiote dans (ou sur) la plante. Ce premier point serait notamment déterminé par la densité du symbiote chez l'insecte mais également son tropisme tissulaire, une infection systémique (donc non restreinte aux organes liés à la symbiose et la transmission verticale, i.e. bactériome et ovaires) favorisant ce processus (Li et al., 2017) par la possibilité d'infection des glandes salivaires ou autres organes excréteurs. Pour un « lieu » réceptacle chez la plante, il est important que le symbiote puisse persister afin d'être transmis à un nouvel hôte. Pour des espèces se nourrissant de sève, ce transfert pourrait par exemple se faire lors d'un contact insecte – plante lors de sa nutrition. *Wolbachia* et *Rickettsia* sont par exemple retrouvées dans les cellules de la plante par PCR mais sont également visualisés à l'intérieur de tissus, notamment ceux de la circulation du phloème (Caspi-Fluger et al., 2012; Li et al., 2017), voir même dans les cellules végétales (Li et al., 2017). Ils peuvent se cantonner à un tissu mais également se répandre à

d'autres parties de la plante (e.g. feuilles), tout ça en persistant dans la durée dans la plante à des taux stables (Li et al., 2017). Ces aspects soulignent donc leurs capacités de circulation et d'exploitation de nutriments de la plante. Les effets sur la biologie de la plante (pathologies, réponses immunitaires, réminescence) sont cependant encore largement à étayer face à l'infection par des symbiotes d'insectes, mais des pathologies ont été décrites, notamment liées à l'infection par *Arsenophonus* : syndrome de basse richesse pour la betterave, ou encore chlorose chez le fraisier (Bressan, 2014). Mais cette dernière souligne déjà la capacité remarquable de la survie de ces symbiotes dans un autre milieu de vie, les niches « insectes » et « plantes » ayant quelques différences notables. L'étape de transmission à un nouvel est d'autant plus facilitée pour un insecte se nourrissant de sève si le symbiote a persisté dans la circulation de la plante (Bressan et al., 2012; Gonella et al., 2015), mais la réalisation de la transmission et infection chez le nouvel hôte sera dépendante des filtres de rencontre (type de plantes, localisation du symbiote, densité) et de compatibilité (résistance à la digestion, établissement de l'infection, transmission à la descendance) (Combes, 1995). Chez *Wolbachia*, *Rickettsia* et *Cardinium* qui sont retrouvées dans les plantes, les preuves empiriques de cette acquisition dans un nouvel hôte vont de la détection d'ADN à l'établissement de l'infection et même la transmission à la génération suivante (Caspi-Fluger et al., 2012; Li et al., 2017). Dans ce contexte, les plantes jouent un rôle évolutif majeur dans la dispersion des endosymbiotes dans les communautés d'arthropodes : les plantes permettent la connexion écologique qui est nécessaire aux transferts horizontaux des endosymbiotes entre espèces d'insecte se nourrissant de sève.

Et si l'Humain (mais par extension les hôtes vertébrés) était aux tiques se nourrissant de son sang ce que les plantes seraient aux insectes se nourrissant de sève ? L'hôte vertébré des tiques pourrait-il agir comme une plateforme d'échange de symbiotes, au-delà des agents pathogènes, et ainsi intervenir dans leur dynamique et maintien chez les tiques ? Plusieurs arguments pourraient venir soutenir cette possibilité :

(i) Des symbiotes obligatoires, mais aussi facultatifs, sont retrouvés dans les glandes salivaires des tiques (*Coxiella*-LE (Buysse et al., 2019; Klyachko et al., 2007; Raelle et al., 2015), *Francisella*-

LE (Azagi et al., 2017; Budachetri et al., 2014; Duron et al., 2018; Liu et al., 2016), *Midichloria* (Di Venere et al., 2015; Olivieri et al., 2019), *Rickettsia* (Al-Khafaji et al., 2020) ce qui pourrait suggérer leur relarguage lors d'un repas sanguin.

(ii) Une diversité de symbiotes de tiques présente une transmission verticale mais également une transmission horizontale non nécessairement associée à des effets pathogéniques, et cela que ce soient des symbiotes obligatoires ou facultatifs. Nous avons présenté des cas de transmission de *Coxiella*-LE (qui se résultaient par des infections chez les hôtes vertébrés, notamment chez des oiseaux (Ebani and Mancianti, 2022)) mais leur détection par PCR chez des chevaux n'était, dans ce cas, pas associée à des symptômes d'après l'étude de Seo et al. (2016). Aucune étude ne semble reporter la présence de *Francisella*-LE chez des hôtes vertébrés, mais le patron de co-cladogénèse imparfait mis en évidence par Binetruy et al. (2020b) sous-entend l'existence de transferts d'hôtes, de toute vraisemblance un processus qui est facilité par l'existence d'une capacité de transmission horizontale. Le repas sanguin de tiques *Ixodes ricinus* infectées par *Midichloria* a conduit à la détection d'ADN de *Midichloria* pendant plusieurs semaines chez des lapins, mais également à une réponse immunitaire des lapins dirigés contre cet ADN de *Midichloria*. Cette étude montrerait que le système immunitaire hôte réagirait à la présence de *Midichloria* (ou son ADN) dans le sang mais aucun symptôme n'a été détecté au cours de cette étude, ce qui pourrait suggérer qu'il ne s'agit que d'ADN circulant (Cafiso et al., 2019). Ce scénario pourrait également être expliqué par l'élimination rapide de *Midichloria* par l'hôte ou encore que *Midichloria* peut être pathogène chez d'autres hôtes mais ne l'est pas chez les lapins. Nous pouvons reprendre l'exemple des *Rickettsia* dont des effets pathogéniques ne sont pas identifiés chez toutes les espèces et dont les sauts d'hôtes ont été décrits chez plusieurs types d'hôtes, dont les tiques (Tian et al., 2021). Nos expérimentations sur *R. lusitaniae* démontrent notamment son possible relarguage lors du repas sanguin, mais sans la constatation de symptômes chez un modèle murin. Un constat similaire s'établit pour *Spiroplasma ixodetis* : des cas d'infections par des souches pathogènes opportunistes chez des nourrissons immuno-déprimés existent (Eimer et al., 2022; Farassat et al., 2021; Lorenz et al., 2002; Matet et al., 2020; Schroeder et al., 1997), mais aussi une diversité de

souches héritables pour lesquelles aucun effet pathogénique est établi, et pour lesquelles de nombreux sauts d'hôtes sont reportés (Binetruy et al., 2019a).

(iii) Chez les tiques nous avons déjà discuté que le phénomène de co-feeding permettait au cours d'un repas sanguin, un contexte spatiotemporel réduit, l'échange de microorganismes entre tiques, notamment démontré pour des agents pathogènes (Voordouw, 2015; Wright et al., 2015). Il est alors possible que ce mécanisme puisse s'opérer dans le cadre de transmission d'autres symbiotes, profitant aussi de la niche particulière formée à l'endroit de la piqûre de la tique (système immunitaire perturbé, anticoagulants). Cet échange pourrait se faire entre tiques d'une même espèce mais également entre différentes espèces. Nos observations de souches similaires de *Francisella*-LE chez des espèces de tiques phylogénétiquement différentes (tiques molles, tiques dures) s'accompagnaient de la mise en avant que toutes ces espèces présentent le même spectre d'hôtes vertébrés sur une même zone géographique. Cependant, ces échanges peuvent dépendre de facteurs de susceptibilité d'infection de la nouvelle espèce hôte et de la composition de son microbiome, qui pourrait influencer les interactions inter-symbiotes (e.g. compétition facilitation). Un aspect plus incertain serait la temporalité à laquelle s'opère cet échange ? Sachant que le repas sanguin des tiques dures s'effectue sur plusieurs heures voire jours, l'échange se fait-il au début du repas ou pendant ? Au début du repas, les bactéries peuvent être relarguées via les glandes salivaires, mais la prise de repas sanguin s'accompagne d'une augmentation de la densité des bactéries nutritionnelles. Est-il possible que cette augmentation de densité, à l'échelle des différents organes, puisse induire leur libération au cours du repas sanguin ? Une prochaine étude pourrait rechercher à plusieurs pas de temps le relarguage de différents symbiotes dans le sang, en couplant ces analyses à la quantification des différents symbiotes au cours du repas sanguin dans la tique. Il serait également intéressant de comparer les capacités de transmission par co-feeding chez des tiques molles et des tiques dures, étant donné que celles-ci ont des aptitudes physiologiques différentes dans le cadre de leur repas sanguin (e.g. durées d'attachement différentes). Si le temps de gorgement est déterminant dans l'échange de microorganismes via l'hôte, serait-ce une des explications au nombre important d'agents

pathogènes décrits chez les tiques dures par rapport aux tiques molles ? ou bien cette différence résulte d'un biais d'échantillonnage ?

L'impact médical et vétérinaire des tiques impose à plusieurs égards leur forte considération et surveillance chez celles-ci. Néanmoins, nous pouvons nous interroger si notre vision anthropo-centrée autour des tiques et des agents pathogènes qu'elles transmettent pourrait masquer notre appréciation des mécanismes participant à l'évolution des interactions microbiennes chez les tiques. L'Humain est souvent une impasse pour la transmission des agents pathogènes, aucune tique n'en étant spécialiste uniquement ; les animaux sauvages et domestiques pourraient eux jouer un rôle plus important.

Conclusion

En une dizaine d'années, notre perception du microbiome des tiques a considérablement changé. Alors que les tiques étaient historiquement étudiées avec des visées médicales et vétérinaires, ce sont aujourd'hui en sciences de l'évolution et en écologie que les découvertes les plus significatives sont faites sur ces modèles. Les tiques sont des parasites, ce sont des vecteurs d'agents pathogènes de vertébrés, mais leur microbiote est lui dominé par des microorganismes mutualistes nutritionnels dont la présence est nécessaire à leur développement, leur survie, leur reproduction et surtout leur mode de vie hématophage stricte. La mise en évidence du rôle majeur des symbioses nutritionnelles n'est pas récente et ne se limite pas aux tiques, de nombreux insectes s'appuient sur leurs symbiotes pour leur nutrition, mais ici elle apporte un nouveau regard sur ces vecteurs. La preuve que les tiques sont avant tout les hôtes de microbes non pathogènes participe à ce changement de paradigme. Les tiques ne sont plus seulement des vecteurs : elles sont imbriquées dans un réseau d'interactions microbiennes incluant tout du moins les symbiotes nutritionnels, des agents pathogènes de vertébrés, des symbiotes facultatifs et des commensaux. Face à cette constatation, plusieurs questions demeurent sur le dynamisme de ces interactions, les processus qui influencent leur maintien et les facteurs qui structurent ces réseaux. Nos connaissances sont encore souvent limitées à des espèces de tiques liées à un impact médical, vétérinaire ou économique de par leurs retombées. La composition du microbiome d'espèces associées à la faune sauvage reste par exemple encore trop largement méconnue. Une vision de plus en plus large à l'échelle générique et intergénérique nous permettrait d'appréhender la diversité des systèmes symbiotiques, mais pourquoi pas aussi les facteurs structurants du microbiome des tiques.

Références

- Abraham NM, Liu L, Jutras BL, Yadav AK, Narasimhan S, Gopalakrishnan V, Ansari JM, Jefferson KK, Cava F, Jacobs-Wagner C, Fikrig E. 2016. Pathogen-mediated manipulation of arthropod microbiota to promote infection. *PNAS*. doi:10.1073/pnas.1613422114
- Adams AS, Aylward FO, Adams SM, Erbilgin N, Aukema BH, Currie CR, Suen G, Raffa KF. 2013. Mountain pine beetles colonizing historical and naïve host trees are associated with a bacterial community highly enriched in genes contributing to terpene metabolism. *Appl Environ Microbiol* **79**:3468–3475. doi:10.1128/AEM.00068-13
- Adams AS, Six DL. 2008. Detection of host habitat by parasitoids using cues associated with mycangial fungi of the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae*. *Can Entomol* **140**:124–127. doi:10.4039/n07-018
- Ahantari G, Trinachartvanit W, Baimai V, Grubhoffer L. 2013. Hard ticks and their bacterial endosymbionts (or would be pathogens). *Folia Microbiol (Praha)* **58**:419–428. doi:10.1007/s12223-013-0222-1
- Aivelo T, Norberg A, Tschirren B. 2019. Bacterial microbiota composition of *Ixodes ricinus* ticks: The role of environmental variation, tick characteristics and microbial interactions. *PeerJ* **2019**:1–25. doi:10.7717/peerj.8217
- Al-Khafaji AM, Armstrong SD, Varotto Boccazzi I, Gaiarsa S, Sinha A, Li Z, Sasser D, Carlow CKS, Epis S, Makepeace BL. 2020. *Rickettsia buchneri*, symbiont of the deer tick *Ixodes scapularis*, can colonise the salivary glands of its host. *Ticks Tick Borne Dis* **11**:101299. doi:10.1016/j.ttbdis.2019.101299
- Alkishe A, Raghavan RK, Peterson AT. 2021. Likely geographic distribution shifts among medically important tick species and tick-associated diseases under climate change in North America: A review. *Insects* **12**. doi:10.3390/insects1203225
- Alkishe AA, Peterson AT, Samy AM. 2017. Climate change influences on the potential geographic distribution of the disease vector tick *Ixodes ricinus*. *PLoS One* **12**:1–14. doi:10.1371/journal.pone.0189092
- Amirkhanzadeh Barandouzi Z, Starkweather AR, Henderson WA, Gyamfi A, Cong XS. 2020. Altered composition of gut microbiota in depression: A systematic review. *Front Psychiatry* **11**:1–10. doi:10.3389/fpsyt.2020.00541
- Anbutsu H, Fukatsu T. 2011. *Spiroplasma* as a model insect endosymbiont. *Environ Microbiol Rep* **3**:144–153. doi:10.1111/j.1758-2229.2010.00240.x
- Andreotti R, León AAP De, Dowd SE, Guerrero FD, Bendele KG, Scoles GA. 2011. Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through tag-encoded pyrosequencing. *BMC Microbiol* **11**. doi:10.1186/1471-2180-11-6
- Angelakis E, Mediannikov O, Jos S-L, Berenger J-M, Parola P, Raoult D. 2016. *Candidatus Coxiella massiliensis* infection. *Emerg Infect Dis* **22**:285–288. doi:10.3201/eid2202.150106
- Antonovics J, Wilson AJ, Forbes MR, Hauffe HC, Kallio ER, Leggett HC, Longdon B, Okamura B, Sait SM,

- Webster JP. 2017. The evolution of transmission mode. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **372**:7–11. doi:10.1098/rstb.2016.0083
- Azagi T, Klement E, Perlman G, Lustig Y, Mumcuoglu KY, Apanaskevich DA, Gottlieb Y. 2017. *Francisella*-like endosymbionts and *Rickettsia* species in local and imported *Hyalomma* ticks. *Appl Environ Microbiol* **83**:1–14. doi:10.1128/AEM.01302-17
- Ballinger MJ, Gawryluk RMR, Perlman SJ. 2018a. Toxin and genome evolution in a *Drosophila* defensive symbiosis. *Genome Biol Evol* **11**:253–262. doi:10.1093/gbe/evy272
- Ballinger MJ, Moore LD, Perlman SJ. 2018b. Evolution and diversity of inherited *Spiroplasma* symbionts in Myrmica ants. *Appl Environ Microbiol* **84**. doi:10.1128/AEM.02299-17
- Ballinger MJ, Perlman SJ. 2019. The defensive *Spiroplasma*. *Curr Opin Insect Sci* **32**:36–41. doi:10.1016/j.cois.2018.10.004
- Ballinger MJ, Perlman SJ. 2017. Generality of toxins in defensive symbiosis: Ribosome-inactivating proteins and defense against parasitic wasps in *Drosophila*. *PLoS Pathog* **13**:1–19. doi:10.1371/journal.ppat.1006431
- Bass D, Stentiford GD, Wang H-C, Koskella B, Tyler CR. 2019. The pathobiome in animal and plant diseases. *Trends Ecol Evol* **34**:996–1008. doi:10.1016/j.tree.2019.07.012
- Beaver PC, Burgdorfer W. 1984. A microfilaria of exceptional size from the ixodid tick, *Ixodes dammini*, from Shelter Island, New York. *J Parasitol* **70**:963–966.
- Bell-Sakyi L, Palomar AM, Kazimirova M. 2015. Isolation and propagation of a *Spiroplasma* sp. from Slovakian *Ixodes ricinus* ticks in *Ixodes* spp. cell lines. *Ticks Tick Borne Dis* **6**:601–606. doi:10.1016/j.ttbdis.2015.05.002
- Ben-Yosef M, Rot A, Mahagna M, Kapri E, Behar A, Gottlieb Y. 2020. *Coxiella*-Like endosymbiont of *Rhipicephalus sanguineus* is required for physiological processes during ontogeny. *Front Microbiol* **11**:1–16. doi:10.3389/fmicb.2020.00493
- Benelli G. 2020. Pathogens manipulating tick behavior—through a glass, darkly. *Pathogens* **9**:1–13. doi:10.3390/pathogens9080664
- Bennett GM, Moran NA. 2015. Heritable symbiosis : The advantages and perils of an evolutionary rabbit hole. *PNAS* **112**:10169–10176. doi:10.1073/pnas.1421388112
- Bennett GM, Moran NA. 2013. Small, smaller, smallest: The origins and evolution of ancient dual symbioses in a phloem-feeding insect. *Genome Biol Evol* **5**:1675–1688. doi:10.1093/gbe/evt118
- Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès MCC, Charles T, Chen X, Cocolin L, Eversole K, Corral GH, Kazou M, Kinkel L, Lange L, Lima N, Loy A, Macklin JA, Maguin E, Mauchline T, McClure R, Mitter B, Ryan M, Sarand I, Smidt H, Schelkle B, Roume H, Kiran GS, Selvin J, Souza RSC de, Van Overbeek L, Singh BK, Wagner M, Walsh A, Sessitsch A, Schloter M. 2020. Microbiome definition re-visited: Old concepts and new challenges. *Microbiome* **8**:1–22. doi:10.1186/s40168-020-00875-0
- Binetruy F, Bailly X, Chevillon C, Martin OY, Bernasconi M V., Duron O. 2019a. Phylogenetics of the *Spiroplasma ixodetis* endosymbiont reveals past transfers between ticks and other arthropods. *Ticks*

- Tick Borne Dis* **10**:575–584. doi:10.1016/j.ttbdis.2019.02.001
- Binetruy F, Buysse M, Barosi R, Duron O. 2020a. Novel *Rickettsia* genotypes in ticks in French Guiana, South America. *Sci Rep* **10**:10–14. doi:10.1038/s41598-020-59488-0
- Binetruy F, Buysse M, Lejarre Q, Barosi R, Villa M, Rahola N, Paupy C, Ayala D, Duron O. 2020b. Microbial community structure reveals instability of nutritional symbiosis during the evolutionary radiation of *Amblyomma* ticks. *Mol Ecol* **29**:1016–1029. doi:10.1111/mec.15373
- Binetruy F, Chevillon C, de Thoisy B, Garnier S, Duron O. 2019b. Survey of ticks in French Guiana. *Ticks Tick Borne Dis* **10**:77–85. doi:10.1016/j.ttbdis.2018.09.003
- Bishop C, Jurga E, Graham L. 2021. Patterns of bacterial diversity in embryonic capsules of the spotted salamander *Ambystoma maculatum*: an expanding view of a symbiosis. *FEMS Microbiol Ecol* **97**. doi:10.1093/femsec/fiab128
- Blow F, Douglas AE. 2019. The hemolymph microbiome of insects. *J Insect Physiol* **115**:33–39. doi:10.1016/j.jinsphys.2019.04.002
- Bohacsova M, Mediannikov O, Kazimirova M, Raoult D, Sekeyova Z. 2016. *Arsenophonus nasoniae* and rickettsiae infection of *Ixodes ricinus* due to parasitic wasp *Ixodiphagus hookeri*. *PLoS One* **11**:1–11. doi:10.1371/journal.pone.0149950
- Bolaños LM, Servín-Garcidueñas LE, Martínez-Romero E. 2015. Arthropod-*Spiroplasma* relationship in the genomic era. *FEMS Microbiol Ecol* **91**:1–8. doi:10.1093/femsec/fiu008
- Bonnet S, George J-C, Boulanger N. 2015. 6. L'interface tique-hôte et la transmission des pathogènes. Tiques et maladies à tiques : Biologie, écologie évolutive, Épidémiologie. doi:10.4000/books.irdeditions.9045
- Bonnet SI, Binetruy F, Hernández-Jarguín AM, Duron O. 2017. The tick microbiome: Why non-pathogenic microorganisms matter in tick biology and pathogen transmission. *Front Cell Infect Microbiol* **7**. doi:10.3389/fcimb.2017.00236
- Bonnet SI, Pollet T. 2020. Update on the intricate tango between tick microbiomes and tick-borne pathogens. *Parasite Immunol* 1–12. doi:10.1111/pim.12813
- Bordenstein SR, Theis KR. 2015. Host biology in light of the microbiome: Ten principles of holobionts and hologenomes. *PLoS Biol* **13**:1–23. doi:10.1371/journal.pbio.1002226
- Borowiec ML. 2016. AMAS: A fast tool for alignment manipulation and computing of summary statistics. *PeerJ* **2016**. doi:10.7717/peerj.1660
- Bowman AS, Nuttall P, editors. 2008. Ticks. Biology, disease and control. Cambridge University Press.
- Brenner AE, Muñoz-Leal S, Sachan M, Labruna MB, Raghavan R. 2020. Ticks convert pathogenic *Coxiella* into endosymbionts. *bioRxiv* 1–9.
- Bressan A. 2014. Emergence and evolution of *Arsenophonus* bacteria as insect-vectored plant pathogens. *Infect Genet Evol* **22**:81–90. doi:10.1016/j.meegid.2014.01.004
- Bressan A, Terlizzi F, Credi R. 2012. Independent origins of vectored plant pathogenic bacteria from arthropod-associated *Arsenophonus* endosymbionts. *Microb Ecol* **63**:628–638. doi:10.1007/s00248-

011-9933-5

- Brianti E, Otranto D, Dantas-Torres F, Weigl S, Latrofa MS, Gaglio G, Napoli E, Brucato G, Cauquil L, Giannetto S, Bain O. 2012. *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodida, Ixodidae) as intermediate host of a canine neglected filarial species with dermal microfilariae. *Vet Parasitol* **183**:330–337. doi:10.1016/j.vetpar.2011.07.031
- Bright M, Bulgheresi S. 2010. A complex journey: Transmission of microbial symbionts. *Nat Rev Microbiol* **8**:218–230. doi:10.1038/nrmicro2262
- Brown AMV, Howe DK, Wasala SK, Peetz AB, Zasada IA, Denver DR. 2015. Comparative genomics of a plant-parasitic nematode endosymbiont suggest a role in nutritional symbiosis. *Genome Biol Evol* **7**:2727–2746. doi:10.1093/gbe/evv176
- Brownlie JC, Cass BN, Riegler M, Witsenburg JJ, Iturbe-Ormaetxe I, McGraw EA, O'Neill SL. 2009. Evidence for metabolic provisioning by a common invertebrate endosymbiont, *Wolbachia pipientis*, during periods of nutritional stress. *PLoS Pathog* **5**. doi:10.1371/journal.ppat.1000368
- Brucker RM, Bordenstein SR. 2012. Speciation by symbiosis. *Trends Ecol Evol* **27**:443–451. doi:10.1016/j.tree.2012.03.011
- Buchner P. 1965. Endosymbiosis of animals with plant microorganisms, Interscience.
- Budachetri K, Browning RE, Adamson SW, Dowd SE, Chao C-C, Ching W-M, Karim S. 2014. An insight into the microbiome of the *Amblyomma maculatum* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* **51**:119–129. doi:10.1603/me12223
- Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, van Themaat EVL, Schulze-Lefert P. 2013. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu Rev Plant Biol* **64**:807–838. doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120106
- Burgdorfer W. 1993. The historical road to the discovery of *Borrelia burgdorferi* In: Weber K, Burgdorfer Willy, Schierz G, editors. Aspects of Lyme Borreliosis. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. pp. 21–28. doi:10.1007/978-3-642-77614-4_2
- Burgdorfer W, Brinton LP. 1975. Mechanisms of transovarial infection of Spotted Fever *Rickettsiae* in ticks. *Ann N Y Acad Sci* **266**:61–72. doi:10.1111/j.1749-6632.1975.tb35088.x
- Burgdorfer W, Hayes SF, Mavros AJ. 1981. Nonpathogenic rickettsiae in *Dermacentor andersoni*: a limiting factor for the distribution of *Rickettsia rickettsii*. *Rickettsiae Ricketts Dis* 585–594.
- Buysse M, Duron O. 2020. Two novel *Rickettsia* species of soft ticks in North Africa: 'Candidatus Rickettsia africaseptentrionalis' and 'Candidatus Rickettsia mauretanicus.' *Ticks Tick Borne Dis* **11**:101376. doi:10.1016/j.ttbdis.2020.101376
- Buysse M, Plantard O, McCoy KD, Duron O, Menard C. 2019. Tissue localization of *Coxiella*-like endosymbionts in three European tick species through fluorescence in situ hybridization. *Ticks Tick Borne Dis* **10**:798–804. doi:10.1016/j.ttbdis.2019.03.014
- Cabezas-cruz A, Pollet T, Estrada-peña A, Allain E, Bonnet SI, Moutailler S. 2019. Handling the microbial complexity associated to ticks. *Ticks Tick-Borne Pathog*. doi:10.5772/intechopen.80511

- Cafiso A, Bazzocchi C, De Marco L, Opara MN, Sasseria D, Plantard O. 2016. Molecular screening for *Midichloria* in hard and soft ticks reveals variable prevalence levels and bacterial loads in different tick species. *Ticks Tick Borne Dis* **7**:1186–1192. doi:10.1016/j.ttbdis.2016.07.017
- Cafiso A, Sasseria D, Romeo C, Serra V, Hervet C, Bandi C, Plantard O, Bazzocchi C. 2019. *Midichloria mitochondrii*, endosymbiont of *Ixodes ricinus*: evidence for the transmission to the vertebrate host during the tick blood meal. *Ticks Tick Borne Dis* **10**:5–12. doi:10.1016/j.ttbdis.2018.08.008
- Calderón-Cortés N, Quesada M, Watanabe H, Cano-Camacho H, Oyama K. 2012. Endogenous plant cell wall digestion: A key mechanism in insect evolution. *Annu Rev Ecol Evol Syst* **43**:45–71. doi:10.1146/annurev-ecolsys-110411-160312
- Capella-Gutiérrez S, Silla-Martínez JM, Gabaldón T. 2009. trimAl: A tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* **25**:1972–1973. doi:10.1093/bioinformatics/btp348
- Carpi G, Cagnacci F, Wittekindt NE, Zhao F, Qi J, Lynn P, Drautz DI, Rizzoli A, Schuster SC. 2011. Metagenomic profile of the bacterial communities associated with *Ixodes ricinus* ticks. *PLoS Negl Trop Dis* **6**. doi:10.1371/journal.pone.0025604
- Carthey AJR, Gillings MR, Blumstein DT. 2018. The extended genotype: Microbially mediated olfactory communication. *Trends Ecol Evol* **33**:885–894. doi:https://doi.org/10.1016/j.tree.2018.08.010
- Caspi-Fluger A, Inbar M, Mozes-Daube N, Katzir N, Portnoy V, Belausov E, Hunter MS, Zchori-Fein E. 2012. Horizontal transmission of the insect symbiont *Rickettsia* is plant-mediated. *Proc R Soc B Biol Sci* **279**:1791–1796. doi:10.1098/rspb.2011.2095
- CDC. 2021. Tickborne disease surveillance data summary. <https://www.cdc.gov/ticks/data-summary/index.html>
- Chaston JM, Suen G, Tucker SL, Andersen AW, Bhasin A, Bode E, Bode HB, Brachmann AO, Cowles CE, Cowles KN, Darby C, de León L, Drace K, Du Z, Givaudan A, Herbert Tran EE, Jewell KA, Knack JJ, Krasomil-Osterfeld KC, Kukor R, Lanois A, Latreille P, Leimgruber NK, Lipke CM, Liu R, Lu X, Martens EC, Marri PR, Médigue C, Menard ML, Miller NM, Morales-Soto N, Norton S, Ogier JC, Orchard SS, Park D, Park Y, Qurollo BA, Sugar DR, Richards GR, Rouy Z, Slominski B, Slominski K, Snyder H, Tjaden BC, van der Hoeven R, Welch RD, Wheeler C, Xiang B, Barbazuk B, Gaudriault S, Goodner B, Slater SC, Forst S, Goldman BS, Goodrich-Blair H. 2011. The entomopathogenic bacterial endosymbionts *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: Convergent lifestyles from divergent genomes. *PLoS One* **6**. doi:10.1371/journal.pone.0027909
- Chiel E, Zchori-Fein E, Inbar M, Gottlieb Y, Adachi-Hagimori T, Kelly SE, Asplen MK, Hunter MS. 2009. Almost there: Transmission routes of bacterial symbionts between trophic levels. *PLoS One* **4**:1–11. doi:10.1371/journal.pone.0004767
- Chmelař J, Kotál J, Karim S, Kopacek P, Francischetti IMB, Pedra JHF, Kotsyfakis M. 2016. Sialomes and mialomes: A systems-biology view of tick tissues and tick-host interactions. *Trends Parasitol* **32**:242–254. doi:10.1016/j.pt.2015.10.002
- Chomicki G, Werner GDA, West SA, Kiers ET. 2020. Compartmentalization drives the evolution of symbiotic

- cooperation. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **375**. doi:10.1098/rstb.2019.0602
- Chong RA, Moran NA. 2018. Evolutionary loss and replacement of *Buchnera*, the obligate endosymbiont of aphids. *ISME J* **12**:898–908. doi:10.1038/s41396-017-0024-6
- Chrostek E, Pelz-Stelinski K, Hurst GDD, Hughes GL. 2017. Horizontal transmission of intracellular insect symbionts via plants. *Front Microbiol* **8**:2237. doi:10.3389/fmicb.2017.02237
- Cibichakravarthy B, Oses-Prieto JA, Ben-Yosef M, Burlingame AL, Karr TL, Gottlieb Y. 2022. Comparative proteomics of *Coxiella*-like endosymbionts (CLEs) in the symbiotic organs of *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Microbiol Spectr* **10**. doi:10.1128/spectrum.01673-21
- Cisak E, Wójcik-Fatla A, Zając V, Sawczyn A, Sroka J, Dutkiewicz J. 2015. *Spiroplasma* - an emerging arthropod-borne pathogen? *Ann Agric Environ Med* **22**:589–593. doi:10.5604/12321966.1185758
- Coimbra-Dores MJ, Jaarsma RI, Carmo AO, Maia-Silva M, Fonville M, Da Costa DFF, Brandão RML, Azevedo F, Casero M, Oliveira AC, Afonso SMD, Sprong H, Rosa F, Dias D. 2020. Mitochondrial sequences of *Rhipicephalus* and *Coxiella* endosymbiont reveal evidence of lineages co-cladogenesis. *FEMS Microbiol Ecol* **96**:1–18. doi:10.1093/femsec/fiaa072
- Combes C. 2001. L'art d'être parasite. Les associations du vivant, Flammarion. ed.
- Combes C. 1995. Interactions durables. Écologie et évolution du parasitisme, Masson. ed. Paris.
- Corbin C, Jones JE, Chrostek E, Fenton A, Hurst GDD. 2021. Thermal sensitivity of the *Spiroplasma-Drosophila hydei* protective symbiosis: The best of climes, the worst of climes. *Mol Ecol* **30**:1336–1344. doi:10.1111/mec.15799
- Cryan JF, O'riordan KJ, Cowan CSM, Sandhu K V., Bastiaanssen TFS, Boehme M, Codagnone MG, Cussotto S, Fulling C, Golubeva A V., Guzzetta KE, Jaggar M, Long-Smith CM, Lyte JM, Martin JA, Molinero-Perez A, Moloney G, Morelli E, Morillas E, O'connor R, Cruz-Pereira JS, Peterson VL, Rea K, Ritz NL, Sherwin E, Spichak S, Teichman EM, van de Wouw M, Ventura-Silva AP, Wallace-Fitzsimons SE, Hyland N, Clarke G, Dinan TG. 2019. The microbiota-gut-brain axis. *Physiol Rev* **99**:1877–2013. doi:10.1152/physrev.00018.2018
- Cull B, Burkhardt NY, Wang XR, Thorpe CJ, Oliver JD, Kurtti TJ, Munderloh UG. 2022. The *Ixodes scapularis* symbiont *Rickettsia buchneri* inhibits growth of pathogenic Rickettsiaceae in tick cells: Implications for vector competence. *Front Vet Sci* **8**:1–20. doi:10.3389/fvets.2021.748427
- Cunnington AJ, Sim K, Deierl A, Kroll JS, Brannigan E, Darby J. 2016. Vaginal seeding of infants born by caesarean section. *BMJ* **352**. doi:10.1136/bmj.i227
- Cutler SJ, Abdissa A, Trape J-F. 2009. New concepts for the old challenge of African relapsing fever borreliosis. *Clin Microbiol Infect* **15**:400–406. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02819.x
- D'Souza G, Kost C. 2016. Experimental evolution of metabolic dependency in bacteria. *PLoS Genet* **12**:1–27. doi:10.1371/journal.pgen.1006364
- Darriba Di, Posada D, Kozlov AM, Stamatakis A, Morel B, Flouri T. 2020. ModelTest-NG: A new and scalable tool for the selection of DNA and protein evolutionary models. *Mol Biol Evol* **37**:291–294. doi:10.1093/molbev/msz189

- Darwin C. 1859. On the origin of species.
- Davenport ER. 2016. Elucidating the role of the host genome in shaping microbiome composition. *Gut Microbes* **7**:178–184. doi:10.1080/19490976.2016.1155022
- Daveu R, Laurence C, Bouju-Albert A, Sasseria D, Plantard O. 2021. Symbiont dynamics during the blood meal of *Ixodes ricinus* nymphs differ according to their sex. *Ticks Tick Borne Dis* **12**. doi:10.1016/j.ttbdis.2021.101707
- Davis A. 1986. Bibliography of the *Ixodiphagini* (Hymenoptera, Chalcidoidea, Encyrtidae), parasites of ticks (Acari, Ixodidae), with notes on their biology. *Tijdschr Voor Entomol*.
- de la Fuente J, Antunes S, Bonnet S, Cabezas-Cruz A, Domingos AG, Estrada-Peña A, Johnson N, Kocan KM, Mansfield KL, Nijhof AM, Papa A, Rudenko N, Villar M, Alberdi P, Torina A, Ayllón N, Vancova M, Golovchenko M, Grubhoffer L, Caracappa S, Fooks AR, Gortazar C, Rego ROM. 2017. Tick-pathogen interactions and vector competence: Identification of molecular drivers for tick-borne diseases. *Front Cell Infect Microbiol* **7**. doi:10.3389/fcimb.2017.00114
- de la Fuente J, Estrada-Pena A, Venzal JM, Kocan KM, Sonenshine DE. 2008. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front Biosci* **13**:6938–6946. doi:10.2741/3200
- Defazio J, Fleming ID, Shakhsher B, Zaborina O, Alverdy JC. 2014. The opposing forces of the intestinal microbiome and the emerging pathobiome. *Surg Clin North Am* **94**:1151–1161. doi:10.1016/j.suc.2014.08.002
- Degnan PH, Lazarus AB, Wernegreen JJ. 2005. Genome sequence of *Blochmannia pennsylvanicus* indicates parallel evolutionary trends among bacterial mutualists of insects. *Genome Res* **15**:1023–1033. doi:10.1101/gr.3771305
- Delafont V, Brouke A, Bouchon D, Moulin L, Héchard Y. 2013. Microbiome of free-living amoebae isolated from drinking water. *Water Res* **47**:6958–6965. doi:10.1016/j.watres.2013.07.047
- DeNieu M, Mounts K, Manier M. 2019. Two gut microbes are necessary and sufficient for normal cognition in *Drosophila melanogaster*. *bioRxiv* 593723. doi:10.1101/593723
- Dery KJ, Kadono K, Hirao H, Górski A, Kupiec-Weglinski JW. 2020. Microbiota in organ transplantation: An immunological and therapeutic conundrum? *Cell Immunol* **351**:104080. doi:10.1016/j.cellimm.2020.104080
- Di Venere M, Fumagalli M, Cafiso A, De Marco L, Epis S, Plantard O, Bardoni A, Salvini R, Viglio S, Bazzocchi C, Iadarola P, Sasseria D. 2015. *Ixodes ricinus* and its endosymbiont *Midichloria mitochondrii*: A comparative proteomic analysis of salivary glands and ovaries. *PLoS One* **10**:1–16. doi:10.1371/journal.pone.0138842
- Díaz-Sánchez S, Estrada-Peña A, Cabezas-Cruz A, de la Fuente J. 2019. Evolutionary insights into the tick hologenome. *Trends Parasitol* **35**:725–737. doi:10.1016/j.pt.2019.06.014
- Douglas AE. 2016. How multi-partner endosymbioses function. *Nat Rev Microbiol* **14**:731–743. doi:10.1038/nrmicro.2016.151
- Douglas AE. 2009. The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Funct Ecol* **23**:38–47.

doi:10.1111/j.1365-2435.2008.01442.x

- Douglas AE. 2006. Phloem-sap feeding by animals: Problems and solutions. *J Exp Bot* **57**:747–754. doi:10.1093/jxb/erj067
- Douglas AE, Werren JH. 2016. Holes in the hologenome: Why host-microbe symbioses are not holobionts. *MBio* **7**:1–7. doi:10.1128/mBio.02099-15
- Dubilier N, Bergin C, Lott C. 2008. Symbiotic diversity in marine animals: The art of harnessing chemosynthesis. *Nat Rev Microbiol* **6**:725–740. doi:10.1038/nrmicro1992
- Duron O. 2015. The IS1111 insertion sequence used for detection of *Coxiella burnetii* is widespread in *Coxiella*-like endosymbionts of ticks. *FEMS Microbiol Lett* **362**:1–8. doi:10.1093/femsle/fnv132
- Duron O, Binetruy F, Noel V, Cremaschi J, D. McCoy K, Arnathau C, Plantard O, Goolsby J, A. Perez de Leon A, J.A. Heylen D, Van Oosten AR, Gottlieb Y, Baneth G, A. Guglielmone A, Estrada-Pena A, N. Opara M, Zenner L, Vavre F, Chevillon C. 2017a. Evolutionary changes in symbiont community structure in ticks. *Mol Ecol*. doi:10.1111/ijlh.12426
- Duron O, Binetruy F, Noel V, Cremaschi J, McCoy K, Arnathau C, Plantard O, Goolsby J, Perez De Leon AA, Heylen DJA, Raoul Van Oosten A, Gottlieb Y, Baneth G, Guglielmone AA, Estrada-Pena A, Opara MN, Zenner L, Vavre F, Chevillon C. 2017b. Evolutionary changes in symbiont community structure in ticks. *Mol Ecol* **26**:2905–2921. doi:10.1111/mec.14094
- Duron O, Bouchon D, Boutin S, Bellamy L, Zhou L, Engelstadter J, Hurst GD. 2008. The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. *BMC Biol* **6**:1–12. doi:10.1186/1741-7007-6-27
- Duron O, Gottlieb Y. 2020. Convergence of nutritional symbioses in obligate blood-feeders. *Trends Parasitol*. doi:10.1016/j.pt.2020.07.007
- Duron O, Morel O, Noël V, Buysse M, Binetruy F, Lancelot R, Loire E, Ménard C, Bouchez O, Vavre F, Vial L. 2018. Tick-bacteria mutualism depends on B vitamin synthesis pathways. *Curr Biol* **28**:1–7. doi:10.1016/j.cub.2018.04.038
- Duron O, Noël V, McCoy KD, Bonazzi M, Sidi-Boumedine K, Morel O, Vavre F, Zenner L, Jourdain E, Durand P, Arnathau C, Renaud F, Trape JF, Biguezoton AS, Cremaschi J, Dietrich M, Léger E, Appelgren A, Dupraz M, Gómez-Díaz E, Diatta G, Dayo GK, Adakal H, Zoungrana S, Vial L, Chevillon C. 2015a. The recent evolution of a maternally-inherited endosymbiont of ticks led to the emergence of the Q fever pathogen, *Coxiella burnetii*. *PLoS Pathog* **11**:1–23. doi:10.1371/journal.ppat.1004892
- Duron O, Sidi-boumedine K, Rousset E, Moutailler S, Jourdain E. 2015b. The importance of ticks in Q fever transmission: What has (and has not) been demonstrated? *Trends Parasitol* **31**:536–552. doi:10.1016/j.pt.2015.06.014
- Duron O, Wilkes TE, Hurst GDD. 2010. Interspecific transmission of a male-killing bacterium on an ecological timescale. *Ecol Lett* **13**:1139–1148. doi:10.1111/j.1461-0248.2010.01502.x
- Ebani VV, Mancianti F. 2022. Potential role of birds in the epidemiology of *Coxiella burnetii*, *Coxiella*-like agents and *Hepatozoon* spp. *Pathogens* **11**:1–12. doi:10.3390/pathogens11030298

- Ebert D. 2013. The epidemiology and evolution of symbionts with mixed-mode transmission. *Annu Rev Ecol Evol Syst* **44**:623–643. doi:10.1146/annurev-ecolsys-032513-100555
- Edouard S, Subramanian G, Lefevre B, Santos A Dos, Pouedras P, Poinsignon Y, Mediannikov O, Raoult D. 2013. Co-Infection with *Arsenophonus nasoniae* and *Orientia tsutsugamushi* in a Traveler. *Vector-borne zoonotic Dis* **13**:565–571. doi:10.1089/vbz.2012.1083
- Eimer J, Fernström L, Rohlén L, Grankvist A, Loo K, Nyman E, Henningsson AJ, Haglund M, Hultqvist V, Sjöwall J, Wennerås C, Schön T. 2022. *Spiroplasma ixodetis* infections in immunocompetent and immunosuppressed patients after tick exposure, Sweden. *Emerg Infect Dis* **28**:1681–1685. doi:10.3201/eid2808.212524
- Epis S, Mandrioli M, Genchi M, Montagna M, Sacchi L, Pistone D, Sasserà D. 2013. Localization of the bacterial symbiont *Candidatus* Midichloria mitochondrii within the hard tick *Ixodes ricinus* by whole-mount FISH staining. *Ticks Tick Borne Dis* **4**:39–45. doi:10.1016/j.ttbdis.2012.06.005
- Epis S, Sasserà D, Beninati T, Lo N, Beati L, Piesman J, Rinaldi L, McCoy KD, Torina A, Sacchi L, Clementi E, Genchi M, Magnino S, Bandi C. 2008. *Midichloria mitochondrii* is widespread in hard ticks (Ixodidae) and resides in the mitochondria of phylogenetically diverse species. *Parasitology* **135**:485–494. doi:10.1017/S0031182007004052
- Ezenwa VO, Gerardo NM, Inouye DW, Medina M, Xavier JB. 2012. Animal behavior and the microbiome. *Science (80-)* **338**:198–199. doi:10.1126/science.1227412
- Farassat N, Reich M, Serr A, Küchlin S, Erwemi M, Auw-Hädrich C, Krastel H, Lagrèze WA. 2021. *Spiroplasma* species as a rare cause of congenital cataract and uveitis: a case series. *BMC Ophthalmol* **21**:1–4. doi:10.1186/s12886-021-02201-0
- Feldhaar H, Straka J, Krischke M, Berthold K, Stoll S, Mueller MJ, Gross R. 2007. Nutritional upgrading for omnivorous carpenter ants by the endosymbiont *Blochmannia*. *BMC Biol* **5**:1–11. doi:10.1186/1741-7007-5-48
- Ferrarini MG, Dell'Aglio E, Vallier A, Balmand S, Vincent-Monégat C, Hughes S, Gillet B, Parisot N, Zaidman-Rémy A, Vieira C, Heddi A, Rebollo R. 2022. Efficient compartmentalization in insect bacteriomes protects symbiotic bacteria from host immune system. *Microbiome* **10**:156. doi:10.1186/s40168-022-01334-8
- Fierer N, Ferrenberg S, Flores GE, González A, Kueneman J, Legg T, Lynch RC, McDonald D, Mihaljevic JR, O'Neill SP, Rhodes ME, Song SJ, Walters WA. 2012. From animalcules to an ecosystem: Application of ecological concepts to the human microbiome. *Annu Rev Ecol Evol Syst* **43**:137–155. doi:10.1146/annurev-ecolsys-110411-160307
- Figoni J, Gagnière B, Pouey J, Mailles A, Decors A, Madani N, Revest M, Boisset S, Caspar Y. 2022. Augmentation de l'incidence de la tularémie en France : Données de la déclaration obligatoire 2012-2021. *Médecine Mal Infect Form* **1**:S18–S19. doi:10.1016/j.mmifmc.2022.03.063
- Fisher RM, Henry LM, Cornwallis CK, Kiers ET, West SA. 2017. The evolution of host-symbiont dependence. *Nat Commun* **8**:1–8. doi:10.1038/ncomms15973

- Flemming H-C, Wuertz S. 2019. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nat Rev Microbiol* **17**:247–260. doi:10.1038/s41579-019-0158-9
- Flórez L V., Biedermann PHW, Engl T, Kaltenpoth M. 2015. Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. *Nat Prod Rep* **32**:904–936. doi:10.1039/c5np00010f
- Flórez L V., Scherlach K, Gaube P, Ross C, Sitte E, Hermes C, Rodrigues A, Hertweck C, Kaltenpoth M. 2017. Antibiotic-producing symbionts dynamically transition between plant pathogenicity and insect-defensive mutualism. *Nat Commun* **8**. doi:10.1038/ncomms15172
- Francischetti IMB, Sa-Nunes A, Mans BJ, Santos IM, Ribeiro JMC. 2009. The role of saliva in tick feeding. *Front Biosci* **14**:2051–2088. doi:10.2741/3363
- Funkhouser LJ, Bordenstein SR. 2013. Mom knows best: The universality of maternal microbial transmission. *PLoS Biol* **11**:1–9. doi:10.1371/journal.pbio.1001631
- Gall CA, Reif KE, Scoles GA, Mason KL, Mousel M, Noh SM, Brayton KA. 2016. The bacterial microbiome of *Dermacentor andersoni* ticks influences pathogen susceptibility. *ISME J* **10**:1846–1855. doi:10.1038/ismej.2015.266
- Galloway-Peña J, Hanson B. 2020. Tools for analysis of the microbiome. *Dig Dis Sci* **65**:674–685. doi:10.1007/s10620-020-06091-y
- Gasparich GE. 2010. Spiroplasmas and phytoplasmas: Microbes associated with plant hosts. *Biologicals* **38**:193–203. doi:10.1016/j.biologicals.2009.11.007
- Gasparich GE. 2002. Spiroplasmas: Evolution, Adaptation and Diversity. *Front Biosci* **7**:619–640.
- Gaye M, Amanzougaghene N, Laidoudi Y, Niang EHA, Sekeyová Z, Laroche M, Bérenger JM, Raoult D, Kazimírová M, Fenollar F, Mediannikov O. 2020. Hymenopteran parasitoids of hard ticks in western africa and the Russian far east. *Microorganisms* **8**:1–13. doi:10.3390/microorganisms8121992
- Gehrer L, Vorburger C. 2012. Parasitoids as vectors of facultative bacterial endosymbionts in aphids. *Biol Lett* **8**:613–615. doi:10.1098/rsbl.2012.0144
- Gerardo N, Hurst G. 2017. Q&A: Friends (but sometimes foes) within: The complex evolutionary ecology of symbioses between host and microbes. *BMC Biol* **15**:4–9. doi:10.1186/s12915-017-0455-6
- Gerhart JG, Auguste Dutcher H, Brenner AE, Moses AS, Grubhoffer L, Raghavan R. 2018. Multiple acquisitions of pathogen-derived *Francisella* endosymbionts in soft ticks. *Genome Biol Evol* **10**:607–615. doi:10.1093/gbe/evy021
- Gerhart JG, Moses AS, Raghavan R. 2016. A *Francisella*-like endosymbiont in the Gulf Coast tick evolved from a mammalian pathogen. *Sci Rep* **6**:1–6. doi:10.1038/srep33670
- Gerth M, Martinez-Montoya H, Ramirez P, Masson F, Griffin JS, Aramayo R, Siozios S, Lemaitre B, Mateos M, Hurst GDD. 2021. Rapid molecular evolution of *Spiroplasma* symbionts of *Drosophila*. *Microb Genomics* **7**:1–15. doi:10.1099/MGEN.0.000503
- Gil R, Silva FJ, Zientz E, Delmotte F, González-Candelas F, Latorre A, Rausell C, Kamerbeek J, Gadau J, Hölldobler B, Van Ham RCHJ, Gross R, Moya A. 2003. The genome sequence of *Blochmannia floridanus*: Comparative analysis of reduced genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:9388–9393.

doi:10.1073/pnas.1533499100

- Giles EM, D'Adamo GL, Forster SC. 2019. The future of faecal transplants. *Nat Rev Microbiol* **17**:719. doi:10.1038/s41579-019-0271-9
- Gill SR, Mihai P, Deboy RT, Eckburg PE, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE. 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science (80-)* **312**:1355–1359. doi:10.1126/science.1124234
- Gillespie JJ, Joardar V, Williams KP, Driscoll T, Hostetler JB, Nordberg E, Shukla M, Walenz B, Hill CA, Nene VM, Azad AF, Sobral BW, Caler E. 2012. A *Rickettsia* genome overrun by mobile genetic elements provides insight into the acquisition of genes characteristic of an obligate intracellular lifestyle. *J Bacteriol* **194**:376–394. doi:10.1128/JB.06244-11
- Gomard Y, Flores O, Vittecoq M, Blanchon T, Toty C, Duron O, Mavingui P, Tortosa P, McCoy KD. 2021. Changes in bacterial diversity, composition and interactions during the development of the seabird tick *Ornithodoros maritimus* (Argasidae). *Microb Ecol* **81**:770–783. doi:10.1007/s00248-020-01611-9
- Gonella E, Pajoro M, Marzorati M, Crotti E, Mandrioli M, Pontini M, Bulgari D, Negri I, Sacchi L, Chouaia B, Daffonchio D, Alma A. 2015. Plant-mediated interspecific horizontal transmission of an intracellular symbiont in insects. *Sci Rep* **5**:1–10. doi:10.1038/srep15811
- Gottlieb Y, Ghanim M, Gueguen G, Kontsedalov S, Vavre F, Fleury F, Zchori-Fein E. 2008. Inherited intracellular ecosystem: symbiotic bacteria share bacteriocytes in whiteflies. *FASEB J* **22**:2591–2599. doi:10.1096/fj.07-101162
- Gottlieb Y, Lalar I, Klasson L. 2015. Distinctive genome reduction rates revealed by genomic analyses of two *Coxiella*-like endosymbionts in ticks. *Genome Biol Evol* **7**:1779–1796. doi:10.1093/gbe/evv108
- Gottlieb Y, Lavy E, Kaufman M, Markovics A, Ghanim M, Aroch I. 2012. A novel bacterial symbiont in the nematode *Spirocerca lupi*. *BMC Microbiol* **12**:0–6. doi:10.1186/1471-2180-12-133
- Graf JS, Schorn S, Kitzinger K, Ahmerkamp S, Woehle C, Huettel B, Schubert CJ, Kuypers MMM, Milucka J. 2021. Anaerobic endosymbiont generates energy for ciliate host by denitrification. *Nature* **591**:445–450. doi:10.1038/s41586-021-03297-6
- Gray JS, Kahl O, Lane RS, Levin ML, Tsao JI. 2016. Diapause in ticks of the medically important *Ixodes ricinus* species complex. *Ticks Tick Borne Dis* **7**:992–1003. doi:10.1016/j.ttbdis.2016.05.006
- Gray MW. 1992. The endosymbiont hypothesis revisited In: Wolstenholme DR, Jeon KW, editors. *International Review of Cytology*. Academic Press. pp. 233–357. doi:10.1016/S0074-7696(08)62068-9
- Greay TL, Gofton AW, Papparini A, Ryan UM, Oskam CL, Irwin PJ. 2018. Recent insights into the tick microbiome gained through next-generation sequencing. *Parasites and Vectors* **11**:1–14. doi:10.1186/s13071-017-2550-5
- Green EA, Klassen JL. 2020. Draft Genome Sequence of *Spiroplasma platyhelix* ATCC 51748, Isolated from a Dragonfly. *Microbiol Resour Announc* **9**:10–11. doi:10.1128/mra.00422-20

- Groussin M, Mazel F, Sanders JG, Smillie CS, Lavergne S, Thuiller W, Alm EJ. 2017. Unraveling the processes shaping mammalian gut microbiomes over evolutionary time. *Nat Commun* **8**. doi:10.1038/ncomms14319
- Guizzo MG, Neupane S, Kucera M, Perner J, Frantová H, da Silva Vaz I, Oliveira PL d., Kopacek P, Zurek L. 2020. Poor unstable midgut microbiome of hard ticks contrasts with abundant and stable monospecific microbiome in ovaries. *Front Cell Infect Microbiol* **10**:1–10. doi:10.3389/fcimb.2020.00211
- Guizzo MG, Parizi LF, Nunes RD, Schama R, Albano RM, Tirloni L, Oldiges DP, Vieira RP, Oliveira WHC, Leite MDS, Gonzales SA, Farber M, Martins O, Vaz IDS, Oliveira PL. 2017. A *Coxiella* mutualist symbiont is essential to the development of *Rhipicephalus microplus*. *Sci Rep* **7**:1–10. doi:10.1038/s41598-017-17309-x
- Gulia-Nuss M, Nuss AB, Meyer JM, Sonenshine DE, Roe RM, Waterhouse RM, Sattelle DB, De La Fuente J, Ribeiro JM, Megy K, Thimmapuram J, Miller JR, Walenz BP, Koren S, Hostetler JB, Thiagarajan M, Joardar VS, Hannick LI, Bidwell S, Hammond MP, Young S, Zeng Q, Abrudan JL, Almeida FC, Ayllón N, Bhide K, Bissinger BW, Bonzon-Kulichenko E, Buckingham SD, Caffrey DR, Caimano MJ, Croset V, Driscoll T, Gilbert D, Gillespie JJ, Giraldo-Calderón GI, Grabowski JM, Jiang D, Khalil SMS, Kim D, Kocan KM, Koči J, Kuhn RJ, Kurtti TJ, Lees K, Lang EG, Kennedy RC, Kwon H, Perera R, Qi Y, Radolf JD, Sakamoto JM, Sánchez-Gracia A, Severo MS, Silverman N, Šimo L, Tojo M, Tornador C, Van Zee JP, Vázquez J, Vieira FG, Villar M, Wespiser AR, Yang Y, Zhu J, Arensburger P, Pietrantonio P V., Barker SC, Shao R, Zdobnov EM, Hauser F, Grimmelikhuijzen CJP, Park Y, Rozas J, Benton R, Pedra JHF, Nelson DR, Unger MF, Tubio JMC, Tu Z, Robertson HM, Shumway M, Sutton G, Wortman JR, Lawson D, Wikel SK, Nene VM, Fraser CM, Collins FH, Birren B, Nelson KE, Caler E, Hill CA. 2016. Genomic insights into the *Ixodes scapularis* tick vector of Lyme disease. *Nat Commun* **7**. doi:10.1038/ncomms10507
- Haine ER. 2008. Symbiont-mediated protection. *Proc R Soc B Biol Sci* **275**:353–361. doi:10.1098/rspb.2007.1211
- Hamdy BH. 1977. Biochemical and physiological studies of certain ticks (Ixodoidea). Excretion during ixodid feeding. *J Med Entomol* **14**:15–18. doi:10.1093/jmedent/14.1.15
- Hamilton PT, Hodson CN, Curtis CI, Perlman SJ. 2018. Genetics and genomics of an unusual selfish sex ratio distortion in an insect. *Curr Biol* **28**:3864–3870.e4. doi:10.1016/j.cub.2018.10.035
- Hamilton PT, Peng F, Boulanger MJ, Perlman SJ. 2016. A ribosome-inactivating protein in a *Drosophila* defensive symbiont. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**:350–355. doi:10.1073/pnas.1518648113
- Hamilton PT, Perlman SJ. 2013. Host Defense via Symbiosis in *Drosophila*. *PLoS One* **9**. doi:10.1371/journal.ppat.1003808
- Hammer TJ, Sanders JG, Fierer N. 2019. Not all animals need a microbiome. *FEMS Microbiol Lett* **366**:1–11. doi:10.1093/femsle/fnz117
- Hanning I, Diaz-Sanchez S. 2015. The functionality of the gastrointestinal microbiome in non-human animals. *Microbiome* **3**:51. doi:10.1186/s40168-015-0113-6
- Harris EK, Verhoeve VI, Banajee KH, Macaluso JA, Azad AF, Macaluso KR. 2017. Comparative vertical

- transmission of *Rickettsia* by *Dermacentor variabilis* and *Amblyomma maculatum*. *Ticks Tick Borne Dis* **8**:598–604. doi:10.1016/j.ttbdis.2017.04.003
- Harrison A, Bennett NC. 2012. The importance of the aggregation of ticks on small mammal hosts for the establishment and persistence of tick-borne pathogens: an investigation using the R0 model. *Parasitology* **139**:1605–1613. doi:10.1017/S0031182012000893
- Hartmann AC, Baird AH, Knowlton N, Huang D. 2017. The paradox of environmental symbiont acquisition in obligate mutualisms. *Curr Biol* **27**:3711–3716.e3. doi:10.1016/j.cub.2017.10.036
- Harumoto T, Fukatsu T, Lemaitre B. 2018. Common and unique strategies of male killing evolved in two distinct *Drosophila* symbionts. *Proc B* **285**. doi:10.1098/rspb.2017.2167
- Harumoto T, Lemaitre B. 2018. Male-killing in a bacterial symbiont of *Drosophila*. *Nature* **557**:252–255. doi:10.1038/s41586-018-0086-2
- Hawlana H, Rynkiewicz E, Toh E, Alfred A, Durden LA, Hastriter MW, Nelson DE, Rong R, Munro D, Dong Q, Fuqua C, Clay K. 2013. The arthropod, but not the vertebrate host or its environment, dictates bacterial community composition of fleas and ticks. *ISME J* **7**:221–223. doi:10.1038/ismej.2012.71
- He L-S, Zhang P-W, Huang J-M, Zhu F-C, Danchin A, Wang Y. 2018. The enigmatic genome of an obligate ancient *Spiroplasma* symbiont in a hadal holothurian. *Appl Environ Microbiol* **84**:1–14. doi:10.1128/AEM.01965-17
- Healy DB, Ryan CA, Ross RP, Stanton C, Dempsey EM. 2022. Clinical implications of preterm infant gut microbiome development. *Nat Microbiol* **7**:22–33. doi:10.1038/s41564-021-01025-4
- Heddi A, Vallier A, Anselme C, Xin H, Rahbe Y, Wäckers F. 2005. Molecular and cellular profiles of insect bacteriocytes: Mutualism and harm at the initial evolutionary step of symbiogenesis. *Cell Microbiol* **7**:293–305. doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00461.x
- Heijtz RD, Wang S, Anuar F, Qian Y, Björkholm B, Samuelsson A, Hibberd ML, Forssberg H, Pettersson S. 2011. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:3047–3052. doi:10.1073/pnas.1010529108
- Hendry TA, Hunter MS, Baltrus DA. 2014. The facultative symbiont *Rickettsia* protects an invasive whitefly against entomopathogenic *Pseudomonas syringae* strains. *Appl Environ Microbiol* **80**:7161–7168. doi:10.1128/AEM.02447-14
- Hillman K, Goodrich-Blair H. 2016. Are you my symbiont? Microbial polymorphic toxins and antimicrobial compounds as honest signals of beneficial symbiotic defensive traits. *Curr Opin Microbiol* **31**:184–190. doi:10.1016/j.mib.2016.04.010
- Hosokawa T, Koga R, Kikuchi Y, Meng X, Fukatsu T. 2010. *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *PNAS* **107**:769–774. doi:10.1073/pnas.0911476107
- Hrusa G, Farmer W, Weiss BL, Applebaum T, Roma JS, Szeto L, Aksoy S, Runyen-Janecky LJ. 2015. TonB-dependent heme iron acquisition in the tsetse fly symbiont *Sodalis glossinidius*. *Appl Environ Microbiol* **81**:2900–2909. doi:10.1128/AEM.04166-14
- Hunter DJ, Torkelson JL, Bodnar J, Mortazavi B, Laurent T, Deason J, Thephavongsa K, Zhong J. 2015. The

- rickettsia* endosymbiont of *Ixodes pacificus* contains all the genes of *de novo* folate biosynthesis. *PLoS One* **10**:1–15. doi:10.1371/journal.pone.0144552
- Hurst GDD, Jiggins FM. 2000. Male-killing bacteria in insects: Mechanisms, incidence, and implications. *Emerg Infect Dis* **6**:329–336. doi:10.3201/eid0604.000402
- Husnik F, Hypsa V, Darby A. 2020. Insect-symbiont gene expression in the midgut bacteriocytes of a blood-sucking parasite. *Genome Biol Evol* **12**:429–442. doi:10.1093/GBE/EVAA032
- Husnik F, Mccutcheon JP. 2016. Repeated replacement of an intrabacterial symbiont in the tripartite nested mealybug symbiosis. *PNAS* **113**:5416–5424. doi:10.1101/042267
- Husnik F, McCutcheon JP. 2018. Functional horizontal gene transfer from bacteria to eukaryotes. *Nat Rev Microbiol* **16**:67–79. doi:10.1038/nrmicro.2017.137
- Huttenhower C, Gevers D, Knight R, Abubucker S, Badger JH, Chinwalla AT, Creasy HH, Earl AM, FitzGerald MG, Fulton RS, Giglio MG, Hallsworth-Pepin K, Lobos EA, Madupu R, Magrini V, Martin JC, Mitreva M, Muzny DM, Sodergren EJ, Versalovic J, Wollam AM, Worley KC, Wortman JR, Young SK, Zeng Q, Aagaard KM, Abolude OO, Allen-Vercoe E, Alm EJ, Alvarado L, Andersen GL, Anderson S, Appelbaum E, Arachchi HM, Armitage G, Arze CA, Ayvaz T, Baker CC, Begg L, Belachew T, Bhonagiri V, Bihan M, Blaser MJ, Bloom T, Bonazzi V, Paul Brooks J, Buck GA, Buhay CJ, Busam DA, Campbell JL, Canon SR, Cantarel BL, Chain PSG, Chen I-MA, Chen L, Chhibba S, Chu K, Ciulla DM, Clemente JC, Clifton SW, Conlan S, Crabtree J, Cutting MA, Davidovics NJ, Davis CC, DeSantis TZ, Deal C, Delehaunty KD, Dewhirst FE, Deych E, Ding Y, Dooling DJ, Dugan SP, Michael Dunne W, Scott Durkin A, Edgar RC, Erlich RL, Farmer CN, Farrell RM, Faust K, Feldgarden M, Felix VM, Fisher S, Fodor AA, Forney LJ, Foster L, Di Francesco V, Friedman J, Friedrich DC, Fronick CC, Fulton LL, Gao H, Garcia N, Giannoukos G, Giblin C, Giovanni MY, Goldberg JM, Goll J, Gonzalez A, Griggs A, Gujja S, Kinder Haake S, Haas BJ, Hamilton HA, Harris EL, Hepburn TA, Herter B, Hoffmann DE, Holder ME, Howarth C, Huang KH, Huse SM, IZard J, Jansson JK, Jiang H, Jordan C, Joshi V, Katancik JA, Keitel WA, Kelley ST, Kells C, King NB, Knights D, Kong HH, Koren O, Koren S, Kota KC, Kovar CL, Kyrpides NC, La Rosa PS, Lee SL, Lemon KP, Lennon N, Lewis CM, Lewis L, Ley RE, Li K, Liolios K, Liu B, Liu Y, Lo C-C, Lozupone CA, Dwayne Lunsford R, Madden T, Mahurkar AA, Mannon PJ, Mardis ER, Markowitz VM, Mavromatis K, McCorrison JM, McDonald D, McEwen J, McGuire AL, McInnes P, Mehta T, Mihindukulasuriya KA, Miller JR, Minx PJ, Newsham I, Nusbaum C, O’Laughlin M, Orvis J, Pagani I, Palaniappan K, Patel SM, Pearson M, Peterson J, Podar M, Pohl C, Pollard KS, Pop M, Priest ME, Proctor LM, Qin X, Raes J, Ravel J, Reid JG, Rho M, Rhodes R, Riehle KP, Rivera MC, Rodriguez-Mueller B, Rogers Y-H, Ross MC, Russ C, Sanka RK, Sankar P, Fah Sathirapongsasuti J, Schloss JA, Schloss PD, Schmidt TM, Scholz M, Schriml L, Schubert AM, Segata N, Segre JA, Shannon WD, Sharp RR, Sharpton TJ, Shenoy N, Sheth NU, Simone GA, Singh I, Smillie CS, Sobel JD, Sommer DD, Spicer P, Sutton GG, Sykes SM, Tabbaa DG, Thiagarajan M, Tomlinson CM, Torralba M, Treangen TJ, Truty RM, Vishnivetskaya TA, Walker J, Wang L, Wang Z, Ward D V, Warren W, Watson MA, Wellington C, Wetterstrand KA, White JR, Wilczek-Boney K, Wu Y, Wylie KM, Wylie T, Yandava C, Ye L, Ye Y, Yooseph S, Youmans BP, Zhang L, Zhou Y, Zhu Y, Zoloth L, Zucker JD, Birren BW, Gibbs RA, Highlander SK, Methé BA, Nelson KE, Petrosino JF, Weinstock GM, Wilson RK, White O, Consortium THMP. 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **486**:207–214.

doi:10.1038/nature11234

- Jaenike J, Unckless R, Cockburn SN, Boelio L, Perlman SJ. 2010. Adaptation via Symbiosis : Recent Spread of a *Drosophila* Defensive Symbiont. *Science (80-)* **329**:212–215. doi:10.1126/science.1188235
- Jia N, Wang J, Shi W, Du L, Sun Y, Zhan W, Jiang JF, Wang Q, Zhang B, Ji P, Bell-Sakyi L, Cui XM, Yuan TT, Jiang BG, Yang WF, Lam TTY, Chang QC, Ding SJ, Wang XJ, Zhu JG, Ruan XD, Zhao L, Wei J Te, Ye RZ, Que TC, Du CH, Zhou YH, Cheng JX, Dai PF, Guo W Bin, Han XH, Huang EJ, Li LF, Wei W, Gao YC, Liu JZ, Shao HZ, Wang X, Wang CC, Yang TC, Huo QB, Li W, Chen HY, Chen SE, Zhou LG, Ni XB, Tian JH, Sheng Y, Liu T, Pan YS, Xia LY, Li J, Zhao F, Cao WC. 2020. Large-scale comparative analyses of tick genomes elucidate their genetic diversity and vector capacities. *Cell* **182**:1328-1340.e13. doi:10.1016/j.cell.2020.07.023
- Jiggins FM, Hurst GDD, Jiggins CD, Schulenburg JHGVD, Majerus MEN. 2000. The butterfly *Danaus chrysippus* is infected by a male-killing *Spiroplasma* bacterium. *Parasitology* **120**:439–446. doi:10.1017/S0031182099005867
- Johnson RC, Schmid GP, Hyde FW, Steigerwalt AG, Brenner DJ. 1984. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: Etiologic Agent of Lyme Disease. *Int J Syst Evol Microbiol* **34**:496–497. doi:10.1099/00207713-34-4-496
- Ju JF, Bing XL, Zhao DS, Guo Y, Xi Z, Hoffmann AA, Zhang KJ, Huang HJ, Gong JT, Zhang X, Hong XY. 2020. *Wolbachia* supplement biotin and riboflavin to enhance reproduction in planthoppers. *ISMEJ* **14**:676–687. doi:10.1038/s41396-019-0559-9
- Kaltenpoth M, Winter SA, Kleinhammer A. 2009. Localization and transmission route of *Coriobacterium glomerans*, the endosymbiont of pyrrhocorid bugs. *FEMS Microbiol Ecol* **69**:373–383. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00722.x
- Kambris Z, Cook PE, Phuc HK, Sinkins SP. 2009. Immune activation by life-shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes. *Science (80-)* **326**:134–136. doi:10.1126/science.1177531
- Katoh K, Misawa K, Kuma KI, Miyata T. 2002. MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* **30**:3059–3066. doi:10.1093/nar/gkf436
- Keeler KH. 1985. 4. Cost:benefit models of mutualism In: Boucher DH, editor. *The Biology of Mutualism. Ecology and Evolution*.
- Keeling PJ, McCutcheon JP. 2017. Endosymbiosis: The feeling is not mutual. *J Theor Biol* **434**:75–79. doi:10.1016/j.jtbi.2017.06.008
- Kerney R, Burns J, Kim E. 2017. Investigating mechanisms of algal entry into salamander cells. Algal and Cyanobacteria symbioses. pp. 209–239. doi:10.1142/9781786340580_0007
- Klompen JSH, Black IV WC, Keirans JE, Oliver JH. 1996. Evolution of ticks. *Annu Rev Entomol* **41**:141–161. doi:10.1146/annurev.en.41.010196.001041
- Klompen JSH, Oliver JH. 1993. Haller's organ in the tick family Argasidae (Acari: Parasitiformes: Ixodida). *J Parasitol* **79**:591–603.
- Klyachko O, Stein BD, Grindle N, Clay K, Fuqua C. 2007. Localization and visualization of a *Coxiella*-type symbiont within the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Appl Environ Microbiol* **73**:6584–6594.

doi:10.1128/AEM.00537-07

- Kok OB, Petney TN. 1993. Small and medium sized mammals as predators of ticks (Ixodoidea) in South Africa. *Exp Appl Acarol* **17**:733–740. doi:10.1007/BF00051831
- Körner S, Makert GR, Ulbert S, Pfeffer M, Mertens-Scholz K. 2021. The prevalence of *Coxiella burnetii* in hard ticks in Europe and their role in Q fever transmission revisited—A systematic review. *Front Vet Sci* **8**:1–16. doi:10.3389/fvets.2021.655715
- Koskella B, Bergelson J. 2020. The study of host-microbiome (co)evolution across levels of selection. *Philos Trans B* **375**. doi:10.1098/rstb.2019.0604
- Kratz RF, others. 1991. Symbiosis as a source of evolutionary innovation speciation and morphogenesis. MIT press.
- Krueger DM, Gustafson RG, Cavanaugh CM. 1996. Vertical transmission of chemoautotrophic symbionts in the bivalve *Solemya velum* (Bivalvia: Protobranchia). *Biol Bull* **190**:195–202. doi:10.2307/1542539
- Kugeler KJ, Gurfield N, Creek JG, Mahoney KS, Versage JL, Petersen JM. 2005. Discrimination between *Francisella tularensis* and *Francisella*-like endosymbionts when screening ticks by PCR. *Appl Environ Microbiol* **71**:7594–7597. doi:10.1128/AEM.71.11.7594-7597.2005
- Kumar D, Sharma SR, Adegoke A, Kennedy A, Tuten HC, Li AY, Karim S. 2022. Recently evolved *Francisella*-like endosymbiont outcompetes an ancient and evolutionarily associated *Coxiella*-like endosymbiont in the lone star tick (*Amblyomma americanum*) linked to the alpha-gal syndrome. *Front Cell Infect Microbiol* **12**:1–18. doi:10.3389/fcimb.2022.787209
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* **35**:1547–1549. doi:10.1093/molbev/msy096
- Kurlovs AH, Li J, Cheng D, Zhong J. 2014. *Ixodes pacificus* ticks maintain embryogenesis and egg hatching after antibiotic treatment of *rickettsia* endosymbiont. *PLoS One* **9**. doi:10.1371/journal.pone.0104815
- Kurtti TJ, Felsheim RF, Burkhardt NY, Oliver JD, Heu CC, Munderloh UG. 2015. *Rickettsia buchneri* sp. nov., a rickettsial endosymbiont of the blacklegged tick *Ixodes scapularis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **65**:965–970. doi:10.1099/ijs.0.000047
- Labruna MB, Walker DH. 2014. *Rickettsia felis* and changing paradigms about pathogenic *Rickettsia*. *Emerg Infect Dis* **20**:1768–1769. doi:10.3201/eid2010.131797
- Lalzar I, Friedmann Y, Gottlieb Y. 2014. Tissue tropism and vertical transmission of *Coxiella* in *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus turanicus* ticks. *Environ Microbiol* **16**:3657–3668. doi:10.1111/1462-2920.12455
- Lalzar I, Harrus S, Mumcuoglu KY, Gottlieb Y. 2012. Composition and seasonal variation of *Rhipicephalus turanicus* and *Rhipicephalus sanguineus* bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* **78**:4110–4116. doi:10.1128/AEM.00323-12
- Lamelas A, Gosalbes MJ, Manzano-Marín A, Peretó J, Moya A, Latorre A. 2011. *Serratia symbiotica* from the aphid *Cinara cedri*: A missing link from facultative to obligate insect endosymbiont. *PLoS Genet* **7**. doi:10.1371/journal.pgen.1002357

- Lapadula WJ, Sánchez Puerta MV, Juri Ayub M. 2013. Revising the taxonomic distribution, origin and evolution of Ribosome Inactivating Protein Genes. *PLoS One* **8**:1–8. doi:10.1371/journal.pone.0072825
- Latorre A, Manzano-Marín A. 2017. Dissecting genome reduction and trait loss in insect endosymbionts. *Ann N Y Acad Sci* **1389**:52–75. doi:10.1111/nyas.13222
- Le Clec'h W, Chevalier FD, Genty L, Bertaux J, Bouchon D, Sicard M. 2013. Cannibalism and predation as paths for horizontal passage of *Wolbachia* between terrestrial isopods. *PLoS One* **8**. doi:10.1371/journal.pone.0060232
- Lederberg BJ, McCray AT. 2001. “Ome Sweet” Omics: A genealogical treasury of words. *Sci* **15**:8.
- Lejal E, Chiquet J, Aubert J, Robin S, Estrada-Peña A, Rue O, Midoux C, Mariadassou M, Bailly X, Cougoul A, Gasqui P, Cosson JF, Chalvet-Monfray K, Vayssier-Taussat M, Pollet T. 2021. Temporal patterns in *Ixodes ricinus* microbial communities: An insight into tick-borne microbe interactions. *Microbiome* **9**:1–20. doi:10.1186/s40168-021-01051-8
- Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS, Schlegel ML, Tucker TA, Schrenzel MD, Knight R, Gordon JI. 2008a. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science (80-)* **320**:1647–1651. doi:10.1126/science.1155725
- Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Knight R, Gordon JI. 2008b. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat Rev Microbiol* **6**:776–788. doi:10.1038/nrmicro1978
- Li H, Sosa-Calvo J, Horn HA, Pupo MT, Clardy J, Rabeling C, Schultz TR, Currie CR. 2018. Convergent evolution of complex structures for ant-bacterial defensive symbiosis in fungus-farming ants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**:10720–10725. doi:10.1073/pnas.1809332115
- Li L-H, Zhang Y, Zhu D. 2018. Effects of antibiotic treatment on the fecundity of *Rhipicephalus haemaphysaloides* ticks. *Parasit Vectors* **11**:242. doi:10.1186/s13071-018-2807-7
- Li H Sen, Huang YH, Chen ML, Ren Z, Qiu BY, De Clercq P, Heckel G, Pang H. 2021. Genomic insight into diet adaptation in the biological control agent *Cryptolaemus montrouzieri*. *BMC Genomics* **22**:1–12. doi:10.1186/s12864-021-07442-3
- Li SJ, Ahmed MZ, Lv N, Shi PQ, Wang XM, Huang JL, Qiu BL. 2017. Plant-mediated horizontal transmission of *Wolbachia* between whiteflies. *ISME J* **11**:1019–1028. doi:10.1038/ismej.2016.164
- Liang T, Li X, Du J, Yao W, Sun G, Dong X, Liu Z, Ou J, Meng Q, Gu W, Wang W. 2011. Identification and isolation of a *Spiroplasma* pathogen from diseased freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*, in China: A new freshwater crustacean host. *Aquaculture* **318**:1–6. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.03.018
- Liu JN, Yu ZJ, Liu LM, Li NX, Wang RR, Zhang CM, Liu JZ. 2016. Identification, distribution and population dynamics of *Francisella*-like endosymbiont in *Haemaphysalis doenitzi* (Acari: Ixodidae). *Sci Rep* **6**:1–9. doi:10.1038/srep35178
- Liu XD, Guo HF. 2019. Importance of endosymbionts *Wolbachia* and *Rickettsia* in insect resistance development. *Curr Opin Insect Sci* **33**:84–90. doi:10.1016/j.cois.2019.05.003
- Lo N, Bandi C, Watanabe H, Nalepa C, Beninati T. 2003. Evidence for cocladogenesis between diverse

- dictyopteran lineages and their intracellular endosymbionts. *Mol Biol Evol* **20**:907–913. doi:10.1093/molbev/msg097
- Lo N, Beninati T, Sasser D, Bouman EAP, Santagati S, Gern L, Sambri V, Masuzawa T, Gray JS, Jaenson TGT, Bouattour A, Kenny MJ, Guner ES, Kharitonov IG, Bitam I, Bandi C. 2006. Widespread distribution and high prevalence of an alpha-proteobacterial symbiont in the tick *Ixodes ricinus*. *Environ Microbiol* **8**:1280–1287. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01024.x
- Lo W-S, Huang Y-Y, Kuo C-H. 2016. Winding paths to simplicity: Genome evolution in facultative insect symbionts. *FEMS Microbiol Rev* **40**:855–874. doi:10.1093/femsre/fuw028
- Login FH, Balmand S, Vallier A, Vincent-Monégat C, Vigneron A, Weiss-Gayet M, Rochat D, Heddi A. 2011. Antimicrobial peptides keep insect endosymbionts under control. *Science (80-)* **334**:362–365. doi:10.1126/science.1209728
- Londoño I. 1976a. Distribution and movement of infective-stage larvae of *Dipetalonema viteae* (Filarioidea) in the vector tick, *Ornithodoros tartakowskyi* (Argasidae). *J Parasitol* **62**:589–595.
- Londoño I. 1976b. Behavior of *Dipetalonema viteae* (Filarioidea) during escape from the vector tick, *Ornithodoros tartakowskyi* (Argasidae). *J Parasitol* **62**:596–603.
- Londoño I. 1976c. Transmission of microfilariae and infective larvae of *Dipetalonema viteae* (Filarioidea) among vector ticks, *Ornithodoros tartakowskyi* (Argasidae), and loss of microfilariae in coxal fluid. *J Parasitol* **62**:786–788.
- Lorenz B, Schroeder J, Reischl U. 2002. First evidence of an endogenous *Spiroplasma* sp. infection in humans manifesting as unilateral cataract associated with anterior uveitis in a premature baby. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **240**:348–353. doi:10.1007/s00417-002-0453-3
- Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* **489**:220–230. doi:10.1038/nature11550
- Lukasik P, Guo H, Van Asch M, Ferrari J, Godfray HCJ. 2013. Protection against a fungal pathogen conferred by the aphid facultative endosymbionts *Rickettsia* and *Spiroplasma* is expressed in multiple host genotypes and species and is not influenced by co-infection with another symbiont. *J Evol Biol* **26**:2654–2661. doi:10.1111/jeb.12260
- MacConnachie AA, Fox R, Kennedy DR, Seaton RA. 2009. Faecal transplant for recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a UK case series. *QJM An Int J Med* **102**:781–784. doi:10.1093/qjmed/hcp118
- Machado-Ferreira E, Dietrich G, Hojgaard A, Levin M, Piesman J, Zeidner NS, Soares CAG. 2011. *Coxiella* symbionts in the Cayenne tick *Amblyomma cajennense*. *Invertebr Microbiol* **62**:134–142. doi:10.1007/s00248-011-9868-x
- Machado-Ferreira E, Vizzoni VF, Balsemao-Pires E, Moerbeck L, Gazeta GS, Piesman J, Voloch CM, Soares CAG. 2016. *Coxiella* symbionts are widespread into hard ticks. *Parasitol Res* **115**:4691–4699. doi:10.1007/s00436-016-5230-z
- Manzano-Marín A, Coeur D'acier A, Clamens A-L, Cruaud C, Erie Barbe V, Jousset E. 2022. Co-obligate symbioses have repeatedly evolved across aphids, but partner identity and nutritional contributions

- vary across lineages. *bioRxiv* 2022.08.28.505559. doi:10.1101/2022.08.28.505559
- Manzano-Marín A, Latorre A. 2016. Snapshots of a shrinking partner: Genome reduction in *Serratia symbiotica*. *Sci Rep* **6**:1–11. doi:10.1038/srep32590
- Manzano-Marín A, Simon JC, Latorre A. 2016. Reinventing the wheel and making it round again: Evolutionary convergence in *Buchnera-Serratia* symbiotic consortia between the distantly related Lachninae aphids *Tuberolachnus salignus* and *Cinara cedri*. *Genome Biol Evol* **8**:1440–1458. doi:10.1093/gbe/evw085
- Manzano-Román R, Díaz-Martín V, de la Fuente J, Pérez-Sánchez R. 2012. Soft ticks as pathogen vectors: Distribution, surveillance and control In: Shah MM, editor. Parasitology. Rijeka: IntechOpen. doi:10.5772/32521
- Margulis L. 1991. Symbiogenesis and Symbiogenesis. Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis.
- Margulis L. 1967. On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol* **14**:255–74. doi:10.1016/0022-5193(67)90079-3
- Martin SH, Singh KS, Gordon IJ, Omufwoko KS, Collins S, Warren IA, Munby H, Brattström O, Traut W, Martins DJ, Smith DAS, Jiggins CD, Bass C, Ffrench-Constant RH. 2019. Whole-chromosome hitchhiking driven by a male-killing endosymbiont. *PLoS Biol* **18**. doi:10.1371/journal.pbio.3000610
- Matet A, Le Flèche-Matéos A, Doz F, Dureau P, Cassoux N. 2020. Ocular *Spiroplasma ixodetis* in Newborns, France. *Emerg Infect Dis* **26**. doi:10.3201/eid2602.191097
- Mattila JT, Munderloh UG, Kurtti TJ. 2007. *Rickettsia peacockii*, an endosymbiont of *Dermacentor andersoni*, does not elicit or inhibit humoral immune responses from immunocompetent *D. andersoni* or *Ixodes scapularis* cell lines. *Dev Comp Immunol* **31**:1095–1106. doi:10.1016/j.dci.2007.01.011
- McCarville JL, Chen GY, Cuevas VD, Troha K, Ayres JS. 2020. Microbiota Metabolites in Health and Disease. *Annu Rev Immunol* **38**:147–170. doi:10.1146/annurev-immunol-071219-125715
- McCutcheon JP, Boyd BM, Dale C. 2019. The life of an insect endosymbiont from the cradle to the grave. *Curr Biol* **29**:485–495. doi:10.1016/j.cub.2019.03.032
- McFall-Ngai MJ, Ruby EG. 1998. Sepioids and vibrios: When first they met. Reciprocal interactions between host and symbiont lead to the creation of a complex light-emitting organ. *Bioscience* **48**:257–265. doi:10.2307/1313352
- McLaren MR, Callahan BJ. 2020. Pathogen resistance may be the principal evolutionary advantage provided by the microbiome. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **375**. doi:10.1098/rstb.2019.0592
- Michelet L, Bonnet S, Madani N, Moutailler S. 2013. Discriminating *Francisella tularensis* and *Francisella*-like endosymbionts in *Dermacentor reticulatus* ticks: Evaluation of current molecular techniques. *Vet Microbiol* **163**:399–403. doi:10.1016/j.vetmic.2013.01.014
- Milhano N, Palma M, Marcili A, Nuncio MS, de Carvalho IL, De Sousa R. 2014. *Rickettsia lusitaniae* sp. nov. isolated from the soft tick *Ornithodoros erraticus* (Acarina: Argasidae). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **37**:189–193. doi:10.1016/j.cimid.2014.01.006

- Militzer N, Bartel A, Clausen PH, Hoffmann-Köhler P, Nijhof AM. 2021. Artificial feeding of all consecutive life stages of *Ixodes ricinus*. *Vaccines* **9**:1–16. doi:10.3390/vaccines9040385
- Miller AK, Westlake CS, Cross KL, Leigh BA, Bordenstein SR. 2021. The microbiome impacts host hybridization and speciation. *PLoS Biol* **19**:1–14. doi:10.1371/journal.pbio.3001417
- Misof B, Liu S, Meusemann K, Peters RS, Donath A, Mayer C, Frandsen PB, Ware J, Flouri T, Beutel RG, Niehuis O, Petersen M, Izquierdo-Carrasco F, Wappler T, Rust J, Aberer AJ, Aspöck U, Aspöck H, Bartel D, Blanke A, Berger S, Böhm A, Buckley TR, Calcott B, Chen J, Friedrich F, Fukui M, Fujita M, Greve C, Grobe P, Gu S, Huang Y, Jermiin LS, Kawahara AY, Krogmann L, Kubiak M, Lanfear R, Letsch H, Li Yiyuan, Li Z, Li J, Lu H, Machida R, Mashimo Y, Kapli P, McKenna DD, Meng G, Nakagaki Y, Navarrete-Heredia JL, Ott M, Ou Y, Pass G, Podsiadlowski L, Pohl H, von Reumont BM, Schütte K, Sekiya K, Shimizu S, Slipinski A, Stamatakis A, Song W, Su X, Szucsich NU, Tan M, Tan X, Tang M, Tang J, Timelthaler G, Tomizuka S, Trautwein M, Tong X, Uchifune T, Walz MG, Wiegmann BM, Wilbrandt J, Wipfler B, Wong TKF, Wu Q, Wu G, Xie Y, Yang S, Yang Q, Yeates DK, Yoshizawa K, Zhang Q, Zhang R, Zhang W, Zhang Yunhui, Zhao J, Zhou C, Zhou L, Ziesmann T, Zou S, Li Yingrui, Xu X, Zhang Yong, Yang H, Wang Jian, Wang Jun, Kjer KM, Zhou X. 2014. Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science (80-)* **346**:763–767. doi:10.1126/science.1257570
- Monnin D, Jackson R, Kiers ET, Bunker M, Ellers J, Henry LM. 2020. Parallel evolution in the integration of a co-obligate aphid symbiosis. *Curr Biol* **1**–9. doi:10.1016/j.cub.2020.03.011
- Montllor CB, Maxmen A, Purcell AH. 2002. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecol Entomol* **27**:189–195. doi:10.1046/j.1365-2311.2002.00393.x
- Moore RE, Townsend SD. 2019. Temporal development of the infant gut microbiome. *Open Biol* **9**. doi:10.1098/rsob190128
- Moran NA. 1996. Accelerated evolution and Muller's ratchet in endosymbiotic bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:2873–2878. doi:10.1073/pnas.93.7.2873
- Moran NA, Bennett GM. 2014. The tiniest tiny genomes. *Annu Rev Microbiol* **68**:195–215. doi:10.1146/annurev-micro-091213-112901
- Moran NA, McCutcheon JP, Nakabachi A. 2008. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Ann Rev Genet* **42**:165–190. doi:10.1146/annurev.genet.41.110306.130119
- Moran NA, Sloan DB. 2015. The hologenome concept: Helpful or hollow? *PLoS Biol* **13**:1–10. doi:10.1371/journal.pbio.1002311
- Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, Rocha BC, Hall-mendelin S, Day A, Riegler M, Hugo LE, Johnson KN, Kay BH, Mcgraw EA, van den Hurk AF, Ryan PA, O'Neill SL. 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with Dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell* **139**:1268–1278. doi:10.1016/j.cell.2009.11.042
- Mousa WK, Chehadeh F, Husband S. 2022. Recent advances in understanding the structure and function of the human microbiome. *Front Microbiol* **13**. doi:10.3389/fmicb.2022.825338

- Moustafa MAM, Mohamed WMA, Lau ACC, Chatanga E, Qiu Y, Hayashi N, Naguib D, Sato K, Takano A, Matsuno K, Nonaka N, Taylor D, Kawabata H, Nakao R. 2022. Novel symbionts and potential human pathogens excavated from argasid tick microbiomes that are shaped by dual or single symbiosis. *Comput Struct Biotechnol J* **20**:1979–1992. doi:10.1016/j.csbj.2022.04.020
- Moutailler S, Valiente Moro C, Vaumourin E, Michelet L, Tran FH, Devillers E, Cosson JF, Gasqui P, Van VT, Mavingui P, Vourc'h G, Vayssier-Taussat M. 2016. Co-infection of ticks: The rule rather than the exception. *PLoS Negl Trop Dis* **10**:1–17. doi:10.1371/journal.pntd.0004539
- Muegge BD, Kuczynski J, Knights D, Clemente JC, González A, Fontana L, Henrissat B, Knight R, Gordon JI. 2011. Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science (80-)* **332**:970–974. doi:10.1126/science.1198719
- Mueller NT, Bakacs E, Combellick J, Grigoryan Z, Dominguez-Bello MG. 2015. The infant microbiome development: Mom matters. *Trends Mol Med* **21**:109–117. doi:10.1016/j.molmed.2014.12.002
- Mwangi EN, Hassan SM, Kaaya GP, Essuman S. 1997. The impact of *Ixodiphagus hookeri*, a tick parasitoid, on *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) in a field trial in Kenya. *Exp Appl Acarol* **21**:117–126. doi:10.1023/b:appa.0000031790.30821.57
- Nakao R, Abe T, Nijhof AM, Yamamoto S, Jongejan F, Ikemura T, Sugimoto C. 2013. A novel approach, based on BLSOMs (Batch Learning Self-Organizing Maps), to the microbiome analysis of ticks. *ISME J* **7**:1003–1015. doi:10.1038/ismej.2012.171
- Narasimhan S, Fikrig E. 2015. Tick microbiome: The force within. *Trends Parasitol* **31**:315–323. doi:10.1016/j.pt.2015.03.010
- Narasimhan S, Rajeevan N, Liu L, Zhao YO, Heisig J, Pan J, Eppler-Epstein R, Deponte K, Fish D, Fikrig E. 2014. Gut microbiota of the tick vector *Ixodes scapularis* modulate colonization of the Lyme disease spirochete. *Cell Host Microbe* **15**:58–71. doi:10.1016/j.chom.2013.12.001
- Nardi T, Olivieri E, Kariuki E, Sasser D, Castelli M. 2021. Sequence of a *Coxiella* endosymbiont of the tick *Amblyomma nuttalli* suggests a pattern of convergent genome reduction in the *Coxiella* genus. *Genome Biol Evol* **13**:1–7. doi:10.1093/gbe/evaa253
- Nasir H, Noda H. 2003. Yeast-like symbiotes as a sterol source in anobiid beetles (Coleoptera, Anobiidae): Possible metabolic pathways from fungal sterols to 7-dehydrocholesterol. *Arch Insect Biochem Physiol* **52**:175–182. doi:10.1002/arch.10079
- Neelakanta G, Sultana H, Fish D, Anderson JF, Fikrig E. 2010. *Anaplasma phagocytophilum* induces *Ixodes scapularis* ticks to express an antifreeze glycoprotein gene that enhances their survival in the cold. *J Clin Invest* **120**:3179–3190. doi:10.1172/JCI42868
- Neu J, Rushing J. 2011. Cesarean versus vaginal delivery: Long-term infant outcomes and the hygiene hypothesis. *Clin Perinatol* **38**:321–331. doi:10.1016/j.clp.2011.03.008
- Niebylski ML, Peacock MG, Fischer ER, Porcella SF, Schwan TG. 1997. Characterization of an endosymbiont infecting wood ticks, *Dermacentor andersoni*, as a member of the genus *Francisella*. *Appl Environ Microbiol* **63**:3933–3940. doi:10.1128/aem.63.10.3933-3940.1997

- Niebylski ML, Peacock MG, Schwan TG. 1999. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on its tick vector (*Dermacentor andersoni*). *Appl Environ Microbiol* **65**:773–778. doi:10.1128/aem.65.2.773-778.1999
- Nikoh N, Hosokawa T, Moriyama M, Oshima K, Hattori M, Fukatsu T. 2014. Evolutionary origin of insect-*Wolbachia* nutritional mutualism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:10257–10262. doi:10.1073/pnas.1409284111
- Ninio C, Plantard O, Serra V, Pollera C, Ferrari N, Cafiso A, Sasserà D, Bazzocchi C. 2015. Antibiotic treatment of the hard tick *Ixodes ricinus*: Influence on *Midichloria mitochondrii* load following blood meal. *Ticks Tick Borne Dis* **6**:653–657. doi:10.1016/j.ttbdis.2015.05.011
- Nishino T, Tanahashi M, Lin C-P, Koga R, Fukatsu T. 2016. Fungal and bacterial endosymbionts of eared leafhoppers of the subfamily Ledrinae (Hemiptera: Cicadellidae). *Appl Entomol Zool* **51**:465–477. doi:10.1007/s13355-016-0422-7
- Noda H, Koizumi Y. 2003. Sterol biosynthesis by symbiotes: cytochrome P450 sterol C-22 desaturase genes from yeastlike symbiotes of rice planthoppers and anobiid beetles. *Insect Biochem Mol Biol* **33**:649–658. doi:10.1016/S0965-1748(03)00056-0
- Novakova M, Costa FB, Krause F, Literak I, Labruna MB. 2016. *Rickettsia vini* n. sp. (Rickettsiaceae) infecting the tick *Ixodes arboricola* (Acari: Ixodidae). *Parasites and Vectors* **9**:1–8. doi:10.1186/s13071-016-1742-8
- Nuttall PA. 2019. Wonders of tick saliva. *Ticks Tick Borne Dis* **10**:470–481. doi:10.1016/j.ttbdis.2018.11.005
- Nyholm S V. 2020. In the beginning: Egg-microbe interactions and consequences for animal hosts. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **375**. doi:10.1098/rstb.2019.0593
- Nyholm S V, McFall-Ngai MJ. 2021. A lasting symbiosis: How the Hawaiian bobtail squid finds and keeps its bioluminescent bacterial partner. *Nat Rev Microbiol* **19**:666–679. doi:10.1038/s41579-021-00567-y
- Obregón D, Bard E, Abrial D, Estrada-Peña A, Cabezas-Cruz A. 2019. Sex-specific linkages between taxonomic and functional profiles of tick gut microbiomes. *Front Cell Infect Microbiol* **9**:1–16. doi:10.3389/fcimb.2019.00298
- Oliver JD, Price LD, Burkhardt NY, Heu CC, Khoo BS, Thorpe CJ, Kurtti TJ, Munderloh UG. 2021. Growth dynamics and antibiotic elimination of symbiotic *Rickettsia buchneri* in the tick *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Appl Environ Microbiol* **87**:1–9. doi:10.1128/AEM.01672-20
- Oliver KM, Higashi CH V. 2019. Variations on a protective theme: *Hamiltonella defensa* infections in aphids variably impact parasitoid success. *Curr Opin Insect Sci* **32**:1–7. doi:10.1016/j.cois.2018.08.009
- Oliver KM, Russell JA, Morant NA, Hunter MS. 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:1803–1807. doi:10.1073/pnas.0335320100
- Olivieri E, Epis S, Castelli M, Varotto Boccazzi I, Romeo C, Desirò A, Bazzocchi C, Bandi C, Sasserà D. 2019. Tissue tropism and metabolic pathways of *Midichloria mitochondrii* suggest tissue-specific functions in the symbiosis with *Ixodes ricinus*. *Ticks Tick Borne Dis* **10**:1070–1077. doi:10.1016/j.ttbdis.2019.05.019

- Parker RR, Spencer RR. 1926. Rocky Mountain Spotted fever. A study of the relationship between the presence of *Rickettsia*-like organisms in tick smears and the infectiveness of the same ticks. *Public Health Rep* **41**. doi:10.1093/phr/114.4.295
- Perlman SJ, Hunter MS, Zchori-Fein E. 2006. The emerging diversity of *Rickettsia*. *Proc R Soc B* **273**:2097–2106. doi:10.1098/rspb.2006.3541
- Perru O. 2006. Aux origines des recherches sur la symbiose vers 1868-1883. *Rev Hist Sci Paris* **59**:5–27. doi:10.3917/rhs.591.0005
- Petney TN, Kok OB. 1993. Birds as predators of ticks (Ixodoidea) in South Africa. *Exp Appl Acarol* **17**:393–403. doi:10.1007/BF00058602
- Peumans WJ, Van Damme EJM. 2010. Evolution of plant ribosome-inactivating proteins toxic plant proteins. Springer. pp. 1–26. doi:10.1007/978-3-642-12176-0_1
- Pflughoeft KJ, Versalovic J. 2012. Human microbiome in health and disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis* **7**:99–122. doi:10.1146/annurev-pathol-011811-132421
- Pierantoni U. 1922. Sulla biofotogenesi simbiotica. *Boll SocNat Napoli* **34**:307–309.
- Pierantoni U. 1913. Struttura ed evoluzione dell'organo sim-biotico di *Pseudococcus citri* Risso, e ciclo biologico del *Coccidomyces dactylopii*. *Arch Protistenkd* **31**:300–316.
- Pierantoni U. 1911. Origine e struttura del corpo ovale del *Dactylopius citri* e del corpo verde dell' *Aphis brassicae*. *Boll della Soc di Nat Napoli* **24**.
- Piesman J, Eisen L. 2008. Prevention of tick-borne diseases. *Annu Rev Entomol* **53**:323–343. doi:10.1146/annurev.ento.53.103106.093429
- Plantard O, Bouju-Albert A, Malard MA, Hermouet A, Capron G, Verheyden H. 2012. Detection of *Wolbachia* in the tick *Ixodes ricinus* is due to the presence of the hymenoptera endoparasitoid *Ixodiphagus hookeri*. *PLoS One* **7**:1–8. doi:10.1371/journal.pone.0030692
- Pollet T, Sprong H, Lejal E, Krawczyk AI, Moutailler S, Cosson JF, Vayssier-Taussat M, Estrada-Peña A. 2020. The scale affects our view on the identification and distribution of microbial communities in ticks. *Parasites and Vectors* **13**:1–13. doi:10.1186/s13071-020-3908-7
- Pollmann M, Moore LD, Krimmer E, D'Alvise P, Hasselmann M, Perlman SJ, Ballinger MJ, Steidle JLM, Gottlieb Y. 2022. Highly transmissible cytoplasmic incompatibility by the extracellular insect symbiont *Spiroplasma*. *iScience* **25**:104335. doi:10.1016/j.isci.2022.104335
- Portillo A, Palomar AM, Toro M de, Santibáñez S, Santibáñez P, Oteo JA. 2019. Exploring the bacteriome in anthropophilic ticks: To investigate the vectors for diagnosis. *PLoS One* **14**:1–16. doi:10.1371/journal.pone.0213384
- Prado SS, Rubinoff D, Almeida RPP. 2006. Vertical transmission of a Pentatomid caeca-associated symbiont. *Ann Entomol Soc Am* **99**:577–585. doi:10.1603/0013-8746(2006)99[577:VTOAPC]2.0.CO;2
- Qiu Y, Nakao R, Ohnuma A, Kawamori F, Sugimoto C. 2014. Microbial population analysis of the salivary glands of ticks; a possible strategy for the surveillance of bacterial pathogens. *PLoS One* **9**:1–11. doi:10.1371/journal.pone.0103961

- Raele DA, Galante D, Pugliese N, Simone E De, Cafiero MA. 2015. *Coxiella*-like endosymbiont associated to the “Anatolian brown tick” *Rhipicephalus bursa* in Southern Italy. *Microbes Infect* **17**:799–805. doi:10.1016/j.micinf.2015.09.011
- Ramaiah A, Dasch GA. 2018. Genome sequence of *Coxiella*-like endosymbiont strain CLERmD, a bacterial agent in the cattle tick (*Rhipicephalus microplus*) Deutsch Strain. *Genome Announc* **6**:18–19. doi:10.1128/genomeA.00003-18
- Randolph SE. 2011. Transmission of tick-borne pathogens between co-feeding ticks: Milan Labuda’s enduring paradigm. *Ticks Tick Borne Dis* **2**:179–182. doi:10.1016/j.ttbdis.2011.07.004
- Randolph SE, Gern L, Nuttall PA. 1996. Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitol Today* **12**:472–479. doi:https://doi.org/10.1016/S0169-4758(96)10072-7
- Raney WR, Perry JB, Hermance ME. 2022. Transovarial transmission of heartland virus by invasive asian longhorned ticks under laboratory conditions. *Emerg Infect Dis* **28**:726–729. doi:10.3201/eid2803.210973
- Ren FR, Sun X, Wang TY, Yao YL, Huang YZ, Zhang X, Luan JB. 2020. Biotin provisioning by horizontally transferred genes from bacteria confers animal fitness benefits. *ISME J*. doi:10.1038/s41396-020-0704-5
- Reno F, Lopes MR, Gaget K, Duport G, Eloy M-C, Geelhand de Merxem B, Hance T, Calevro F. 2022. Compartmentalized into bacteriocytes but highly invasive: the puzzling case of the co-obligate symbiont *Serratia symbiotica* in the aphid *Periphyllus lyropictus*. *Microbiol Spectr* **10**. doi:10.1128/spectrum.00457-22
- Ribeiro JMC, Makoul GT, Levine J, Robinson DR, Spielman A. 1985. Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *J Exp Med* **161**:332–344. doi:10.1084/jem.161.2.332
- Rio RVM, Attardo GM, Weiss BL. 2016. Grandeur alliances: Symbiont metabolic integration and obligate arthropod hematophagy. *Trends Parasitol* **32**:739–749. doi:10.1016/j.pt.2016.05.002
- Robinson CJ, Bohannan BJM, Young VB. 2010. From structure to function: the ecology of host-associated microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**:453–476. doi:10.1128/mmbr.00014-10
- Rohde C, Wittmann J, Kutter E. 2018. Bacteriophages: A therapy concept against multi-drug-resistant bacteria. *Surg Infect (Larchmt)* **19**:737–744. doi:10.1089/sur.2018.184
- Rojas CA, Ramírez-Barahona S, Holekamp KE, Theis KR. 2021. Host phylogeny and host ecology structure the mammalian gut microbiota at different taxonomic scales. *Anim Microbiome* **3**. doi:10.1186/s42523-021-00094-4
- Rosenberg E, Koren O, Reshef L, Efrony R, Zilber-Rosenberg I. 2007. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat Rev Microbiol* **5**:355–362. doi:10.1038/nrmicro1635
- Rosenberg E, Zilber-Rosenberg I. 2018. The hologenome concept of evolution after 10 years. *Microbiome*. doi:10.1186/s40168-018-0457-9

- Russell JA, Latorre A, Sabater-Muñoz B, Moya A, Moran NA. 2003. Side-stepping secondary symbionts: Widespread horizontal transfer across and beyond the Aphidoidea. *Mol Ecol* **12**:1061–1075. doi:10.1046/j.1365-294X.2003.01780.x
- Russell SL. 2019. Transmission mode is associated with environment type and taxa across bacteria-eukaryote symbioses: A systematic review and meta-analysis. *FEMS Microbiol Lett* **366**:1–13. doi:10.1093/femsle/fnz013
- Rynkiewicz EC, Hemmerich C, Rusch DB, Fuqua C, Clay K. 2015. Concordance of bacterial communities of two tick species and blood of their shared rodent host. *Mol Ecol* **24**:2566–2579. doi:10.1111/mec.13187
- Sabree ZL, Kambhampati S, Moran NA. 2009. Nitrogen recycling and nutritional provisioning by *Blattabacterium*, the cockroach endosymbiont. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:19521–19526. doi:10.1073/pnas.0907504106
- Sachs JL, Skophammer RG, Regus JU. 2011. Evolutionary transitions in bacterial symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:10800–10807. doi:10.1073/pnas.1100304108
- Saffo MB. 1992. Invertebrates in endosymbiotic associations. *Integr Comp Biol* **32**:557–565. doi:10.1093/icb/32.4.557
- Sambado S, Salomon J, Crews A, Swei A. 2020. Mixed transmission modes promote persistence of an emerging tick-borne pathogen. *Ecosphere* **11**. doi:10.1002/ecs2.3171
- Samish M, Alekseev E. 2001. Arthropods as predators of ticks (Ixodoidea). *J Med Entomol* **38**:1–11. doi:10.1603/0022-2585-38.1.1
- Samish M, Rehacek J. 1999. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. *Annu Rev Entomol* **44**:159–182. doi:10.1146/annurev.ento.44.1.159
- Sanada-Morimura S, Matsumura M, Noda H. 2013. Male killing caused by a *Spiroplasma* symbiont in the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus*. *J Hered* **104**:821–829. doi:10.1093/jhered/est052
- Sánchez-Vizcaíno JM, Mur L, Bastos ADS, Penrith ML. 2015. New insights into the role of ticks in African swine fever epidemiology. *OIE Rev Sci Tech* **34**:503–511. doi:10.20506/rst.34.2.2375
- Sándor AD, Mihalca AD, Domşa C, Péter Á, Hornok S. 2021. Argasid ticks of palearctic bats: Distribution, host selection, and zoonotic importance. *Front Vet Sci* **8**. doi:10.3389/fvets.2021.684737
- Sandström JP, Russell JA, White JP, Moran NA. 2001. Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids. *Mol Ecol* **10**:217–228. doi:10.1046/j.1365-294X.2001.01189.x
- Sapountzis P, Zhukova M, Shik JZ, Schiott M, Boomsma JJ. 2018. Reconstructing the functions of endosymbiotic mollicutes in fungus-growing ants. *Elife* **7**:1–31. doi:10.7554/eLife.39209
- Sassera D, Beninati T, Bandi C, Bouman EAP, Sacchi L, Fabbi M, Lo N. 2006. 'Candidatus Midichloria mitochondrii', an endosymbiont of the *Ixodes ricinus* with a unique intramitochondrial lifestyle. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**:2535–2540. doi:10.1099/ijs.0.64386-0
- Sassera D, Lo N, Epis S, D'Auria G, Montagna M, Comandatore F, Horner D, Peretó J, Luciano AM, Franciosi F, Ferri E, Crotti E, Bazzocchi C, Daffonchio D, Sacchi L, Moya A, Latorre A, Bandi C. 2011. Phylogenomic

- evidence for the presence of a flagellum and *cbb3* oxidase in the free-living mitochondrial ancestor. *Mol Biol Evol* **28**:3285–3296. doi:10.1093/molbev/msr159
- Schmitt S, Angermeier H, Schiller R, Lindquist N, Hentschel U. 2008. Molecular microbial diversity survey of sponge reproductive stages and mechanistic insights into vertical transmission of microbial symbionts. *Appl Environ Microbiol* **74**:7694–7708. doi:10.1128/AEM.00878-08
- Schroeder J, Reischl U, Lorenzo B. 1997. Ultrastructural and PCR evidence of *Spiroplasma* in human cataract eye lens **32**:1–2.
- Schwartz DJ, Langdon AE, Dantas G. 2020. Understanding the impact of antibiotic perturbation on the human microbiome. *Genome Med* **12**:1–12. doi:10.1186/s13073-020-00782-x
- Seo MGX, Lee SH, Ouh IO, Lee GH, Goo YK, Kim S, Kwon OD, Kwak D. 2016. Molecular detection and genotyping of *Coxiella*-like endosymbionts in ticks that infest horses in south korea. *PLoS One* **11**:1–9. doi:10.1371/journal.pone.0165784
- Sharon G, Segal D, Ringo JM, Hefetz A, Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E. 2010. Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:20051–20056. doi:10.1073/pnas.1009906107
- Shivaprasad A, Shivaprasad HL, Cadenas AFMB, Diab BSS, Nordhausen CR, Bradway DD. 2008. *Coxiella*-like infection in psittacines and a toucan. *Avian Dis* **52**:426–432. doi:10.1637/8192-120707-Reg
- Sicard M, Ferdy JB, Pagès S, Le Brun N, Godelle B, Boemare N, Moullia C. 2004. When mutualists are pathogens: An experimental study of the symbioses between *Steinernema* (entomopathogenic nematodes) and *Xenorhabdus* (bacteria). *J Evol Biol* **17**:985–993. doi:10.1111/j.1420-9101.2004.00748.x
- Šimo L, Kazimirova M, Richardson J, Bonnet SI. 2017. The essential role of tick salivary glands and saliva in tick feeding and pathogen transmission. *Front Cell Infect Microbiol* **7**:1–23. doi:10.3389/fcimb.2017.00281
- Simon JC, Marchesi JR, Mougél C, Selosse MA. 2019. Host-microbiota interactions: From holobiont theory to analysis. *Microbiome* **7**:1–5. doi:10.1186/s40168-019-0619-4
- Siozios S, Gerth M, Griffin JS, Hurst GDD. 2018. Symbiosis: *Wolbachia* host shifts in the fast lane. *Curr Biol* **28**:R269–R271. doi:10.1016/j.cub.2018.02.008
- Sjödín A, Svensson K, Öhrman C, Ahlinder J, Lindgren P, Duodu S, Johansson A, Colquhoun DJ, Larsson P, Forsman M. 2012. Genome characterisation of the genus *Francisella* reveals insight into similar evolutionary paths in pathogens of mammals and fish. *BMC Genomics* **13**. doi:10.1186/1471-2164-13-268
- Skidmore IH, Hansen AK. 2017. The evolutionary development of plant-feeding insects and their nutritional endosymbionts. *Insect Sci* **24**:910–928. doi:10.1111/1744-7917.12463
- Sloan DB, Moran NA. 2012. Endosymbiotic bacteria as a source of carotenoids in whiteflies. *Biol Lett* **8**:986–989. doi:10.1098/rsbl.2012.0664
- Smith TA, Driscoll T, Gillespie JJ, Raghavan R. 2015. A *Coxiella*-like endosymbiont is a potential vitamin

- source for the lone star tick. *Genome Biol Evol* **7**:831–838. doi:10.1093/gbe/evv016
- Sonenshine DE, Roe RM. 2014. Chapter 4. External and internal anatomy of ticks In: Press OU, editor. *Biology of Ticks*, Volume 1.
- Stamatakis A. 2014. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* **30**:1312–1313. doi:10.1093/bioinformatics/btu033
- Sterkel M, Oliveira JHM, Bottino-Rojas V, Paiva-Silva GO, Oliveira PL. 2017. The dose makes the poison: Nutritional overload determines the life traits of blood-feeding arthropods. *Trends Parasitol* **33**:633–644. doi:10.1016/j.pt.2017.04.008
- Stilling RM, Bordenstein SR, Dinan TG, Cryan JF. 2014. Friends with social benefits: Host-microbe interactions as a driver of brain evolution and development? *Front Cell Infect Microbiol* **4**:1–17. doi:10.3389/fcimb.2014.00147
- Stirpe F. 2004. Ribosome-inactivating proteins. *Toxicon* **44**:371–383. doi:10.1007/978-1-59259-896-0_2
- Su Q, Xie W, Wang S, Wu Q, Liu B, Fang Y, Xu B, Zhang Y. 2014. The endosymbiont *Hamiltonella* increases the growth rate of its host *Bemisia tabaci* during periods of nutritional stress. *PLoS One* **9**:1–6. doi:10.1371/journal.pone.0089002
- Sudakaran S, Kost C, Kaltenpoth M. 2017. Symbiont acquisition and replacement as a source of ecological innovation. *Trends Microbiol*. doi:10.1016/j.tim.2017.02.014
- Sulc K. 1910. Pseudovitellus und ähnliche Gewebe der Homopteren sind Wohnstätten symbiotischer Saccharomyceten. *Sitzungsber Bohm Ges Wiss Math Naturwiss Calsse* **3**:1–39.
- Swei A, Kwan JY. 2017. Tick microbiome and pathogen acquisition altered by host blood meal. *ISME J* **11**:813–816. doi:10.1038/ismej.2016.152
- Tabata J, Hattori Y, Sakamoto H, Yukuhiro F, Fujii T, Kugimiya S, Mochizuki A, Ishikawa Y, Kageyama D. 2011. Male-killing and incomplete inheritance of a novel *Spiroplasma* in the moth *Ostrinia zaguliaevi*. *Microb Ecol* **61**:254–263. doi:10.1007/s00248-010-9799-y
- Takiya DM, Tran PL, Dietrich CH, Moran NA. 2006. Co-cladogenesis spanning three phyla: Leafhoppers (Insecta: Hemiptera: Cicadellidae) and their dual bacterial symbionts. *Mol Ecol* **15**:4175–4191. doi:10.1111/j.1365-294X.2006.03071.x
- Theis KR, Dheilly NM, Klassen JL, Brucker RM, Baines JF, Bosch TCG, Cryan JF, Gilbert SF, Goodnight CJ, Lloyd EA, Sapp J, Vandenkoornhuysen P, Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E, Bordenstein SR. 2016. Getting the hologenome concept right: an eco-evolutionary framework for hosts and their microbiomes. *mSystems* **1**:e00028-16. doi:10.1128/mSystems.00028-16
- Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2003. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr Protoc Bioinforma* **2.3.1-2.3.22**. doi:10.1002/0471250953.bi0203s00
- Tian J, Hou X, Ge M, Xu H, Holmes EC, Lei C, Shi M. 2021. The diversity and evolutionary relationships of ticks and tick-borne bacteria in China. *Parasit Vectors* **1**–14. doi:10.1186/s13071-022-05485-3
- Tilak M-K, Allio R, Delsuc F. 2019. An optimized protocol for sequencing mammalian roadkill tissues with Oxford Nanopore Technology (ONT) V.1.

- Tinsley MC, Majerus MEN. 2006. A new male-killing parasitism: *Spiroplasma* bacteria infect the ladybird beetle *Anisosticta novemdecimpunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Parasitology* **132**:757–765. doi:10.1017/S0031182005009789
- Tirloni L, Calvo E, Konnai S, da Silva Vaz I. 2021. Editorial: The role of saliva in arthropod-host-pathogen relationships. *Front Cell Infect Microbiol* **10**:1–4. doi:10.3389/fcimb.2020.630626
- Tokarz R, Lipkin WI. 2021. Discovery and surveillance of tick-borne pathogens. *J Med Entomol* **58**:1525–1535. doi:10.1093/jme/tjaa269
- Tokuda G, Elbourne LDH, Kinjo Y, Saitoh S, Sabree Z, Hojo M, Yamada A, Hayashi Y, Shigenobu S, Bandi C, Paulsen IT, Watanabe H, Lo N. 2013. Maintenance of essential amino acid synthesis pathways in the *Blattabacterium cuenoti* symbiont of a wood-feeding cockroach. *Biol Lett* **9**:3–6. doi:10.1098/rsbl.2012.1153
- Tomassone L, Portillo A, Nováková M, Sousa R De, Oteo JA. 2018. Neglected aspects of tick-borne rickettsioses. *Parasites and Vectors* **11**:1–11. doi:https://doi.org/10.1186/s13071-018-2856-y
- Tsementzi D, Castro Gordillo J, Mahagna M, Gottlieb Y, Konstantinidis KT. 2018. Comparison of closely related, uncultivated *Coxiella* tick endosymbiont population genomes reveals clues about the mechanisms of symbiosis. *Environ Microbiol* **20**:1751–1764. doi:10.1111/1462-2920.14104
- Tsilimigras MCB, Fodor AA. 2016. Compositional data analysis of the microbiome: fundamentals, tools, and challenges. *Ann Epidemiol* **26**:330–335. doi:https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2016.03.002
- Tully JG, Rose DL, Yunker CE, Carle P, Bové JM, Williamson DL, Whitcomb RF. 1995. *Spiroplasma ixodetis* sp. nov., a new species from *Ixodes pacificus* ticks collected in Oregon. *Int J Syst Bacteriol* **45**:23–28. doi:10.1099/00207713-45-1-23
- Tully JG, Whitcomb RF, Rose DL, Bove JM. 1982. *Spiroplasma mirum*, a new species from the rabbit tick (*Haemaphysalis leporispalustris*). *Int J Syst Bacteriol* **32**:92–100. doi:10.1099/00207713-32-1-92
- Tully JG, Yunker CE, Jack C, Whitcomb RF, Williamson DL. 1981. Helical Mycoplasmas (Spiroplasmas) from *Ixodes* ticks. *Science (80-)* **212**:1043–1045.
- Turner TR, James EK, Poole PS. 2013. The plant microbiome. *Genome Biol* **14**:1–10. doi:10.1186/gb-2013-14-6-209
- Uchida T, Uchiyama T, Kumano K, Walker DH. 1992. *Rickettsia japonica* sp. nov., the etiological agent of Spotted fever group rickettsiosis in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* **42**:303–305. doi:10.1099/00207713-42-2-303
- van Nunen SA. 2018. Tick-induced allergies: Mammalian meat allergy and tick anaphylaxis. *Med J Aust* **208**:316–321. doi:10.5694/mja17.00591
- Van Oosten AR, Duron O, Heylen DJA. 2018. Sex ratios of the tick *Ixodes arboricola* are strongly female-biased, but there are no indications of sex-distorting bacteria. *Ticks Tick Borne Dis* **9**:307–313. doi:10.1016/j.ttbdis.2017.11.004
- Vandenkoornhuyse P, Quaiser A, Duhamel M, Le Van A, Dufresne A. 2015. The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytol* **206**:1196–1206. doi:10.1111/nph.13312

- Vapniarsky N, Barr BC, Murphy B. 2012. Systemic *Coxiella*-like infection with myocarditis and Hepatitis in an eclectus parrot (*Eclectus roratus*). *Veterinary Pathol* **49**. doi:10.1177/0300985811409251
- Vavre F, Kremer N. 2014. Microbial impacts on insect evolutionary diversification: From patterns to mechanisms. *Curr Opin Insect Sci* **4**:29–34. doi:10.1016/j.cois.2014.08.003
- Vayssier-Taussat M, Albina E, Citti C, Cosson JF, Jacques MA, Lebrun MH, Le Loir Y, Ogliastro M, Petit MA, Roumagnac P, Candresse T. 2014. Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome new concepts in the light of meta-omics. *Front Cell Infect Microbiol* **5**:1–7. doi:10.3389/fcimb.2014.00029
- Vera-Ponce León A, Dominguez-Mirazo M, Bustamante-Brito R, Higareda-Alvear V, Rosenblueth M, Martínez-Romero E. 2021. Functional genomics of a *Spiroplasma* associated with the carmine cochineals *Dactylopius coccus* and *Dactylopius opuntiae*. *BMC Genomics* **22**:1–17. doi:10.1186/s12864-021-07540-2
- Vial L. 2009. Biological and ecological characteristics of soft ticks (Ixodida: Argasidae) and their impact for predicting tick and associated disease distribution. *Parasite* **16**:191–202. doi:10.1051/parasite/2009163191
- Voordouw MJ. 2015. Co-feeding transmission in Lyme disease pathogens. *Parasitology* **142**:290–302. doi:10.1017/S0031182014001486
- Vuong HE, Yano JM, Fung TC, Hsiao EY. 2017. The microbiome and host behavior. *Annu Rev Neurosci* **40**:21–49. doi:10.1146/annurev-neuro-072116-031347.The
- Wang Y Bin, Ren FR, Yao YL, Sun X, Walling LL, Li NN, Bai B, Bao XY, Xu XR, Luan JB. 2020. Intracellular symbionts drive sex ratio in the whitefly by facilitating fertilization and provisioning of B vitamins. *ISME J* **14**:2923–2935. doi:10.1038/s41396-020-0717-0
- Wang M, Zhu D, Dai J, Zhong Z, Zhang Y, Wang J. 2018. Tissue localization and variation of major symbionts in *Haemaphysalis longicornis*, *Rhipicephalus haemaphysaloides* and *Dermacentor silvarum* in China. *Appl Environ Microbiol*. doi:10.1128/AEM.00029-18
- Wang W, Gu W, Ding Z, Ren Y, Chen J, Hou Y. 2005. A novel *Spiroplasma* pathogen causing systemic infection in the crayfish *Procambarus clarkii* (Crustacea: Decapod), in China. *FEMS Microbiol Lett* **249**:131–137. doi:10.1016/j.femsle.2005.06.005
- Watson RR, Preedy VR. 2016. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. Bioactive foods in health promotion.
- Weckesser S, Hilger C, Lentz D. 2010. Anaphylactic reactions to bites of the pigeon tick *Argas reflexus*. *Eur J Dermatology* **20**:244–245. doi:10.1684/ejd.2010.0886
- Wei N, Cao J, Zhang H, Zhou Y, Zhou J. 2021. The tick microbiota dysbiosis promote tick-borne pathogen transstadial transmission in a *Babesia microti*-infected mouse model. *Front Cell Infect Microbiol* **11**:1–10. doi:10.3389/fcimb.2021.713466
- Weinert LA, Araujo-Jnr E V., Ahmed MZ, Welch JJ. 2015. The incidence of bacterial endosymbionts in terrestrial arthropods. *Proc R Soc B* **282**. doi:10.1098/rspb.2015.0249
- Weiss B, Aksoy S. 2011. Microbiome influences on insect host vector competence. *Trends Parasitol* **27**:514–522. doi:10.1016/j.pt.2011.05.001

- Wernegreen JJ. 2017. In it for the long haul: Evolutionary consequences of persistent endosymbiosis. *Curr Opin Genet Dev* **47**:83–90. doi:10.1016/j.gde.2017.08.006
- Wernegreen JJ. 2012. Endosymbiosis. *Curr Biol* **22**:555–561. doi:10.1016/j.cub.2012.06.010
- Wernegreen JJ. 2002. Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nat Rev Genet* **3**:850–861. doi:10.1038/nrg931
- Whitcomb RF. 1983. Culture media for Spiroplasmas In: Razin S, Tully JG, editors. *Methods in Mycoplasmaology*. pp. 147–158.
- Williams-Newkirk AJ, Rowe LA, Mixson-Hayden TR, Dasch GA. 2014. Characterization of the bacterial communities of life stages of free living lone star ticks (*Amblyomma americanum*). *PLoS One* **9**. doi:10.1371/journal.pone.0102130
- Woc-colburn AM, Garner MM, Bradway D, West G, D'Agostino J, Trupkiewicz J, Barr B, Anderson SE, Rurangirwa FR, Nordhausen RW. 2008. Fatal Coxiellosis in Swainson ' s blue mountain rainbow lorikeets (*Trichoglossus haematodus moluccanus*). *Vet Pathol* **45**:247–254. doi:10.1354/vp.45-2-247
- Wong ZS, Hedges LM, Brownlie JC, Johnson KN. 2011. *Wolbachia*-mediated antibacterial protection and immune gene regulation in *Drosophila*. *PLoS One* **6**:1–9. doi:10.1371/journal.pone.0025430
- Wright CL, Sonenshine DE, Gaff HD, Hynes WL. 2015. *Rickettsia parkeri* transmission to *Amblyomma americanum* by cofeeding with *Amblyomma maculatum* (Acari: Ixodidae) and potential for spillover. *J Med Entomol* **52**:1090–1095. doi:10.1093/jme/tjv086
- Wu-Chuang A, Hodžić A, Mateos-Hernández L, Estrada-Peña A, Obregon D, Cabezas-Cruz A. 2021. Current debates and advances in tick microbiome research. *Curr Res Parasitol Vector-Borne Dis* **1**:100036. doi:10.1016/j.crvpbd.2021.100036
- Xie J, Vilchez I, Mateos M. 2010. *Spiroplasma* bacteria enhance survival of *Drosophila hydei* attacked by the parasitic wasp *Leptopilina heterotoma*. *PLoS One* **5**:1–7. doi:10.1371/journal.pone.0012149
- Yan P, Qiu Z, Zhang T, Li Y, Wang W, Li M, Yu Z, Liu J. 2019. Microbial diversity in the tick *Argas japonicus* (Acari: Argasidae) with a focus on *Rickettsia* pathogens. *Med Vet Entomol* **33**:327–335. doi:10.1111/mve.12373
- Yeoman CJ, Brutscher LM, Esen ÖC, Ibaoglu F, Fowler C, Eren AM, Wanner K, Weaver DK. 2019. Genome-resolved insights into a novel *Spiroplasma* symbiont of the Wheat Stem Sawfly (*Cephus cinctus*). *PeerJ* **7**. doi:10.7717/peerj.7548
- Zélé F, Magalhães S, Kéfi S, Duncan AB. 2018. Ecology and evolution of facilitation among symbionts. *Nat Commun* **9**:4869. doi:10.1038/s41467-018-06779-w
- Zhang X, Norris DE, Rasgon JL. 2011. Distribution and molecular characterization of *Wolbachia* endosymbionts and larial nematodes in Maryland populations of the lone star tick (*Amblyomma americanum*). *FEMS Microbiol Ecol* **77**:50–56. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01089.x
- Zhang XY, Li SS, Chen KL, Yang C, Zhou XJ, Liu JZ, Zhang YK. 2022. Growth dynamics and tissue localization of a *Coxiella*-like endosymbiont in the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Ticks Tick Borne Dis* **13**. doi:10.1016/j.ttbdis.2022.102005

- Zhang YK, Liu JZ. 2019. Maternally inherited symbiotic bacteria in ticks: Incidence and biological importance. *Syst Appl Acarol* **24**:16–32. doi:10.11158/saa.24.1.12
- Zhang YK, Yu ZJ, Wang D, Bronislava V, Branislav P, Liu JZ. 2019. The bacterial microbiome of field-collected *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* from Slovakia. *Parasites and Vectors* **12**:1–10. doi:10.1186/s13071-019-3582-9
- Zhong J, Jasinskas A, Barbour AG. 2007. Antibiotic treatment of the tick vector *Amblyomma americanum* reduced reproductive fitness. *PLoS One* **2**:1–7. doi:10.1371/journal.pone.0000405
- Zhong Z, Zhong T, Peng Y, Zhou X, Wang Z, Tang H, Wang J. 2021. Symbiont-regulated serotonin biosynthesis modulates tick feeding activity. *Cell Host Microbe* **29**:1545-1557.e4. doi:10.1016/j.chom.2021.08.011
- Zhu F, Zhou YK, Ji ZL, Chen XR. 2018. The plant Ribosome-Inactivating Proteins play important roles in defense against pathogens and insect pest attacks. *Front Plant Sci* **9**:1–14. doi:10.3389/fpls.2018.00146
- Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E. 2008. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: The hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol Rev* **32**:723–735. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x
- Zolnik CP, Prill RJ, Falco RC, Daniels TJ, Kolokotronis SO. 2016. Microbiome changes through ontogeny of a tick pathogen vector. *Mol Ecol* **25**:4963–4977. doi:10.1111/mec.13832

Annexes

Annexes liées aux articles préparés et publiés durant la thèse

[1] Annexe de l'article "A dual endosymbiosis drives nutritional adaptation to hematophagy in the invasive tick *Hyalomma marginatum*"

SUPPLEMENTARY FILE 1

A dual endosymbiosis supports nutritional adaptation to hematophagy in the invasive tick *Hyalomma marginatum*

Buysse, Floriano *et al.*

Supplementary File 1a. Summary of the assembly information and quality analyses of the newly sequenced genomes of FLE, *Midichloria* and

Rickettsia bacteria. Only genomes with high completeness are shown and the partial genome of *R. aeschlimanii* (RAES-Hmar-IS) was not presented.

Specimen details			Assembling information									
Genome	Isolate	Origin	Genome size (bp)	Contigs number	N50	L50	Completeness (%)	GC rate (%)	Genes	Pseudogenes	Coding density (%)	Coverage values
<i>Francisella</i> -LE of <i>Hyalomma marginatum</i>	FLE-Hmar-ES	Spain	1510123	17	254696	3	0,9905	31,11	937	795	54	733
<i>Francisella</i> -LE of <i>Hyalomma marginatum</i>	FLE-Hmar-IT	Italy	1510130	13	382079	2	0,9905	31,11	934	789	54	950
<i>Francisella</i> -LE of <i>Hyalomma marginatum</i>	FLE-Hmar-IL	Israel	1536710	25	106485	5	0,9905	31,23	961	798	54	92
<i>Midichloria</i> of <i>Hyalomma marginatum</i>	Midi-Hmar-ES	Spain	1168604	179	19210	20	0,981	35,03	1071	192	78	648
<i>Midichloria</i> of <i>Hyalomma marginatum</i>	Midi-Hmar-IT	Italy	1130547	359	10359	30	0,9524	35,23	1032	192	76	80
<i>Midichloria</i> of <i>Hyalomma marginatum</i>	Midi-Hmar-IL	Israel	1144281	123	12627	30	0,981	35,03	1055	190	79	63
<i>Rickettsia aeschlimanii</i> (of <i>H. marginatum</i>)	RAES-Hmar-IT	Italy	1356794	165	67640	4	0,9429	32,32	1122	475	68	563

Supplementary File 1b. Summary of the information on the NCBI reference genomes employed for the characterization of the FLE and *Midichloria* genomes.

Specimen details					Assembling information			
Genome	Isolate	Origin	Accession number (NCBI/dryad)	Reference	Genome size (bp)	Contigs number	GC rate (%)	Coding density (%)
<i>Francisella</i> -LE of <i>Ornithodoros moubata</i>	FLEOm	Lab colony (Czech Republic)	LVCE00000000	Gerhart et al., 2018	1564190	8	31,7	58
<i>Francisella</i> -LE of <i>Ornithodoros moubata</i>	FOM	Lab colony (France)	QAPC00000000	Duron et al., 2018	1566493	11	31,7	57
<i>Francisella</i> -LE of <i>Amblyomma maculatum</i>	FLEAm	United States of America	LNCT00000000	Gerhart et al., 2018	1556261	7	31,67	57
<i>Francisella</i> -LE of <i>Argas arboreus</i>	<i>F. persica</i> (ATCC VR-331)	Egypt	CP013022	Larson et al., 2016	1540768	1	31,43	69
<i>Francisella</i> -LE of <i>Hyalomma asiaticum</i>	NMGha432	China	doi.org/10.5061/dryad.t76hdr80p	Buyse and Duron, 2021	1550715	38	31,62	58
<i>Francisella</i> -LE of <i>Hyalomma asiaticum</i>	XJHA498	China	doi.org/10.5061/dryad.t76hdr80p	Buyse and Duron, 2021	1549389	39	31,6	58
<i>Francisella tularensis</i> (tularemia agent)	SCHU-S4	United States of America	AJ749949	Larsson et al., 2005	1892775	1	32,26	83
<i>Midichloria</i> of <i>Ixodes ricinus</i>	IricVA	Italy	CP002130	Sassera et al., 2011	1183732	1	36,55	71

Supplementary File 1c. Details regarding symbionts used in phylogenetic analyses of B vitamin biosynthetic pathways and streamlined biotin operon of FLE and *Midichloria*.

Specimen details								Biotin gene origin			
Class	Order	Family	Genus/Species	Strain	Host species	Accession number	Reference	Horizontal transfer	Ancestral		
Gammaproteobacteria	Thiotrichales	Francisellaceae	<i>Francisella</i> -like	FLE-Hmar-IL	Hard tick, <i>Hyalomma marginatum</i> (Israel)	-	This study		Lost		
			<i>Francisella</i> -like	FLE-Hmar-ES	Hard tick, <i>Hyalomma marginatum</i> (Spain)	-	This study		Lost		
			<i>Francisella</i> -like	FLE-Hmar-IT	Hard tick, <i>Hyalomma marginatum</i> (Italy)	-	This study		Lost		
			<i>Francisella</i> -like	NMGha432	Hard tick, <i>Hyalomma asiaticum</i> (China)	-	Buyse and Duron, 2021		+		
			<i>Francisella</i> -like	XJHA498	Hard tick, <i>Hyalomma asiaticum</i> (China)	-	Buyse and Duron, 2021		+		
			<i>Francisella</i> -like	FLEAm	Hard tick, <i>Amblyomma maculatum</i>	LNCT00000000	Gerhart et al., 2018		+		
			<i>Francisella</i> -like	FLEOm	Soft tick, <i>Ornithodoros moubata</i>	LVCE00000000	Gerhart et al., 2018		+		
			<i>Francisella</i> -like	FOm	Soft tick, <i>Ornithodoros moubata</i>	QAPC00000000	Duron et al., 2018		+		
			<i>Francisella</i> -like	<i>F. persica</i>	Soft tick, <i>Argas arboreus</i>	CP013022	Suitor and Weiss, 1961		+		
			Legionellales	Coxiellaceae	<i>Coxiella</i> -like	CRt	Hard tick, <i>Rhipicephalus turanicus</i>	CP011126	Gottlieb et al., 2015		+
					<i>Coxiella</i> -like	CRm	Hard tick, <i>Rhipicephalus microplus</i>	NSHJ01000000	Guizzo et al., 2017		+
					<i>Coxiella</i> -like	CLEAA	Hard tick, <i>Amblyomma americanum</i>	CP007541	Smith et al., 2015		+
					<i>Coxiella</i> -like	CeAS-UFV	Hard tick, <i>Amblyomma sculptum</i>	CP033868	Direct submission on GenBank (Vidigal et al.)		+
					<i>Coxiella burnetii</i>	RSA493	-	AE016828	Seshadri et al., 2003		+
	<i>Legionella polyplacis</i>	PsAG			Louse, <i>Polyplax serrata</i>	CP021497	Řihová et al., 2017		+		
	<i>Legionella pneumophila</i>	Lens		-	CR628337	Cazalet et al., 2004		+			
	Enterobacterales	Morganellaceae		<i>Arsenophonus</i> endosymbiont	CB	Deer ked, <i>Lipoptena fortisetosa</i>	CP013920	Direct submission on GenBank (Novakova et al.)		+	
				<i>Arsenophonus triatominarum</i>	ATi	Kissing bug, <i>Triatoma infestans</i>	LWMI00000000	Direct submission on GenBank (Darby)		+	
				<i>Providencia siddallii</i>	officinalis	Leech, <i>Haementeria officinalis</i>	CVRF00000000	Direct submission on GenBank (Manzano-Marin)		+	
				Erwiniaceae	<i>Buchnera aphidicola</i>	LSR1	Aphid, <i>Acyrtosiphon pisum</i>	ACFK00000000	Direct submission on GenBank (Shigenobu et al.)		+
		<i>Buchnera aphidicola</i>			-	Aphid, <i>Myzus persicae</i>	MJNC00000000	Direct submission on GenBank (Mathers et al.)		+	
		<i>Wigglesworthia glossinidia</i>	Yale colony		Tsetse fly, <i>Glossina morsitans</i>	CP003315	Rio et al., 2012		+		
		<i>Riesia pediculuschaeffi</i>	PTSK	Louse, <i>Pediculus schaeffi</i>	CP012839	Direct submission on GenBank (Boyd)		+			
		Pectobacteriaceae	<i>Sodalis</i> -like endosymbiont	IL	Psyllid, <i>Bactericera trigonica</i>	RBZS00000000	Ghosh et al., 2020		+		
			<i>Sodalis</i> -like endosymbiont	Spu	Cicada, <i>Philaenus spumarius</i>	NKXM00000000	Ankrah et al., 2018		+		

Alphaproteobacteria	Rickettsiales	Midichloriaceae	<i>Midichloria</i>	MID-Hmar-IL	Hard tick, <i>Hyalomma marginatum</i> (Israel)	-	This study	+	
			<i>Midichloria</i>	MID-Hmar-ES	Hard tick, <i>Hyalomma marginatum</i> (Spain)	-	This study	+	
			<i>Midichloria</i>	MID-Hmar-IT	Hard tick, <i>Hyalomma marginatum</i> (Italy)	-	This study	+	
		Rickettsiaceae	<i>Cand. Midichloria mitochondrii</i>	IricVA	Hard tick, <i>Ixodes ricinus</i>	CP002130	Sassera et al., 2011	+	
			<i>Rickettsia buchneri</i>	ISO7	Hard tick, <i>Ixodes scapularis</i>	JFKF00000000	Kurtti et al., 2015	+	
			<i>Rickettsia endosymbiont</i>	REIS	Hard tick, <i>Ixodes scapularis</i>	ACLC00000000	Gillespie et al., 2012	+	
			<i>Rickettsia felis</i>	LSU-Lb	Booklouse, <i>Liposcelis bostrychophila</i>	JSEL00000000	Gillespie et al., 2014	+	
			<i>Rickettsia aeschlimannii</i>	-	-	CCER00000000	Direct submission on GenBank (Urnite platform)	+	
			Anaplasmataceae	<i>Wolbachia</i>	wNleu	Bee, <i>Nomada leucophthalma</i>	LYUV00000000	Direct submission on GenBank (Gerth and Bleidorn)	+
				<i>Wolbachia</i>	wNfla	Bee, <i>Nomada flava</i>	LYUW00000000	Direct submission on GenBank (Gerth and Bleidorn)	+
	<i>Wolbachia</i>	wCle		Bed bug, <i>Cimex lectularius</i>	AP013028	Nikoh et al., 2014	+		
	<i>Wolbachia</i>	wStri		Planthopper, <i>Laodelphax striatellus</i>	MUIX00000000	Ju et al., 2020	+		
	<i>Wolbachia</i>	wLug		Planthopper, <i>Nilaparvata lugens</i>	MUIY00000000	Ju et al., 2020	+		
	<i>Wolbachia</i>	wCfeT		Flea, <i>Ctenocephalides felis</i>	CP051156	Direct submission on GenBank (Driscoll et al.)	+		
	Neorickettsia	<i>Neorickettsia sennetsu</i>	Miyayama	-	CP000237	Dunning Hotopp et al., 2006	+		
		<i>Neorickettsia risticii</i>	Illinois	-	CP001431	Lin et al., 2009	+		
		<i>Neorickettsia helminthoeca</i>	Oregon	Salmonid fish	CP007481	Direct submission on GenBank (Lin et al.)	+		
		<i>Neorickettsia sp.</i>	179522	-	LNGI00000000	Direct submission on GenBank (Mitrevva et al.)	+		
		<i>Ehrlichia ruminantium</i>	Welgevonden	-	CR767821	Collins et al., 2005	+		
		<i>Anaplasma marginale</i>	Florida	-	CP001079	Visser et al., 1992	+		
Deltaproteobacteria		Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	<i>Lawsonia intracellularis</i>	N343	-	CP004029	Sait et al., 2013	+
				<i>Lawsonia intracellularis</i>	PHE/MN1-00	-	AM180252	Direct submission on GenBank (Kaur et al.)	+
	<i>Lawsonia intracellularis</i>			Fu/JPN	-	QNH00000000	Direct submission on GenBank (Nishikawa et al.)	+	
Cytophagales	Amoebophilaceae	<i>Cardinium</i>	cSfur	Planthopper, <i>Sogatella furcifera</i>	CP022339	Direct submission on GenBank (Zeng)	+		
		<i>Cardinium</i>	cEper1	Wasp, <i>Encarsia pergandiella</i>	HE983995	Penz et al., 2012	+		
		<i>Cardinium</i>	cBtQ1	Whitefly, <i>Bemisia tabaci</i>	CBQZ00000000	Santos-Garcia et al., 2014	+		

Supplementary File 1d. Illustrative (non-exhaustive) studies investigating the presence of FLE and *Midichloria* symbionts across *Hyalomma*

tick species. +: presence; -: absence; ND: not determined.

Specimen details		Detection details			Reference
Tick species	Geographic origin	Symbiont presence		Detection method	
		FLE	<i>Midichloria</i>		
<i>Hyalomma aegyptium</i>	Israel	+	-	PCR	Azagi et al., 2017
	Anatolia, Mugla Province	+	ND	Metagenomic analysis	Brinkmann et al., 2019
	Qatar, Doha	ND	+	PCR	Barradas et al., 2020
	Bulgaria	+	ND	PCR	Ivanov et al., 2011
<i>H. anatolicum</i>	Turkey	-	-	PCR	Duron et al., 2017
	Turkey	ND	+	PCR & qPCR	Cafiso et al., 2016
	Pakistan, Punjab Province	+	+	Bacterial barcoding	Adegoke et al., 2020
<i>H. asiaticum</i>	China, Xinjiang Province	+	ND	PCR	Wang et al., 2018
	China	+	-	Metagenomic analysis	Buysse and Duron, 2021
<i>H. dromedarii</i>	Israel	+	ND	PCR	Azagi et al., 2017
	Saudi Arabia	+	ND	PCR	Elbir et al., 2020
	Tunisia, Sousse	ND	+	PCR	Selmi et al., 2019
	Tunisia, Kebili	ND	-	PCR	Selmi et al., 2019
	Egypt	+	ND		Ghoneim et al., 2017
	United Arab Emirates, Al-Ain	+	ND	Bacterial barcoding	Perveen et al., 2020
	Palestine, Jericho	+	-	Metagenomic analysis	Ravi et al., 2018
	Saudi Arabia, Al Hofuf	+	-	PCR & bacterial barcoding	Elbir et al., 2019
	Saudi Arabia, Hail Province	+	-	Bacterial barcoding	Alreshidi et al., 2020
<i>H. excavatum</i>	Israel	+	ND	PCR	Azagi et al., 2017
	Tunisia, Kebili	ND	-	PCR	Selmi et al., 2019
	Turkey, Mecitözü	+	+	PCR	Duron et al., 2017
	Turkey	ND	+	PCR & qPCR	Cafiso et al., 2016

	Egypt	ND	+	Reverse line blotting (RLB)	AL-Hosary et al., 2021
<i>H. impeltatum</i>	Tunisia, Gabes	ND	+	PCR	Selmi et al., 2019
	Tunisia, Sousse	ND	+	PCR	Selmi et al., 2019
	Tunisia, Kebili	ND	-	PCR	Selmi et al., 2019
	Tunisia, Kairouan	ND	-	PCR	Selmi et al., 2019
	Tunisia, Tataouine	ND	-	PCR	Selmi et al., 2019
	Zimbabwe	+	-	PCR	Duron et al., 2017
<i>H. lusitanicum</i>	Spain	+	+	Bacterial barcoding	Díaz-Sánchez et al., 2021
	Canaries, Veneguera	+	-	PCR	Duron et al., 2017
	Spain, Madrid	+	ND	PCR	Lopes de Carvalho et al., 2016
	Portugal	-	ND	PCR	Lopes de Carvalho et al., 2016
<i>H. marginatum</i>	Israel	+	ND	PCR & FISH	Azagi et al., 2017
	Anatolia, Mugla Province	+	ND	Illumina HiSeq sequencing	Brinkmann et al., 2019
	France	+	+	PCR	Duron et al., 2017
	Italy, Sicilia	ND	+	PCR	Epis et al., 2008
	Ventotene Island (Mediterranean Sea)	ND	+	PCR	Di Lecce et al., 2018
	Bulgaria	+	ND	PCR	Ivanov et al., 2011
	Spain, Madrid	-	ND	PCR	Lopes de Carvalho et al., 2016
	Portugal	-	ND	PCR	Lopes de Carvalho et al., 2016
<i>H. rufipes</i>	Israel	+	ND	PCR	Azagi et al., 2017
	China, Gansu Province	-	+	High-throughput sequencing of small RNAs	Luo et al., 2017
	Ethiopia, Didessa Valley	+	ND	PCR	Szigeti et al., 2014
<i>H. truncatum</i>	Namibia	+	ND	PCR	Direct submission on GenBank (JF290387)
	Italy, Sicilia	ND	+	PCR	Epis et al., 2008

Supplementary File 1e. Genes and primers used in this study. Primers were used for qPCR assays conducted for relative quantification of FLE and *Midichloria*.

¹ PCR conditions: primers concentration 150 nM; thermal profile: 95 °C for 3 min, and 40 cycles at 95 °C for 15 sec, 55 °C for 20 sec, 72 °C for 10 sec;

² PCR conditions: primers concentration 250 nM; thermal profile: 95 °C for 3 min, and 40 cycles at 95 °C for 15 sec, 58 °C for 30 sec; ³ PCR

conditions: primers concentration 250 nM; thermal profile: 95 °C for 3 min, and 40 cycles at 95 °C for 15 sec, 58°C for 30 sec.

Gene	Hypothetical product	Primers (5'-3')	Tm (°C)	Fragment size	Reference
<i>Hyalomma marginatum</i>					
<i>cal</i>	Calreticulin	F: TACCTCAAGCTGTTGACTG R: GCCCTTGAGTTGAAGATG	53	F/R: 132 bp ¹	This study
FLE					
<i>rpoB</i>	DNA-directed RNA polymerase beta chain	F: TGTACCTATTGCTACGCCAG R: GCTTACCAGTACGACCATC	58	F/R: 122 bp ²	This study
<i>Midichloria</i>					
<i>gyrB</i>	DNA gyrase B subunit	F: ATTTACATGTCAGGGAGTG R: CTACGAGTTATTGCTGCTC	58	F/R: 155 bp ³	This study

Supplementary references

- Adegoke A, Kumar D, Bobo C, Rashid MI, Durrani AZ, Sajid MS, Karim S. 2020. Tick-borne pathogens shape the native microbiome within tick vectors. *Microorganisms* **8**:1–16. doi:10.3390/microorganisms8091299
- AL-Hosary A, Răileanu C, Tauchmann O, Fischer S, Nijhof AM, Silaghi C. 2021. Tick species identification and molecular detection of tick-borne pathogens in blood and ticks collected from cattle in Egypt. *Ticks Tick Borne Dis* **12**. doi:10.1016/j.ttbdis.2021.101676
- Alreshidi MM, Veettil VN, Noumi E, Del Campo R, Snoussi M. 2020. Description of microbial diversity associated with ticks *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae) isolated from camels in Hail region (Saudi Arabia) using massive sequencing of 16S rDNA. *Bioinformatics* **16**:602–610. doi:10.6026/97320630016602
- Ankrah NYD, Chouaia B, Douglas E. 2018. The cost of metabolic interactions in symbioses between insects and bacteria with reduced genomes. *MBio* **9**:1–15. doi:10.1128/mBio.01433-18
- Azagi T, Klement E, Perlman G, Lustig Y, Mumcuoglu KY, Apanaskevich DA, Gottlieb Y. 2017. *Francisella*-like endosymbionts and *Rickettsia* species in local and imported *Hyalomma* ticks. *Appl Environ Microbiol* **83**:1–14. doi:10.1128/AEM.01302-17
- Barradas PF, Lima C, Cardoso L, Amorim I, Gärtner F, Mesquita JR. 2020. Molecular evidence of *Hemolivia mauritanica*, *Ehrlichia spp.* and the endosymbiont *Candidatus Midichloria mitochondrii* in *Hyalomma aegyptium* infesting *Testudo graeca* tortoises from Doha, Qatar. *animals*. doi:10.3390/ani11010030
- Brinkmann A, Hekimoğlu O, Dinçer E, Hagedorn P, Nitsche A, Ergünay K. 2019. A cross-sectional screening by next-generation sequencing reveals *Rickettsia*, *Coxiella*, *Francisella*, *Borrelia*, *Babesia*, *Theileria* and *Hemolivia* species in ticks from Anatolia.

- Buysse M, Duron O. 2021. Evidence that microbes identified as tick-borne pathogens are nutritional endosymbionts. *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2021.03.053
- Cafiso A, Bazzocchi C, De Marco L, Opara MN, Sasser D, Plantard O. 2016. Molecular screening for *Midichloria* in hard and soft ticks reveals variable prevalence levels and bacterial loads in different tick species. *Ticks Tick Borne Dis* **7**:1186–1192. doi:10.1016/j.ttbdis.2016.07.017
- Cazalet C, Rusniok C, Brüggemann H, Zidane N, Magnier A, Ma L, Tichit M, Jarraud S, Bouchier C, Vandenesch F, Kunst F, Etienne J, Glaser P, Buchrieser C. 2004. Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat Genet* **36**:1165–1173. doi:10.1038/ng1447
- Collins NE, Liebenberg J, De Villiers EP, Brayton KA, Louw E, Pretorius A, Faber FE, Van Heerden H, Josemans A, Van Kleef M, Steyn HC, Van Strijp MF, Zwegarth E, Jongejan F, Maillard JC, Berthier D, Botha M, Joubert F, Corton CH, Thomson NR, Allsopp MT, Allsopp BA. 2005. The genome of the heartwater agent *Ehrlichia ruminantium* contains multiple tandem repeats of actively variable copy number. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:838–843. doi:10.1073/pnas.0406633102
- Di Lecce I, Bazzocchi C, Cecere JG, Epis S, Sasser D, Villani BM, Bazzi G, Negri A, Saino N, Spina F, Bandi C, Rubolini D. 2018. Patterns of *Midichloria* infection in avian-borne African ticks and their trans-Saharan migratory hosts. *Parasites and Vectors* **11**:1–11. doi:10.1186/s13071-018-2669-z
- Díaz-Sánchez S, Fernández AM, Habela MA, Calero-Bernal R, de Mera IGF, de la Fuente J. 2021. Microbial community of *Hyalomma lusitanicum* is dominated by *Francisella*-like endosymbiont. *Ticks Tick Borne Dis* **12**. doi:10.1016/j.ttbdis.2020.101624
- Dunning Hotopp JC, Lin M, Madupu R, Crabtree J, Angiuoli S V., Eisen J, Seshadri R, Ren Q, Wu M, Utterback TR, Smith S, Lewis M, Khouri H, Zhang C, Niu H, Lin Q, Ohashi

- N, Zhi N, Nelson W, Brinkac LM, Dodson RJ, Rosovitz MJ, Sundaram J, Daugherty SC, Davidsen T, Durkin AS, Gwinn M, Haft DH, Selengut JD, Sullivan SA, Zafar N, Zhou L, Benahmed F, Forberger H, Halpin R, Mulligan S, Robinson J, White O, Rikihisa Y, Tettelin H. 2006. Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. *PLoS Genet* **2**:208–223. doi:10.1371/journal.pgen.0020021
- Duron O, Binetruy F, Noel V, Cremaschi J, McCoy K, Arnathau C, Plantard O, Goolsby J, Perez De Leon AA, Heylen DJA, Raoul Van Oosten A, Gottlieb Y, Baneth G, Guglielmono AA, Estrada-Pena A, Opara MN, Zenner L, Vavre F, Chevillon C. 2017. Evolutionary changes in symbiont community structure in ticks. *Mol Ecol* **26**:2905–2921. doi:10.1111/mec.14094
- Duron O, Morel O, Noël V, Buysse M, Binetruy F, Lancelot R, Loire E, Ménard C, Bouchez O, Vavre F, Vial L. 2018. Tick-bacteria mutualism depends on B vitamin synthesis pathways. *Curr Biol* **28**:1–7. doi:10.1016/j.cub.2018.04.038
- Elbir H, Almathen F, Alhumam NA. 2019. A glimpse of the bacteriome of *Hyalomma dromedarii* ticks infesting camels reveals human *Helicobacter pylori* pathogen. *J Infect Dev Ctries* **13**:1001–1012. doi:10.3855/JIDC.11604
- Elbir H, Almathen F, Elnahas A. 2020. Low genetic diversity among *Francisella*-like endosymbionts within different genotypes of *Hyalomma dromedarii* ticks infesting camels in Saudi Arabia. *Vet World* **13**:1462–1472. doi:10.14202/vetworld.2020.1462-1472
- Epis S, Sassera D, Beninati T, Lo N, Beati L, Piesman J, Rinaldi L, McCoy KD, Torina A, Sacchi L, Clementi E, Genchi M, Magnino S, Bandi C. 2008. *Midichloria mitochondrii* is widespread in hard ticks (Ixodidae) and resides in the mitochondria of phylogenetically diverse species. *Parasitology* **135**:485–494. doi:10.1017/S0031182007004052
- Gerhart JG, Auguste Dutcher H, Brenner AE, Moses AS, Grubhoffer L, Raghavan R. 2018.

- Multiple acquisitions of pathogen-derived *Francisella* endosymbionts in soft ticks.
Genome Biol Evol **10**:607–615. doi:10.1093/gbe/evy021
- Ghoneim NH, Abdel-Moein KA, Zaher HM. 2017. Molecular detection of *Francisella* spp. among ticks attached to camels in Egypt. *Vector-Borne Zoonotic Dis* **17**:384–387. doi:10.1089/vbz.2016.2100
- Ghosh S, Sela N, Kontsedalov S, Lebedev G, Haines LR, Ghanim M. 2020. An intranuclear *Sodalis*-like symbiont and *Spiroplasma* coinfect the carrot psyllid, *Bactericera trigonica* (Hemiptera, Psylloidea). *microorganisms* **8**. doi: 10.3390/microorganisms8050692
- Gillespie JJ, Drisco TP, Verhoeve VI, Utsuki T, Husseneder C, Chouljenko VN, Azad AF, MacAluso KR. 2014. Genomic diversification in strains of *Rickettsia felis* isolated from different arthropods. *Genome Biol Evol* **7**:35–56. doi:10.1093/gbe/evu262
- Gillespie JJ, Joardar V, Williams KP, Driscoll T, Hostetler JB, Nordberg E, Shukla M, Walenz B, Hill CA, Nene VM, Azad AF, Sobral BW, Caler E. 2012. A *Rickettsia* genome overrun by mobile genetic elements provides insight into the acquisition of genes characteristic of an obligate intracellular lifestyle. *J Bacteriol* **194**:376–394. doi:10.1128/JB.06244-11
- Gottlieb Y, Lalar I, Klasson L. 2015. Distinctive genome reduction rates revealed by genomic analyses of two *Coxiella*-like endosymbionts in ticks. *Genome Biol Evol* **7**:1779–1796. doi:10.1093/gbe/evv108
- Guizzo MG, Parizi LF, Nunes RD, Schama R, Albano RM, Tirloni L, Oldiges DP, Vieira RP, Oliveira WHC, Leite MDS, Gonzales SA, Farber M, Martins O, Vaz IDS, Oliveira PL. 2017. A *Coxiella* mutualist symbiont is essential to the development of *Rhipicephalus microplus*. *Sci Rep* **7**:1–10. doi:10.1038/s41598-017-17309-x
- Ivanov IN, Mitkova N, Reye AL, Hübschen JM, Vatcheva-Dobrevska RS, Dobрева EG, Kantardjiev T V., Muller CP. 2011. Detection of new *Francisella*-like tick endosymbionts in *Hyalomma* spp. and *Rhipicephalus* spp. (Acari: Ixodidae) from

- Bulgaria. *Appl Environ Microbiol* **77**:5562–5565. doi:10.1128/AEM.02934-10
- Ju JF, Bing XL, Zhao DS, Guo Y, Xi Z, Hoffmann AA, Zhang KJ, Huang HJ, Gong JT, Zhang X, Hong XY. 2020. *Wolbachia* supplement biotin and riboflavin to enhance reproduction in planthoppers. *ISME J* **14**:676–687. doi:10.1038/s41396-019-0559-9
- Kurtti TJ, Felsheim RF, Burkhardt NY, Oliver JD, Heu CC, Munderloh UG. 2015. *Rickettsia buchneri* sp. nov., a rickettsial endosymbiont of the blacklegged tick *Ixodes scapularis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **65**:965–970. doi:10.1099/ijs.0.000047
- Larsson P, Oyston PCF, Chain P, Chu MC, Duffield M, Fuxelius HH, Garcia E, Hälltorp G, Johansson D, Isherwood KE, Karp PD, Larsson E, Liu Y, Michell S, Prior J, Prior R, Malfatti S, Sjöstedt A, Svensson K, Thompson N, Vergez L, Wagg JK, Wren BW, Lindler LE, Andersson SGE, Forsman M, Titball RW. 2005. The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. *Nat Genet* **37**:153–159. doi:10.1038/ng1499
- Lin M, Zhang C, Gibson K, Rikihisa Y. 2009. Analysis of complete genome sequence of *Neorickettsia risticii*: Causative agent of Potomac horse fever. *Nucleic Acids Res* **37**:6076–6091. doi:10.1093/nar/gkp642
- Lopes de Carvalho I, Toledo A, Carvalho CL, Barandika JF, Respicio-Kingry LB, Garcia-Amil C, García-Pérez AL, Olmeda AS, Zé-Zé L, Petersen JM, Anda P, Nuncio MS, Escudero R. 2016. *Francisella* species in ticks and animals, Iberian Peninsula. *Ticks Tick Borne Dis* **7**:159–165. doi:10.1016/j.ttbdis.2015.10.009
- Luo J, Liu MX, Ren QY, Chen Z, Tian ZC, Hao JW, Wu F, Liu XC, Luo JX, Yin H, Wang H, Liu GY. 2017. Micropathogen community analysis in *Hyalomma rufipes* via high-throughput sequencing of small RNAs. *Front Cell Infect Microbiol* **7**:1–12. doi:10.3389/fcimb.2017.00374
- Nikoh N, Hosokawa T, Moriyama M, Oshima K, Hattori M, Fukatsu T. 2014. Evolutionary origin of insect-*Wolbachia* nutritional mutualism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:10257–

10262. doi:10.1073/pnas.1409284111

- Penz T, Schmitz-Esser S, Kelly SE, Cass BN, Müller A, Woyke T, Malfatti SA, Hunter MS, Horn M. 2012. Comparative genomics suggests an independent origin of cytoplasmic incompatibility in *Cardinium hertigii*. *PLoS Genet* **8**. doi:10.1371/journal.pgen.1003012
- Perveen N, Muzaffar S Bin, Vijayan R, Al-Deeb MA. 2020. Microbial communities associated with the camel tick, *Hyalomma dromedarii*: 16S rRNA gene-based analysis. *Sci Rep* **10**:1–11. doi:10.1038/s41598-020-74116-7
- Ravi A, Ereqat S, Al-Jawabreh A, Abdeen Z, Shamma OA, Hall H, Pallen MJ, Nasereddin A. 2018. Metagenomic profiling of ticks: Identification of novel rickettsial genomes and detection of tick borne canine parvovirus. *bioRxiv* 1–19. doi:10.1101/407510
- Říhová J, Novaková E, Husník F, Hypša V. 2017. *Legionella* becoming a mutualist: Adaptive processes shaping the genome of symbiont in the louse *Polyplax serrata*. *Genome Biol Evol* **9**:2946–2957. doi:10.1093/gbe/evx217
- Rio RVM, Symula RE, Wang J, Lohs C, Wu Y neng, Snyder AK, Bjornson RD, Oshima K, Biehl BS, Perna NT, Hattori M, Aksoy S. 2012. Insight into the transmission biology and species-specific functional capabilities of Tsetse (Diptera: Glossinidae) obligate symbiont *Wigglesworthia*. *MBio* **3**:1–13. doi:10.1128/mBio.00240-11
- Sait M, Aitchison K, Wheelhouse N, Wilson K, Lainson FA, Longbottom D, Smith DGE. 2013. Genome sequence of *Lawsonia intracellularis* strain N343, isolated from a sow with hemorrhagic proliferative enteropathy. *Genome Announc* **1**:1–2. doi:10.1128/genomeA.00027-13
- Santos-Garcia D, Rollat-Farnier PA, Beitia F, Zchori-Fein E, Vavre F, Mouton L, Moya A, Latorre A, Silva FJ. 2014. The genome of *Cardinium* cBtQ1 provides insights into genome reduction, symbiont motility, and its settlement in *Bemisia tabaci*. *Genome Biol Evol* **6**:1013–1030. doi:10.1093/gbe/evu077
- Sassera D, Lo N, Epis S, D’Auria G, Montagna M, Comandatore F, Horner D, Peretó J,

- Luciano AM, Franciosi F, Ferri E, Crotti E, Bazzocchi C, Daffonchio D, Sacchi L, Moya A, Latorre A, Bandi C. 2011. Phylogenomic evidence for the presence of a flagellum and *cbb3* oxidase in the free-living mitochondrial ancestor. *Mol Biol Evol* **28**:3285–3296.
doi:10.1093/molbev/msr159
- Selmi R, Ben Said M, Mamlouk A, Ben Yahia H, Messadi L. 2019. Molecular detection and genetic characterization of the potentially pathogenic *Coxiella burnetii* and the endosymbiotic *Candidatus* Midichloria mitochondrii in ticks infesting camels (*Camelus dromedarius*) from Tunisia. *Microb Pathog* **136**:103655.
doi:10.1016/j.micpath.2019.103655
- Seshadri R, Paulsen IT, Eisen JA, Read TD, Nelson KE, Nelson WC, Ward NL, Tettelin H, Davidsen TM, Beanan MJ, Deboy RT, Daugherty SC, Brinkac LM, Madupu R, Dodson RJ, Khouri HM, Lee KH, Carty HA, Scanlan D, Heinzen RA, Thompson HA, Samuel JE, Fraser CM, Heidelberg JF. 2003. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:5455–5460.
doi:10.1073/pnas.0931379100
- Sjödin A, Svensson K, Öhrman C, Ahlinder J, Lindgren P, Duodu S, Johansson A, Colquhoun DJ, Larsson P, Forsman M. 2012. Genome characterisation of the genus *Francisella* reveals insight into similar evolutionary paths in pathogens of mammals and fish. *BMC Genomics* **13**. doi:10.1186/1471-2164-13-268
- Smith TA, Driscoll T, Gillespie JJ, Raghavan R. 2015. A *Coxiella*-like endosymbiont is a potential vitamin source for the lone star tick. *Genome Biol Evol* **7**:831–838.
doi:10.1093/gbe/evv016
- Szigeti A, Kreizinger Z, Hornok S, Abichu G, Gyuranecz M. 2014. Detection of *Francisella*-like endosymbiont in *Hyalomma rufipes* from Ethiopia. *Ticks Tick Borne Dis* **5**:818–820.
doi:10.1016/j.ttbdis.2014.06.002
- Visser ES, McGuire TC, Palmer GH, Davis WC, Shkap V, Pipano E, Knowles DP. 1992. The

Anaplasma marginale msp5 gene encodes a 19-kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infect Immun* **60**:5139–5144. doi:10.1128/iai.60.12.5139-5144.1992

Wang Y, Mao L, Sun Y, Wang Z, Zhang Jiayong, Zhang Jibo, Peng Y, Xia L. 2018. A novel *Francisella*-like endosymbiont in *Haemaphysalis longicornis* and *Hyalomma asiaticum*, China. *Vector-Borne Zoonotic Dis* **18**:669–676. doi:10.1089/vbz.2017.2252

Articles et projets développés annexes à la thèse

[1] Publication d'un article

Titre : Two novel *Rickettsia* species of soft ticks in North Africa: 'Candidatus Rickettsia africaseptentrionalis' and 'Candidatus Rickettsia mauretanic'

Auteurs : Marie Buysse and Olivier Duron

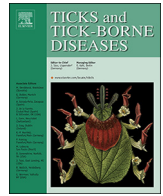
Journal et année : Ticks and Tick-borne Diseases, 2020

Les *Rickettsia* sont des bactéries intracellulaires obligatoires souvent détectées chez les tiques dures, mais plus rarement chez les tiques molles. Dans cette étude, nous avons détecté en Afrique du Nord deux nouvelles espèces de *Rickettsia* dans des espèces de tiques molles du complexe d'espèces *Ornithodoros erraticus*: *O. occidentalis* au Maroc, *O. erraticus* d'Algérie et *O. normandi* en Tunisie. Nous avons caractérisé ces deux nouvelles espèces de *Rickettsia* sur la base d'analyses comparatives de séquences d'ADN et phylogénétiques sur la base de quatre gènes (*gltA*, 16S rRNA, *coxA* et *ompB*). Ces *Rickettsia*, provisoirement nommées "Candidatus Rickettsia africaseptentrionalis" et "Candidatus Rickettsia mauretanic", différaient en séquence nucléotidique de celles des autres espèces de *Rickettsia* de 0,38 à 21,43 % selon le gène examiné. La phylogénétique a également montré que les deux nouvelles espèces de *Rickettsia* sont étroitement proches et représentent des taxons frères de *R. hoogstraalii*, *R. felis* et *R. asembonensis* au sein du groupe des *Rickettsia* transitionnels. Alors que les espèces *Ornithodoros* hôtes de "Candidatus Rickettsia africaseptentrionalis" et "Candidatus Rickettsia mauretanic" sont parmi les tiques molles les plus communes à piquer l'homme, leur pathogénicité reste à déterminer.



Contents lists available at ScienceDirect

Ticks and Tick-borne Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ttbdis

Original article

Two novel *Rickettsia* species of soft ticks in North Africa: ‘*Candidatus Rickettsia africaseptentrionalis*’ and ‘*Candidatus Rickettsia mauretanicus*’

Marie Buysse, Olivier Duron*

Laboratoire Maladies Infectieuses et Vecteurs: Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle (MIVEGEC), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut pour la Recherche et le Développement (IRD), Université de Montpellier (UM), 911 Avenue Agropolis, F-34394, Montpellier, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Soft ticks
Ornithodoros
Rickettsia
North Africa

ABSTRACT

Rickettsia are obligate intracellular bacteria often reported from hard ticks but more rarely from soft ticks. In this study, we detected in Northern Africa two putatively novel *Rickettsia* species in soft tick species of the *Ornithodoros erraticus* complex: *Ornithodoros occidentalis* from Morocco, *Ornithodoros erraticus* from Algeria and *Ornithodoros normandi* from Tunisia. We characterized these two novel *Rickettsia* species on the basis of comparative DNA sequence analyses and phylogenetics of four genes (*gltA*, 16S rRNA, *coxA* and *ompB*). These *Rickettsia*, provisionally named ‘*Candidatus Rickettsia africaseptentrionalis*’ and ‘*Candidatus Rickettsia mauretanicus*’, differed in nucleotide sequence from those of other *Rickettsia* species by 0.38–21.43 % depending on the gene examined. Phylogenetics further showed that the two novel *Rickettsia* species are closely related to each other and represent sister taxa to *R. hoogstraalii*, *R. felis* and *R. asembonensis* within the transitional *Rickettsia* group. While *Ornithodoros* host species of ‘*Candidatus Rickettsia africaseptentrionalis*’ and ‘*Candidatus Rickettsia mauretanicus*’ are among the most common soft ticks to bite humans, their pathogenicity remains to be investigated.

1. Introduction

Members of the genus *Rickettsia* are obligate intracellular bacteria infecting eukaryotes. There are currently more than 30 recognized species but the advent of multilocus sequence typing (MLST) and molecular phylogenetics has recently led to the description of several new putative species (Labruna, 2009; Parola et al., 2005; Weinert, 2015; Weinert et al., 2009). Nowadays, the best known *Rickettsia* species are the causative agents of severe diseases in humans and other mammals, including Rocky Mountain spotted fever and epidemic typhus (Parola et al., 2005; Perlman et al., 2006; Weinert, 2015). These *Rickettsia* species are all associated with blood-feeding arthropods (ticks, mites, lice and fleas) which widely transmit infections to vertebrates. However, not all *Rickettsia* are pathogens since many are exclusively found in arthropods (e.g., ladybirds, spiders and book lice) in which they undergo maternal (transovarial) transmission to offspring (Behar et al., 2010; Gottlieb et al., 2006; Perlman et al., 2006; Weinert et al., 2009), as exemplified with *R. buchneri* in the blacklegged tick *Ixodes scapularis* (Kurtti et al., 2015).

In recent years, *Rickettsia* spp. have been discovered in a diverse range of hosts, but hard ticks (Ixodidae) remain undoubtedly among the main arthropod hosts (Labruna, 2009; Perlman et al., 2006; Weinert

et al., 2015, 2009). By contrast, only a few *Rickettsia* have been reported from few soft ticks (Argasidae): this includes *R. bellii* and *R. hoogstraalii*, which are both regularly identified in *Argas* spp. and *Ornithodoros* spp., but also the *Candidatus R. wissemanni*, *Candidatus R. nicoyana*, *R. lusitaniae*, *R. japonica* strain argasii and undetermined species, which are known only from a few *Ornithodoros* and *Argas* species (Duh et al., 2010; Duron et al., 2018; Hornok et al., 2019; Izzard et al., 2018; Milhano et al., 2014; Moreira-Soto et al., 2017; Sánchez-Montes et al., 2016; Tahir et al., 2016; Yan et al., 2019). In a recent study, Duron et al. (2017) examined a collection of 26 soft tick species and detected infection by *Rickettsia* in one *Argas* and 15 *Ornithodoros* species. While some of these *Rickettsia* infections were not assigned to known species, examination of *gltA* phylogeny showed that most of them were closely related to *R. lusitaniae* and *R. bellii* (Duron et al., 2017).

In this paper, we report the discovery of two putatively new species of *Rickettsia* in nymphs of soft tick species from Northern Africa. All these soft tick species belong to the *O. erraticus* complex, including *O. occidentalis* from Morocco, *O. erraticus* from Algeria and *O. normandi* from Tunisia. All these soft tick species are closely related on a genetic basis (Trape et al., 2013) but their assignment at species level is controversial (Estrada-Peña et al., 2017). Bouattour et al. (2010) produced evidence that *O. erraticus* and *O. normandi* can be differentiated

* Corresponding author.

E-mail address: olivier.duron@ird.fr (O. Duron).<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101376>

Received 27 August 2019; Received in revised form 8 January 2020; Accepted 14 January 2020

1877-959X/ © 2020 Elsevier GmbH. All rights reserved.

morphologically, suggesting that they are different species. However, *O. occidentalis* is currently only described on the basis of a fragment of the mitochondrial 16S rRNA gene (Trape et al., 2013) and validation of this species as a distinct member of the *O. erraticus* complex is still under debate in the absence of specific morphological traits (Estrada-Peña et al., 2017). In this context, we thus provisionally choose to consider these three taxa as distinct members of the *O. erraticus* complex. Using specimens of these taxa, we characterized their *Rickettsia* infections through the sequencing of four genes (*gltA*, *coxA*, *ompB* and 16S rRNA). We further examined their genetic proximity with known *Rickettsia* species and strains under a phylogenetic framework.

2. Materials and methods

2.1. Tick DNA collection

Our preliminary examination of the *gltA* *Rickettsia* sequences obtained from soft ticks by

Duron et al. (2017) showed that six sequences (GenBank accession numbers: *O. erraticus*, KY678045; *O. normandi*, KY678051; *O. occidentalis*, MN906983-MN906986) cannot be assigned to known *Rickettsia* species and strains, as we detailed below in the Results section. These six *gltA* *Rickettsia* sequences were obtained from nymphs of *O. occidentalis* from Morocco (locality Fez, 2010: $n = 3$; locality Taza, 2010: $n = 1$), *O. erraticus* from Algeria (locality Taher, 2010: $n = 1$) and *O. normandi* from Tunisia (locality Bizerte, 2010: $n = 1$). The two most distant localities (Fez and Bizerte) are approximately 1000 km apart. These six nymphs were primarily collected through the examination of rodent burrows (Trape et al., 2013). They were further individually washed in three sterile water baths, air dried and collected in sterile microtubes. DNA was individually crushed by shaking with a bead beater (mixer mill MM301, Qiagen, Hilden, Germany), and then DNA was isolated and purified using the DNeasy Blood and Tissue Extraction Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions as described in Trape et al., 2013. Identifications of these six specimens were previously conducted through morphological and genetic investigations (Trape et al., 2013).

2.2. Molecular typing

DNA templates of the six nymphs mentioned above were used for *Rickettsia* molecular typing. Along with the *gltA* gene already sequenced, we amplified three other genes, 16S rRNA (*rrs*), *coxA*, *ompB* (Table 1). Three of these genes (*gltA*, 16S rRNA and *ompB*) were commonly used for *Rickettsia* multilocus typing (Raoult et al., 2005). Our preliminary attempts to amplify another *Rickettsia* gene marker, *ompA*, failed possibly due to mutations on priming regions. As a result, we

have not included *ompA* in further analyses.

All genes were amplified using semi-nested or nested PCR assays which were efficient at decreasing the probability of contamination from unwanted amplification products (false positives). To prevent possible contamination, different parts of this process were physically separated from one another, in entirely separate rooms. All amplicons were also sequenced to control for false positive amplifications. Gene features, primers and PCR conditions are detailed in Table 1.

Semi-nested and nested PCR amplifications were performed as follows: the first PCR run with the external primers was performed in a 10 μ L volume containing ca. 20 ng of genomic DNA, 3 mM of each dNTP (Thermo Scientific), 8 mM of MgCl₂ (Roche Diagnostics), 3 μ M of each primer, 1 μ L of 10X PCR buffer (Roche Diagnostics), and 0.5 U of Taq DNA polymerase (Roche Diagnostics). A 1 μ L aliquot of the PCR product from the first reaction was then used as a template for the second round of amplification. The second PCR was performed in a total volume of 25 μ L and contained 8 mM of each dNTP (Thermo Scientific), 10 mM of MgCl₂ (ThermoScientific), 7.5 μ M of each of the internal primers, 2.5 μ L of 10X PCR buffer (Thermo Scientific), and 1.25 U of Taq DNA polymerase (Thermo Scientific). All PCR amplifications were performed under the following conditions: initial denaturation at 93 °C for 3 min, 35 cycles of denaturation (93 °C, 30 s), annealing ($T_m = 52$ –56 °C, depending on primers, 30 s), extension (72 °C, 1 min), and a final extension at 72 °C for 5 min. Known positive and negative individuals were used as controls in each PCR assay. All PCR products were visualized with electrophoresis in a 1.5 % agarose gel. Positive PCR products were purified and sequenced in both directions (EUROFINS). The chromatograms were manually inspected and cleaned with CHROMAS LITE (http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html) and sequence alignments were done using CLUSTALW (Thompson et al., 2003), both implemented in MEGA (Tamura et al., 2007). Novel nucleotide sequences have been deposited in the GenBank nucleotide database (Accession numbers: '*Candidatus* *Rickettsia* africaseptentrionalis', 16S rRNA [MN905457-MN905458], *coxA* [MN906981-MN906982] and *ompB* [MN906991-MN906992]; '*Candidatus* *Rickettsia* mauretanicus', *gltA* [MN906983-MN906986], 16S rRNA [MN905453-MN905456], *coxA* [MN906977-MN906980] and *ompB* [MN906987-MN906990]).

2.3. Molecular phylogenetics

The GBLOCKS program (Castresana, 2000) with default parameters was used to remove poorly aligned positions and to obtain unambiguous sequence alignments. All sequence alignments were also checked for putative recombinant regions using the RDP3 computer analysis package (Martin et al., 2010). Given a set of aligned nucleotide sequences, RDP3 can rapidly analyze these with a range of powerful non-parametric recombination detection methods, including the

Table 1
Genes and primers used for *Rickettsia* sequencing.

Gene	Hypothetical product	Primers (5'-3')	T_m	Fragment size	Reference	
16S rRNA	Small ribosomal unit	16S8F 16S1507R R16SF1 R16SR1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG GTGAAGTCGTAACAAGGTA CGTGGAAATCTGCCATCAG GGTGGTYGCGGATCGCAGAG	56 °C	2 fragments from 2 semi-nested PCR assays: 1st round PCR (common): 16S8F/16S1507R: 1511bp 2nd round PCR (fragment 1): 16S8F/R16SR1: 1016bp 2nd round PCR (fragment 2): R16SF1/16S1507R: 1396bp	16S universal bacterial primers and this study
<i>gltA</i>	Citrate synthase	RgltAF1 RgltAF2 RgltAR1	CCTATGGCTATTATGCTTGCGGC GGTTCCTTTCKGCATTTTATCC CTTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATG	56 °C	Semi-nested PCR assay: 1st round PCR: RgltAF1/RgltAR1: 664bp 2nd round PCR: RgltAF2/RgltAR1: 637bp	Duron et al., 2017
<i>ompB</i>	Outer membrane protein	RompBF1 RompBF2 RompBR1 RompBR2	GGCTGGACCTGAAGCTGGAGC GTTGCTGCAGGTGACGAAGCTG GTCCATCTAACTGAGACTGAG GCATCAGGTCCTTATGCTTGCAC	52 °C	Nested PCR assay: 1st round PCR: RompBF1/RompBR2: 834bp 2nd round PCR: RompBF2/RompBR1: 715bp	This study
<i>coxA</i>	Cytochrome C oxydase subunit I	RcoxAF2 RcoxAR1 RcoxAR2	CCYGATATGGCATTTCACGCC ATCGTATGGGCTCACCATATGT AAGCACCGAGCGACATCGTA	55 °C	Semi-nested PCR assay: 1st round PCR: RcoxAF2/RcoxAR2: 886bp 2nd round PCR: RcoxAF2/RcoxAR1: 607bp	This study

Table 2

Sequence profiles of the four genes (16S rRNA, *gltA*, *coxA* and *ompB*) in the three *Rickettsia* genotypes (A–B: ‘*Candidatus Rickettsia africasseptentrionalis*’; C: ‘*Candidatus Rickettsia mauretanicus*’) identified in this study. Letters a–c represent the different alleles at each gene locus. *n*, number of specimens by each *Rickettsia* genotype.

<i>Rickettsia</i> host species (<i>n</i>)	<i>Rickettsia</i> genes				<i>Rickettsia</i> haplotypes
	16S rRNA	<i>gltA</i>	<i>ompB</i>	<i>coxA</i>	
<i>Ornithodoros erraticus</i> (<i>n</i> = 1)	a	a	a	a	A
<i>Ornithodoros normandi</i> (<i>n</i> = 1)	a	b	b	a	B
<i>Ornithodoros occidentalis</i> (<i>n</i> = 4)	c	c	c	c	C

Table 3

Sequence similarity of the 16S rRNA, *gltA*, *coxA* and *ompB* gene sequences of the three *Rickettsia* genotypes (A–B: ‘*Candidatus Rickettsia africasseptentrionalis*’; C: ‘*Candidatus Rickettsia mauretanicus*’) detected in *O. erraticus*, *O. normandi* and *Ornithodoros occidentalis* to those of closely related *Rickettsia* species or *Rickettsia* species of other soft tick species available in GenBank.

Gene	<i>Rickettsia</i> (GenBank accession no.)	% Sequence identity			
		<i>Rickettsia</i> of <i>O. erraticus</i>	<i>Rickettsia</i> of <i>O. normandi</i>	<i>Rickettsia</i> of <i>O. occidentalis</i>	
16S rRNA	<i>R. lusitaniae</i>	–	–	–	
	<i>R. asemonensis</i> (JWSW00000000)	99.39 (1315 of 1323bp)	99.39 (1315 of 1323bp)	99.09 (1311 of 1323bp)	
	<i>R. felis</i> (CP000053)	99.62 (1318 of 1323bp)	99.62 (1318 of 1323bp)	99.31 (1314 of 1323bp)	
	<i>R. hoogstraalii</i> (CCXM00000000)	99.39 (1315 of 1323bp)	99.39 (1315 of 1323bp)	99.09 (1311 of 1323bp)	
	<i>Candidatus R. wissemannii</i> (LT558851)	98.94 (1309 of 1323bp)	98.94 (1309 of 1323bp)	98.63 (1305 of 1323bp)	
	<i>Candidatus R. nicoyana</i> (KX228147)	99.16 (1312 of 1323bp)	99.16 (1312 of 1323bp)	98.86 (1308 of 1323bp)	
	<i>R. japonica</i> strain argasii (LAOQ00000000)	99.16 (1312 of 1323bp)	99.16 (1312 of 1323bp)	98.86 (1308 of 1323bp)	
	<i>R. bellii</i> (CP000849)	99.09 (1311 of 1323bp)	99.09 (1311 of 1323bp)	98.94 (1309 of 1323bp)	
	<i>gltA</i>	<i>R. lusitaniae</i> (JQ771933)	97.96 (577 of 589bp)	97.62 (575 of 589bp)	97.28 (573 of 589bp)
		<i>R. asemonensis</i> (JWSW00000000)	97.28 (573 of 589bp)	96.94 (571 of 589bp)	96.60 (569 of 589bp)
		<i>R. felis</i> (CP000053)	96.43 (568 of 589bp)	96.10 (566 of 589bp)	95.76 (564 of 589bp)
		<i>R. hoogstraalii</i> (CCXM00000000)	96.77 (570 of 589bp)	96.43 (568 of 589bp)	96.10 (566 of 589bp)
<i>Candidatus R. wissemannii</i> (LT558852)		92.36 (544 of 589bp)	92.02 (542 of 589bp)	92.02 (542 of 589bp)	
<i>Candidatus R. nicoyana</i> (KX228143)		92.36 (544 of 589bp)	92.02 (542 of 589bp)	92.02 (542 of 589bp)	
<i>R. japonica</i> strain argasii (LAOQ00000000)		92.02 (542 of 589bp)	91.68 (540 of 589bp)	91.68 (540 of 589bp)	
<i>R. bellii</i> (CP000849)		85.91 (506 of 589bp)	85.74 (505 of 589bp)	85.57 (504 of 589bp)	
<i>ompB</i>		<i>R. lusitaniae</i>	–	–	–
		<i>R. asemonensis</i> (JWSW00000000)	98.07 (659 of 672bp)	97.92 (658 of 672bp)	97.32 (654 of 672bp)
		<i>R. felis</i> (CP000053)	98.07 (659 of 672bp)	97.92 (658 of 672bp)	97.17 (653 of 672bp)
		<i>R. hoogstraalii</i> (CCXM00000000)	98.51 (662 of 672bp)	98.36 (661 of 672bp)	97.62 (656 of 672bp)
	<i>Candidatus R. wissemannii</i> (LT558854)	97.44 (304 of 312bp)	97.12 (303 of 312bp)	97.12 (303 of 312bp)	
	<i>Candidatus R. nicoyana</i>	–	–	–	
	<i>R. japonica</i> strain argasii (LAOQ00000000)	96.28 (647 of 672bp)	96.13 (646 of 672bp)	95.38 (641 of 672bp)	
	<i>R. bellii</i> (CP000849)	78.87 (530 of 672bp)	78.72 (529 of 672bp)	78.57 (528 of 672bp)	
	<i>coxA</i>	<i>R. lusitaniae</i>	–	–	–
		<i>R. asemonensis</i> (JWSW00000000)	96.62 (543 of 562bp)	96.62 (543 of 562bp)	95.91 (539 of 562bp)
		<i>R. felis</i> (CP000053)	95.73 (538 of 562bp)	95.73 (538 of 562bp)	95.02 (534 of 562bp)
		<i>R. hoogstraalii</i> (CCXM00000000)	95.91 (539 of 562bp)	95.91 (539 of 562bp)	95.19 (535 of 562bp)
<i>Candidatus R. wissemannii</i>		–	–	–	
<i>Candidatus R. nicoyana</i>		–	–	–	
<i>R. japonica</i> strain argasii (LAOQ00000000)		90.39 (508 of 562bp)	90.39 (508 of 562bp)	89.68 (504 of 562bp)	
<i>R. bellii</i> (CP000849)		86.83 (488 of 562bp)	86.83 (488 of 562bp)	86.83 (488 of 562bp)	

GENECONV (Sawyer, 1999) and RDP (Martin and Rybicki, 2000). Phylogenetic relationships were evaluated between *Rickettsia* strains using *gltA*, 16S rRNA, *coxA* and *ompB* gene sequences. In addition to the sequences produced in this study, additional *Rickettsia* sequences, representative of the diversity in the genus and available from GenBank, were also used. The evolutionary models most closely fitting the sequence data were determined using Akaike information criterion with the MEGA program (Tamura et al., 2007). Phylogenetic analyses were based on maximum likelihood ML analyses. A ML heuristic search, using a starting tree obtained by neighbor-joining, was conducted and clade robustness was further assessed by bootstrap analysis using 1000 replicates in MEGA (Tamura et al., 2007).

3. Results

3.1. Multilocus typing of *Rickettsia*

The diversity of *Rickettsia* in *O. occidentalis*, *O. erraticus* and *O.*

normandi was examined using *gltA* (589 bp), 16S rRNA (1323 bp), *coxA* (562 bp) and *ompB* (672 bp) gene sequences. The *Rickettsia* 16S rRNA, *coxA* and *ompB* genes were amplified and sequenced here from all tick DNA templates (*n* = 6), while all the *gltA* gene sequences were already available in GenBank from Duron et al. (2017). All sequences were easily readable without double peaks, indicating a confident degree of primer specificity for *Rickettsia* PCR amplifications. All these sequences belong unambiguously to the *Rickettsia* genus as described below.

On the basis of DNA sequences, we characterized one to three distinct alleles depending on the *Rickettsia* gene (Table 2), including three alleles for *gltA* (98.3–99.66 % pairwise nucleotide identity), two for 16S rRNA (99.39 % pairwise nucleotide identity), two for *coxA* (99.29 % pairwise nucleotide identity) and three for *ompB* (98.08–99.68 % pairwise nucleotide identity). Overall, the allelic variation at the five gene markers led to the identification of three different *Rickettsia* genotypes (A, B and C hereafter): the A genotype was found in *O. erraticus* (*n* = 1), the B genotype in *O. normandi* (*n* = 1), while the C genotype was shared by all *O. occidentalis* specimens (*n* = 4) (Table 2). None of

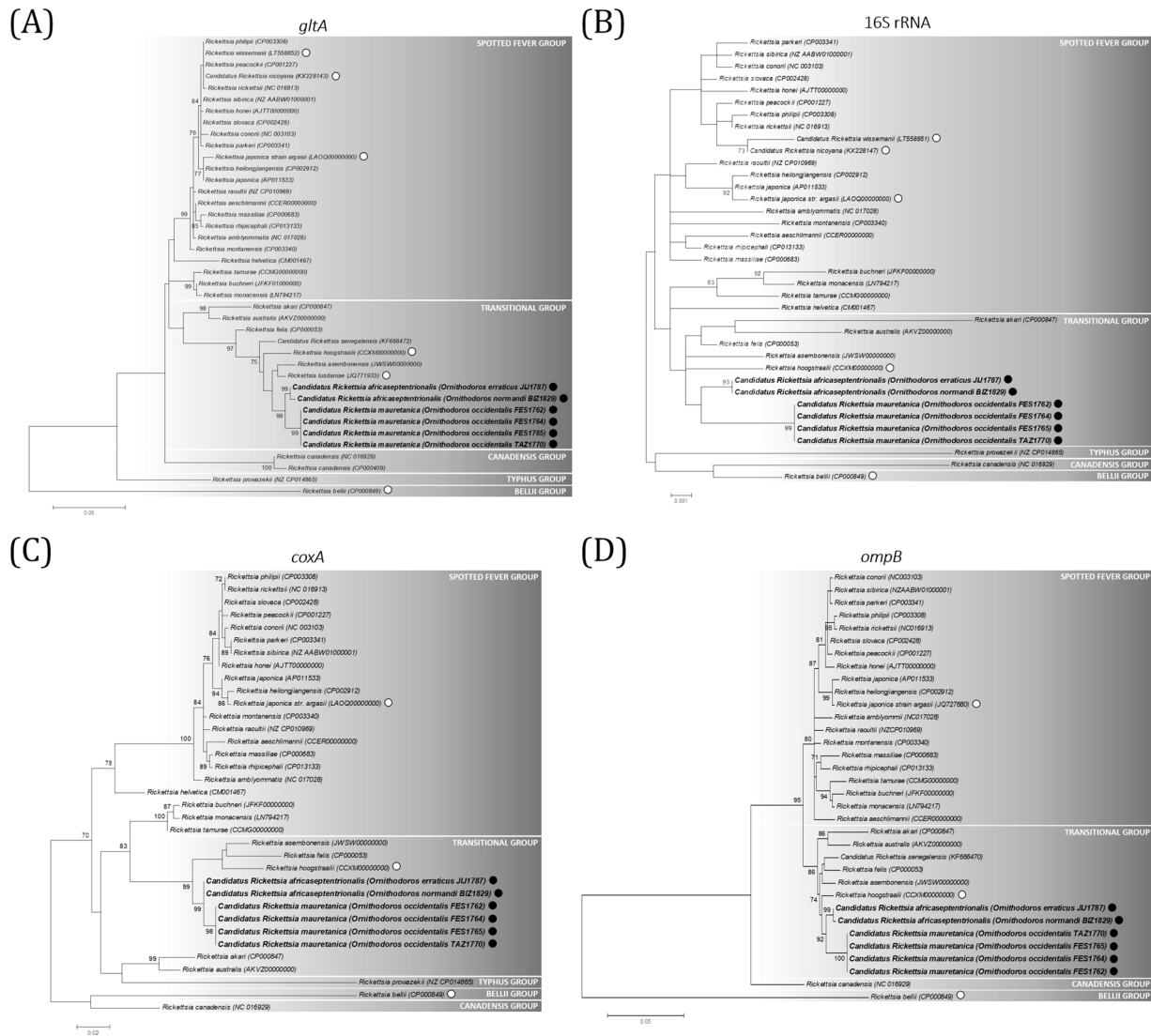


Fig. 1. Phylogeny of *Rickettsia* constructed using maximum-likelihood (ML) estimations based on (A) *gltA* gene sequences (589 unambiguously aligned nucleotide sites; best-fit approximation for the evolutionary model: GTR + G + I); (B) 16S rRNA sequences (1323 unambiguously aligned nucleotide sites; best-fit approximation for the evolutionary model: TN93 + I); (C) *coxA* gene sequences (562 unambiguously aligned nucleotide sites; best-fit approximation for the evolutionary model: GTR + G + I); (D) *ompB* gene sequences (672 unambiguously aligned nucleotide sites; best-fit approximation for the evolutionary model: GTR + G). Circles indicate *Rickettsia* species found in soft ticks (black circles: sequences from *Rickettsia* characterized in this study from *Ornithodoros occidentalis*, *O. erraticus* and *O. normandi*; white circles: sequences from *Rickettsia* characterized from other tick species and available in GenBank). Sequences from representative *Rickettsia* groups, species and strains available in GenBank were also added to the analysis. The grey boxes delineate the different *Rickettsia* groups (their names are indicated in upper case). Bacterial name, host species and GenBank accession numbers are shown on the tree. Branch numbers indicate percentage bootstrap support for major branches (1000 replicates; only bootstrap values > 70 % are shown). The scale bar is in units of substitution/site.

these three genotypes showed 100 % nucleotide identity at the four gene markers with other *Rickettsia* species and strains available in GenBank, including other *Rickettsia* spp. previously documented in soft ticks (i.e., *R. bellii*, *R. hoogstraalii*, *Candidatus R. wissemannii*, *Candidatus R. nicoyana*, *R. japonica* strain *argassii* and *R. lusitaniae*; Table 3). In terms of nucleotide identity, the closest *Rickettsia* species of the A, B and C *Rickettsia* genotypes are *R. felis*, *R. asembonensis*, *R. hoogstraalii*, *R. senegalensis* and *R. lusitaniae*, which all belong to the transitional *Rickettsia* group (Table 3). If compared together, the A, B and C genotypes showed a substantial nucleotide divergence at the four gene sequences examined but they had a better pairwise nucleotide identity with each other than with any other *Rickettsia* species and strains (Table 3). On the basis of the 16S rRNA sequences, the A, B and C genotypes have pairwise nucleotide identities with other *Rickettsia* species and strains always lower to the species “threshold” of 99.8 % proposed for the designation of novel species in the genus (Raoult et al., 2005).

3.2. Phylogenetics of *Rickettsia*

Maximum-likelihood (ML) analyses were further used to examine the evolutionary relationships of the A, B and C *Rickettsia* genotypes of *O. occidentalis*, *O. erraticus* and *O. normandi* with 38 other *Rickettsia* species, including other known *Rickettsia* from soft ticks. We observed no sign of recombination in the data set: (i) the comparison between *Rickettsia gltA*, 16S rRNA, *coxA* and *ompB* single gene phylogenies revealed the same phylogenetic branching (Fig. 1A–D) and (ii) the analysis of concatenated sequences did not detect significant recombination events between the *Rickettsia* sequences used in the ML analyses (all $P > 0.10$ for the GENECONV and RDP recombination-detection tests). The single *gltA*, 16S rRNA, *coxA* and *ompB* gene phylogenies and concatenated phylogeny consistently showed that the A, B and C *Rickettsia* genotypes of *O. occidentalis*, *O. erraticus* and *O. normandi* are markedly divergent to known *Rickettsia* species and strains (Figs. 1A–D

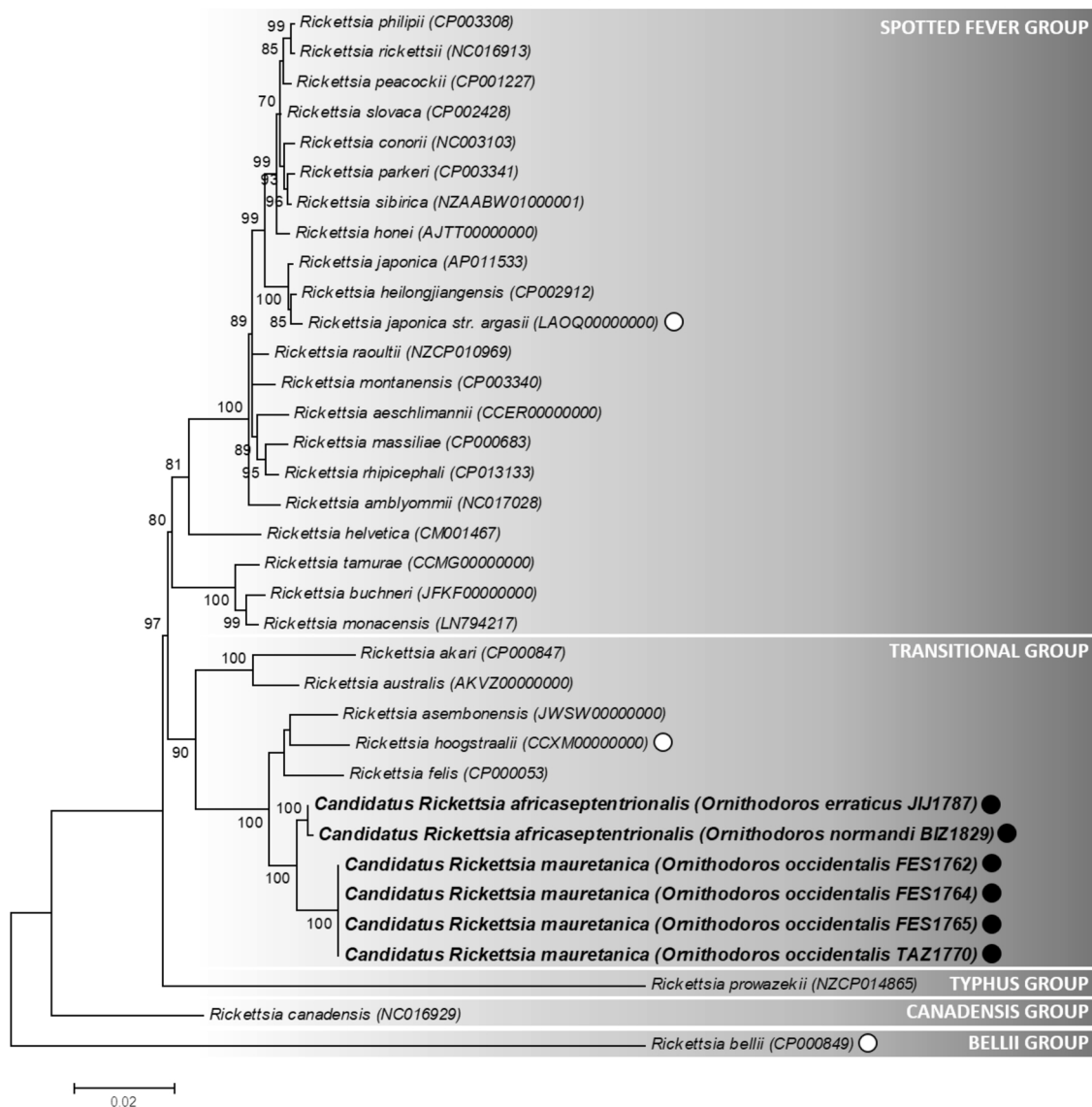
16S rRNA, *gltA*, *ompB* and *coxA*

Fig. 2. Phylogeny of *Rickettsia* constructed using maximum-likelihood (ML) estimations based on concatenated *gltA*, 16S rRNA, *coxA* and *ompB* sequences (3146 unambiguously aligned nucleotide sites; best-fit approximation for the evolutionary model: GTR + G + I). Circles indicate *Rickettsia* species found in soft ticks (black circles: sequences from *Rickettsia* characterized in this study from *Ornithodoros occidentalis*, *O. erraticus* and *O. normandi*; white circles: sequences from *Rickettsia* characterized from other tick species and available in GenBank). Sequences from representative *Rickettsia* groups, species and strains available in GenBank were also added to the analysis. The grey boxes delineate the different *Rickettsia* groups (their names are indicated in upper case). Bacterial name, host species and GenBank accession numbers are shown on the tree. Branch numbers indicate percentage bootstrap support for major branches (1000 replicates; only bootstrap values > 70 % are shown). The scale bar is in units of substitution/site.

and 2). The A and B *Rickettsia* genotypes clustered together, suggesting that they belong to the same species, while the C *Rickettsia* genotype belongs to a distinct, albeit close, species.

The A, B and C *Rickettsia* genotypes are phylogenetically related to but divergent from some other *Rickettsia* species belonging to the transitional phylogenetic group. It clustered within a robust monophyletic clade including other *Rickettsia* species reported from soft ticks, *R. hoogstraalii* and *R. lusitaniae*, and *Rickettsia* reported from fleas, *R. felis*, *R. senegalensis* and *R. asebonensis* (Figs. 1A–D and 2). However, the phylogenetic distance (i.e. the branch length along the gene trees) is always substantial between the A, B and C *Rickettsia* genotypes and all other *Rickettsia* species. Indeed, the phylogenetic distance between the A, B and C *Rickettsia* genotypes and their closest relatives in the transitional phylogenetic group is greater than the distance between most species pairs within the spotted fever group (Fig. 2). As a result, the

phylogenetic distances, along with pairwise nucleotide identities, suggest altogether that the A, B and C *Rickettsia* genotypes are novel species.

4. Discussion

While only a few *Rickettsia* species have been reported from soft ticks (Duh et al., 2010; Duron et al., 2018; Hornok et al., 2019; Izzard et al., 2018; Milhano et al., 2014; Moreira-Soto et al., 2017; Sánchez-Montes et al., 2016; Tahir et al., 2016; Yan et al., 2019), in this study we identified two putatively novel *Rickettsia* species in soft tick *Ornithodoros* species from Northern Africa. Worthy of note is that the proposal of novel *Candidatus Rickettsia* species may be delicate in some cases. Indeed, the primary identification of a novel *Rickettsia* species detected in the soft tick *Argas dewae* was not further validated by

genome analyses: it was rather identified only as a strain of an already recognized *Rickettsia* species, *R. japonica* (Izzard et al., 2018). However, in this study, the typing of four gene fragments fulfills the criteria usually used to designate new *Rickettsia* species (e.g. Anstead and Chilton, 2013; Milhano et al., 2014; Moreira-Soto et al., 2017; Tahir et al., 2016; Turebekov et al., 2019): their allelic profiles, showing a substantial magnitude of difference, are unique relative to all recognized and putative species within the *Rickettsia* genus. Pairwise nucleotide identities and phylogenetic distances both show that these new *Candidatus Rickettsia* species are more distantly related to their closest relatives in the transitional phylogenetic group than most *Rickettsia* species pairs within the spotted fever group. On account of its distinct genetic and phylogenetic traits described, we propose the designation '*Candidatus Rickettsia africaseptentrionalis*' (referring to North Africa where the organism was isolated) for the species found in *O. erraticus* (A *Rickettsia* genotype) and *O. normandi* (B *Rickettsia* genotype), and '*Candidatus Rickettsia mauretanicus*' (referring to Mauritania [a region in the ancient Maghreb during Antiquity] where the organism was isolated) for the species found in *O. occidentalis* (C *Rickettsia* genotype). Interestingly, the MLST data set also indicated the presence of at least two clearly distinct genotypes of '*Candidatus R. africaseptentrionalis*', one present in *O. erraticus* from Algeria and the other in *O. normandi* from Tunisia. These localities are more than 350 km apart, suggesting that a greater diversity of '*Candidatus R. africaseptentrionalis*' genotypes may circulate across North Africa.

The soft ticks *O. occidentalis*, *O. erraticus* and *O. normandi* all belong to the *O. erraticus* species complex (Estrada-Peña et al., 2017; Trape et al., 2013). While small mammals are the most common hosts of these species, they are also among the most common soft ticks to bite humans (Trape et al., 2013). Two of these ticks, *O. occidentalis* and *O. normandi*, are known to be only from North Africa, but *O. erraticus* is more widespread and is reported from many Mediterranean regions, including the Iberian Peninsula in Europe and the Middle East. These *Ornithodoros* species commonly carry the relapsing fever agents *Borrelia crocidurae* and *Borrelia hispanica* and the African swine fever viruses (Boinas et al., 2011; Trape et al., 2013), but they have never been found to carry a pathogenic *Rickettsia*. In this context, whether or not '*Candidatus Rickettsia africaseptentrionalis*' and '*Candidatus Rickettsia mauretanicus*' are potential human pathogens is a question worthy of interest. These two novel species belong to the transitional phylogenetic group of *Rickettsia* and are closely related to *R. asembonensis*: this *Rickettsia* species was described in 2013 in fleas and was later reported in ticks (Troyo et al., 2016). Its pathogenesis in vertebrate hosts is unknown (Jiang et al., 2013). Another close relative is *R. felis* which is the causative agent of flea-borne spotted fever. This cosmopolitan pathogen, first described as a human pathogen from the United States in 1991, is now considered a common cause of fever in Africa (Brown and Macaluso, 2016). However, at least one *R. felis* strain, called LSU, is a non-infectious maternally inherited symbiont inducing parthenogenesis in book lice (Behar et al., 2010; Gillespie et al., 2014). This last example clearly shows that not all *Rickettsia* of the transitional phylogenetic group are pathogens. Because the pathogenicity of '*Candidatus Rickettsia africaseptentrionalis*' and '*Candidatus Rickettsia mauretanicus*' is still unknown, considering these species as important pathogens might be premature. As pointed out by Labruna and Walker (2014), the current view in rickettsiology has a strong anthropocentric bias and tends to describe all novel *Rickettsia* species as pathogenic forms. In many arthropods (e.g., ladybirds, spiders and book lice, but also ticks), *Rickettsia* are non-pathogenic and undergo exclusive maternal transmission to offspring, which functions as both mutualist and reproductive manipulator (Bonnet et al., 2017; Perlman et al., 2006; Weinert, 2015; Weinert et al., 2009). As a result, the putative pathogenicity of '*Candidatus Rickettsia africaseptentrionalis*' and '*Candidatus Rickettsia mauretanicus*' should be the aim of further studies before a definitive decision is reached on this effect.

CRedit authorship contribution statement

Marie Buysse: Methodology, Writing - original draft. **Olivier Duron:** Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

We are grateful to Céline Arnathau, Georges Diatta, Patrick Durand, François Renaud, Jean-François Trape and Laurence Vial for help at different stages of this work. We also acknowledge useful discussions with members of the French group *Tiques et Maladies à Tiques* (TMT). Financial support was provided by recurrent funding from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and Institut de Recherche pour le Développement (IRD).

References

- Anstead, C.A., Chilton, N.B., 2013. A novel *Rickettsia* species detected in vole ticks (*Ixodes angustus*) from Western Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7583–7589. <https://doi.org/10.1128/AEM.02286-13>.
- Behar, A., McCormick, L.J., Perlman, S.J., 2010. *Rickettsia felis* infection in a common household insect pest, *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera: Liposcelidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2280–2285. <https://doi.org/10.1128/AEM.00026-10>.
- Boinas, F.S., Wilson, A.J., Hutchings, G.H., Martins, C., Dixon, L.J., 2011. The persistence of African swine fever virus in field-infected *Ornithodoros erraticus* during the ASF endemic period in Portugal. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020383>.
- Bonnet, S.I., Binetruy, F., Hernandez, A.M., Duron, O., 2017. The tick microbiome: why non-pathogenic microorganisms matter in tick biology and pathogen transmission. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00236>.
- Bouattour, A., Garnier, M., M'Ghirbi, Y., Sarih, M., Gern, L., Ferquel, E., Postic, D., Cornet, M., 2010. *Borrelia crocidurae* infection of *Ornithodoros erraticus* (Lucas, 1849) ticks in Tunisia. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 10, 825–830. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0151>.
- Brown, L.D., Macaluso, K.R., 2016. *Rickettsia felis*, an emerging flea-borne rickettsiosis. *Curr. Trop. Med. Rep.* 3, 27–39. <https://doi.org/10.1007/s40475-016-0070-6>.
- Castresana, J., 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 17, 540–552. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334>.
- Duh, D., Punda-Polic, V., Avsic-Zupanc, T., Bouyer, D., Walker, D.H., Popov, V.L., Jelovsek, M., Gracner, M., Trilar, T., Bradaric, N., Kurtti, T.J., Strus, J., 2010. *Rickettsia hoogstraalii* sp. nov., isolated from hard- and soft-bodied ticks. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 977–984. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.011049-0>.
- Duron, O., Binetruy, F., Noel, V., Cremaschi, J., McCoy, K., Arnathau, C., Plantard, O., Goolsby, J., Perez De Leon, A.A., Heylen, D.J.A., Raoul Van Oosten, A., Gottlieb, Y., Baneth, G., Guglielmo, A.A., Estrada-Peña, A., Opara, M.N., Zenner, L., Vavre, F., Chevillon, C., 2017. Evolutionary changes in symbiont community structure in ticks. *Mol. Ecol.* 26, 2905–2921. <https://doi.org/10.1111/mec.14094>.
- Duron, O., Morel, O., Noël, V., Buysse, M., Binetruy, F., Lancelot, R., Loire, E., Ménard, C., Bouchez, O., Vavre, F., Vial, L., 2018. Tick-bacteria mutualism depends on B vitamin synthesis pathways. *Curr. Biol.* 28, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.04.038>.
- Estrada-Peña, A., Mihalca, A.D., Petney, T.N., 2017. *Ticks of Europe and North Africa: a Guide to Species Identification*.
- Gillespie, J.J., Drisco, T.P., Verhoeve, V.I., Utsuki, T., Husseneder, C., Chouljenko, V.N., Azad, A.F., Macaluso, K.R., 2014. Genomic diversification in strains of *Rickettsia felis* isolated from different arthropods. *Genome Biol. Evol.* 7, 35–56. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu262>.
- Gottlieb, Y., Ghanim, M., Chiel, E., Gerling, D., Portnoy, V., Steinberg, S., Tzuri, G., Horowitz, R.A., Belausov, E., Mozes-daube, N., Kotsedalov, S., Gershon, M., Gal, S., Katzir, N., Zchori-fein, E., 2006. Identification and localization of a *Rickettsia* sp. in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3646–3652. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3646>.
- Hornok, S., Szoke, K., Meli, M.L., Sandor, A.D., Gorfolt, T., Estok, P., Wang, Y., Tu, V.T., Kovats, D., Boldogh, S.A., Corduneanu, A., Sul yok, K.M., Gyurancz, M., Kotschan, J., Takacs, N., Halajian, A., Epis, S., Hofmann-Lehmann, R., 2019. Molecular detection of vector-borne bacteria in bat ticks (Acari: Ixodidae, Argasidae) from eight countries of the Old and New Worlds. *Parasit. Vectors* 12, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3303-4>.
- Izzard, L., Chung, M., Dunning Hotopp, J., Vincent, G., Paris, D., Graves, S., Stenos, J., 2018. Isolation of a divergent strain of *Rickettsia japonica* from Dew's Australian bat Argasid ticks (*Argas (Carios) dewae*) in Victoria, Australia. *Ticks Tick Dis.* 9, 1484–1488. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.07.007>.
- Jiang, J., Maina, A.N., Knobel, D.L., Cleaveland, S., Laudisoit, A., Wamburu, K., Ogola, E., Parola, P., Breiman, R.F., Njenga, M.K., Richards, A.L., 2013. Molecular detection of *Rickettsia felis* and *Candidatus Rickettsia asembonensis* in fleas from human habitats,

- Asembo, Kenya. Vector-Borne Zoonotic Dis. 13, 550–558. <https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1123>.
- Kurtti, T.J., Felsheim, R.F., Burkhardt, N.Y., Oliver, J.D., Heu, C.C., Munderloh, U.G., 2015. *Rickettsia buchneri* sp. nov., a rickettsial endosymbiont of the blacklegged tick *Ixodes scapularis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65, 965–970. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000047>.
- Labruna, M.B., 2009. Ecology of *Rickettsia* in South America. In: Hechemy, K.E., Brouqui, P., Samuel, J.E., Raoult, D.A. (Eds.), Fifth International Conference on Rickettsiae and Rickettsial Diseases. Blackwell Publishing, Marseille, France, pp. 156–165.
- Labruna, M.B., Walker, D.H., 2014. *Rickettsia felis* and changing paradigms about pathogenic Rickettsia. Emerg. Infect. Dis. 20, 1768–1769. <https://doi.org/10.3201/eid2010.131797>.
- Martin, D., Rybicki, E., 2000. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. Bioinformatics 16, 562–563. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.6.562>.
- Martin, D.P., Lemey, P., Lott, M., Moulton, V., Posada, D., Lefevre, P., 2010. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. Bioinformatics 26, 2462–2463. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq467>.
- Milhano, N., Palma, M., Marcili, A., Nuncio, M.S., de Carvalho, I.L., De Sousa, R., 2014. *Rickettsia lusitaniae* sp. nov. isolated from the soft tick *Ornithodoros erraticus* (Acarina: Argasidae). Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 37, 189–193. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2014.01.006>.
- Moreira-Soto, R.D., Moreira-Soto, A., Corrales-Aguilar, E., Calderón-Arguedas, Ó., Troyo, A., 2017. ‘*Candidatus Rickettsia nicoyana*’: a novel *Rickettsia* species isolated from *Ornithodoros knoxjonesi* in Costa Rica. Ticks Tick. Dis. 8, 532–536. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.02.015>.
- Parola, P., Paddock, C.D., Raoult, D., 2005. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. Clin. Microbiol. Rev. 18, 719–756. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.719-756.2005>.
- Perlman, S.J., Hunter, M.S., Zchori-Fein, E., 2006. The emerging diversity of *Rickettsia*. Proc. R. Soc. B 273, 2097–2106. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3541>.
- Raoult, D., Fournier, P.-E., Ereemeeva, M., Graves, S., Kelly, P.J., Oteo, J.A., Sekeyova, Z., Tamura, A., Tarasevich, I., Zhang, L., 2005. Naming of Rickettsiae and rickettsial diseases. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1063, 1–12. <https://doi.org/10.1196/annals.1355.002>.
- Sánchez-Montes, S., Guzmán-Cornejo, C., Martínez-Nájera, Y., Becker, I., Venzal, J.M., Labruna, M.B., 2016. *Rickettsia lusitaniae* associated with *Ornithodoros yumatensis* (Acari: Argasidae) from two caves in Yucatan, Mexico. Ticks Tick. Dis. 7, 1097–1101. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.09.003>.
- Sawyer, S.A., 1999. GENECONV: A Computer Package for the Statistical Detection of Gene Conversion. Available at. Distrib. by author, Dep. Math. Washing. Univ. St. Louis. <http://www.math.wustl.edu/~sawyer>.
- Tahir, D., Socolovschi, C., Marié, Lou, J., Ganay, G., Berenger, J.M., Bompar, J.M., Blanchet, D., Cheuret, M., Mediannikov, O., Raoult, D., Davoust, B., Parola, P., 2016. New *Rickettsia* species in soft ticks *Ornithodoros hasei* collected from bats in French Guiana. Ticks Tick. Dis. 7, 1089–1096. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.09.004>.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24, 1596–1599. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2003. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. Curr. Protoc. Bioinforma. 2 (3), 1–2. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0203s00.3.22>.
- Trape, J.F., Diatta, G., Arnathau, C., Bitam, I., Sarih, M., Belghyti, D., Bouattour, A., Elguero, E., Vial, L., Mané, Y., Baldé, C., Pugnolle, F., Chauvancy, G., Mahé, G., Granjon, L., Duplantier, J.M., Durand, P., Renaud, F., 2013. The epidemiology and geographic distribution of relapsing fever borreliosis in West and North Africa, with a review of the *Ornithodoros erraticus* complex (Acari: Ixodida). PLoS One 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078473>.
- Troyo, A., Moreira-Soto, R.D., Calderon-Arguedas, Ó., Mata-Somarrivas, C., Ortiz-Tello, J., Barbieri, A.R.M., Avendaño, A., Vargas-Castro, L.E., Labruna, M.B., Hun, L., Taylor, L., 2016. Detection of rickettsiae in fleas and ticks from areas of Costa Rica with history of spotted fever group rickettsioses. Ticks Tick. Borne. Dis. 7, 1128–1134. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.08.009>.
- Turebekov, N., Abdiyeva, K., Yegemberdiyeva, R., Dmitrovsky, A., Yeraliyeva, L., Shapiyeva, Z., Amirbekov, A., Oradova, A., Kachiyeva, Z., Ziyadina, L., Hoelscher, M., Froeschl, G., Dobler, G., Zinner, J., Frey, S., Essbauer, S., 2019. Prevalence of *Rickettsia* species in ticks including identification of unknown species in two regions in Kazakhstan. Parasit. Vectors 12, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3440-9>.
- Weinert, L.A., 2015. The diversity and phylogeny of *Rickettsia*. In: Morand, S., Krasnov, B.R., Littlewood, D.T.J. (Eds.), Parasite Diversity and Diversification, Evolutionary Ecology Meets Phylogenetics. University Printing House Cambridge, pp. 150–.
- Weinert, L.A., Werren, J.H., Aebi, A., Stone, G.N., Jiggins, F.M., 2009. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. BMC Biol. 7, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-6>.
- Weinert, L.A., Araujo-Jnr, E.V., Ahmed, M.Z., Welch, J.J., 2015. The incidence of bacterial endosymbionts in terrestrial arthropods. Proc. R. Soc. B 282. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0249>.
- Yan, P., Qiu, Z., Zhang, T., Li, Y., Wang, W., Li, M., Yu, Z., Liu, J., 2019. Microbial diversity in the tick *Argas japonicus* (Acari: Argasidae) with a focus on *Rickettsia* pathogens. Med. Vet. Entomol. 327–335. <https://doi.org/10.1111/mve.12373>.

[2] Publication d'un article

Titre : Vector competence of the African argasid tick *Ornithodoros moubata* for the Q fever agent *Coxiella burnetii*

Auteurs : Marie Buysse, Maxime Duhayon, Franck Cantet, Matteo Bonazzi and Olivier Duron

Journal et année : PLoS Neglected Tropical Diseases, 2021

La fièvre Q est une zoonose très répandue, causée par la bactérie intracellulaire *Coxiella burnetii*. Bien que la transmission soit principalement, mais pas exclusivement, aérienne, il est considéré que les tiques participent à sa transmission sur la base d'études microscopiques. Cependant, des observations récentes ont révélé que des endosymbiotes de tiques ont été couramment mal identifiés comme étant *C. burnetii*, remettant en question l'importance des tiques dans sa transmission. Dans cette étude, nous avons réévalué la compétence vectorielle de la tique molle africaine *Ornithodoros moubata* pour une souche avirulente de *C. burnetii*. A cette fin, nous avons utilisé un système d'alimentation artificiel pour initier l'infection des tiques, des outils moléculaires spécifiques pour suivre les infections et des tests de culture dans des milieux axéniques et cellulaires pour vérifier la viabilité de *C. burnetii* excrété par les tiques. Nous avons observé des traits typiques associés à la compétence vectorielle : (i) l'exposition à un repas de sang infecté a entraîné des infections viables et persistantes chez les tiques, (ii) des transmissions trans-stadiales de l'infection des nymphes aux adultes et (iii) la capacité des tiques adultes à transmettre *C. burnetii*. Cependant, contrairement aux premières études, nous avons constaté que l'infection différait considérablement entre les organes des tiques. De plus, alors que les tiques femelles adultes étaient infectées, nous n'avons pas observé *C. burnetii* dans les œufs, ce qui suggère que la transmission transovarienne n'est pas efficace. Enfin, nous n'avons détecté qu'une présence sporadique d'ADN de *C. burnetii* dans les fèces de tiques, mais aucune bactérie vivante n'a été isolée par la suite dans des essais de culture, ce qui suggère que l'excrétion dans les fèces n'est pas un mode de transmission courant chez *O. moubata*.

RESEARCH ARTICLE

Vector competence of the African argasid tick *Ornithodoros moubata* for the Q fever agent *Coxiella burnetii*

Marie Buysse^{1,2*}, Maxime Duhayon^{3,4}, Franck Cantet⁵, Matteo Bonazzi⁵, Olivier Duron^{1,2*}

1 MIVEGEC (Maladies Infectieuses et Vecteurs: Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut pour la Recherche et le Développement (IRD), Université de Montpellier (UM), Montpellier, France, **2** CREES (Centre de Recherche en Écologie et Évolution de la Santé), Montpellier, France, **3** ASTRE, University of Montpellier, CIRAD, INRAE, Montpellier, France, **4** CIRAD, UMR ASTRE, 34398 Montpellier, France, **5** IRIM, CNRS, Université de Montpellier, Montpellier, France

* marie.buysse@ird.fr (MB); olivier.duron@ird.fr (OD)



OPEN ACCESS

Citation: Buysse M, Duhayon M, Cantet F, Bonazzi M, Duron O (2021) Vector competence of the African argasid tick *Ornithodoros moubata* for the Q fever agent *Coxiella burnetii*. PLoS Negl Trop Dis 15(1): e0009008. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009008>

Editor: Wen-Ping Guo, Chengde Medical University, CHINA

Received: July 16, 2020

Accepted: November 25, 2020

Published: January 6, 2021

Copyright: © 2021 Buysse et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript.

Funding: Financial support was provided by recurrent funding from CNRS (<https://www.cnrs.fr/>) and IRD (<https://www.ird.fr/l-ird/>). The authors received no specific funding for this work.

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

Abstract

Q fever is a widespread zoonotic disease caused by the intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. While transmission is primarily but not exclusively airborne, ticks are usually thought to act as vectors on the basis of early microscopy studies. However, recent observations revealed that endosymbionts of ticks have been commonly misidentified as *C. burnetii*, calling the importance of tick-borne transmission into question. In this study, we re-evaluated the vector competence of the African soft tick *Ornithodoros moubata* for an avirulent strain of *C. burnetii*. To this end, we used an artificial feeding system to initiate infection of ticks, specific molecular tools to monitor further infections, and culture assays in axenic and cell media to check for the viability of *C. burnetii* excreted by ticks. We observed typical traits associated with vector competence: The exposure to an infected blood meal resulted in viable and persistent infections in ticks, trans-stadial transmissions of infection from nymphs to adults and the ability of adult ticks to transmit infectious *C. burnetii*. However, in contrast to early studies, we found that infection differed substantially between tick organs. In addition, while adult female ticks were infected, we did not observe *C. burnetii* in eggs, suggesting that transovarial transmission is not effective. Finally, we detected only a sporadic presence of *C. burnetii* DNA in tick faeces, but no living bacterium was further isolated in culture assays, suggesting that excretion in faeces is not a common mode of transmission in *O. moubata*.

Author summary

The intracellular bacterium *Coxiella burnetii* is the agent of Q fever, a widespread zoonotic disease. Some early detection reports and microscopy studies identified ticks as vectors of Q fever but more recent studies and molecular analyses revealed that endosymbionts of ticks have been commonly misidentified as *C. burnetii*: It raises questions of whether ticks

play an important role in Q fever transmission. In our study, we therefore experimentally re-evaluate the vector competence of the African soft tick *Ornithodoros moubata* for *C. burnetii*. We found that *O. moubata* can be infected by *C. burnetii* after the exposure to an infected blood meal. It resulted in viable and persistent infections in ticks, a trans-stadial transmission and the ability of adult ticks to transmit infection when feeding. Infection was however not transmitted transovarially or by faeces as early reported. Overall, we conclude that *O. moubata* may act as a driver of the transmission and of the spatial dispersal of Q fever among vertebrates where this tick is present in Africa.

Introduction

Q fever (also termed coxiellosis in animals) is a widespread zoonotic disease caused by the intracellular bacterium *Coxiella burnetii* (Legionellales: Coxiellaceae) [1,2]. Cattle, sheep, and goats are most commonly infected and constitute the main reservoirs of *C. burnetii* [3,4]. Infection is also consistently detected in wild fauna, including capybara and sloth that may represent important additional reservoirs in remote tropical regions [5–7]. In animals, infections are usually asymptomatic and are not considered to be a veterinary problem, except in ruminants where coxiellosis is a major cause of abortion and reproductive disorders [4,8]. In humans, *C. burnetii* infections vary from self-limiting to severe [1,2,9]. The acute form of Q fever ranges from causing mild flu-like symptoms to pneumonia or hepatitis, which may require hospitalization. The disease can become chronic and result in premature birth or abortion, chronic fatigue syndrome, endocarditis, as well as aneurysmal, valvular or vascular infections. Sporadic cases in humans occur annually worldwide, but occasional outbreaks are also common [10–12].

Q fever is mainly an airborne zoonosis [13,14]. The common routes of infection are inhalation of contaminated barnyard dust and contact with excreta of infected animals such as birth products, urine, faeces and milk, which all harbour high titres of *C. burnetii*. The bacterium naturally produces spore-like small-cell variants that are able to resist extreme environmental conditions and are thus more likely to persist in the environment for long periods of time [13,14]. Spore-like small-cell variants remain highly infectious in aerosols in a wide range of temperatures, leading to the classification of *C. burnetii* as a category B aerosolized biological weapon [13]. Other infection pathways, including human-to-human contact, exist but they have been observed only in rare cases [13,14].

The importance of ticks in Q fever epidemiology remains debated [15]. Major pioneering studies in the 1930s and 1940s focused on *C. burnetii* infections in ticks [15,16]. In 1937, one of the most virulent reference strains of *C. burnetii* (strain RSA 493 / Nine Mile I) was isolated from a laboratory guinea pig on which field-collected Rocky Mountain wood ticks *Dermacentor andersoni* had fed [16]. At the end of the 1940s, at least seven hard and soft tick species were formally identified as competent vectors of *C. burnetii*: These ticks were able to acquire the bacterium from an infected animal, to maintain infection through trans-stadial transmission from larvae to nymphs or from nymphs to adults, and to transmit infectious *C. burnetii* to an uninfected animal (reviewed in [15]). In these pioneering studies, *C. burnetii* was detected in all major organs, including the midgut, salivary glands, Malpighian tubules, haemolymph, and ovaries, and such a pattern was interpreted as a systemic infection with a transmission through tick bites [15]. Large numbers of *C. burnetii* have been also detected in the body fluids and faeces excreted by ticks, suggesting an additional potential risk posed by tick excreta, through inhalation or direct contact [17]. Other early observations showed that *C. burnetii*

could be maintained by ticks across several generations through transovarial transmission (i.e. from an infected female tick to its offspring) and without needing to infect vertebrates [18–20]. Altogether these case studies suggest that Q fever may be a major tick-borne zoonosis, and today many works in the field largely relate to these past studies [15]. However, recent observations, based on advances in molecular and cell biology, called some of these early results into question [15,21].

Until the late 1990s, *C. burnetii* was essentially screened in ticks using morphological observations, staining, and immunodetection techniques because this intracellular bacterium was notoriously difficult to culture [15,16]. However, in the 2000s, advances in molecular biology and DNA sequencing showed that ticks commonly harbour *Coxiella*-like endosymbionts (*Coxiella*-LE hereafter) that are closely related but genetically distinct to *C. burnetii* [22–26]. These *Coxiella*-LE are almost exclusively confined to ticks and, according to current knowledge, they pose a much lower infection risk to vertebrates compared with *C. burnetii* [15,21]. Extensive molecular surveys have consistently revealed that *Coxiella*-LE, and not *C. burnetii*, predominate in most tick species investigated thus far, with at least two thirds of tick species being naturally infected [22,24–28]. Most importantly, *Coxiella*-LE have been commonly misidentified as *C. burnetii*: The historic and dogmatic assertion that over 40 tick species are infected by *C. burnetii* (as deduced from early microscopic surveys) has been re-evaluated and most of the *Coxiella* strains initially visually identified as *C. burnetii* could be reclassified as *Coxiella*-LE [15]. The case studies on vector competence of ticks, their systemic infections by *C. burnetii* and transovarial transmission have become unreliable: Recent studies using DNA-based methods have found that the tick species used in the old literature actually harbour *Coxiella*-LE, or in certain cases other intracellular bacteria that may have been misidentified as *C. burnetii* [15,21]. However, the risk of misidentification still exist: several *C. burnetii* detection methods are in use, but many are not efficient enough to clearly distinguish between *C. burnetii* and *Coxiella*-LE [15,29,30]. Over the last decades, many studies aiming to estimate *C. burnetii* prevalence in ticks have used ambiguous typing methods, and may have continued to misidentify *Coxiella*-LE as *C. burnetii* [15]. To date, only few studies produced clear evidence that field ticks are infected by *C. burnetii* [15].

Today, ticks are still the focus of many field studies of Q fever epidemiology. There is no doubt that ticks may be infected by *C. burnetii* in nature since several strains have been successfully isolated from wild ticks [15]. In recent years, remarkable progress has been made in designing new molecular techniques to detect *C. burnetii*, but with variable success [15]. Some techniques, based on DNA sequencing, allow for the unambiguous distinction between *C. burnetii* and *Coxiella*-LE [25,27], but others, such as those based on the detection of the IS1111 genetic element (present in *C. burnetii* and some *Coxiella*-LE), are not reliable for diagnosis in ticks [29,30]. Only few recent studies have produced clear and unambiguous evidence that ticks can carry *C. burnetii* [15]. In the noteworthy case study by Pacheco et al. [31], a natural *C. burnetii* infection in *Amblyomma* spp. ticks was confirmed through diverse detection methods, including haemolymph tests, isolation in Vero cells, and multilocus DNA sequencing. In a recent experimental infection study, Körner et al. [32] showed that the European hard ticks *Ixodes ricinus* and *Dermacentor marginatus* can be infected following an infected blood meal and further excrete infectious *C. burnetii* in faeces. However, *C. burnetii* was not detected in the blood used for feeding of infected *I. ricinus* and *D. marginatus* specimens [32]. This notably suggests that transmission by ticks could occur by inhalation of faeces containing infectious *C. burnetii* rather than by tick bites.

In this study, we re-evaluate the vector competence of the African soft tick *Ornithodoros moubata* for an avirulent strain of *C. burnetii*. This tick species is widespread in East Africa and is the vector of relapsing fever in humans and of African swine fever in pigs. In this region, the presence of Q fever has been known for over 60 years, where it remains a neglected

zoonosis [33,34]. Most notably, the transmission routes have not been clearly established, while Q fever consistently accounts for cases of human febrile illness and infective endocarditis in Africa [33,34]. In an early study published in 1943, *O. moubata* was found to transmit infectious *C. burnetii* to Guiana pigs through biting [20]. Recent surveys showed that *O. moubata* was infected not by *Coxiella*-LE, but by an intracellular bacterium, a *Francisella*-like endosymbiont (*Francisella*-LE; Thiotrichales: Francisellaceae) [35]. This endosymbiont is an obligate nutritional mutualist required for survival and reproduction of *O. moubata* since it synthesizes B vitamins that are deficient in the blood meal of ticks [35]. *Francisella*-LE is naturally present in all *O. moubata* specimens and maternally transmitted to all maturing tick oocytes [35]. Here, we experimentally examined the ability of *O. moubata* to acquire *C. burnetii* from an infected blood meal, the trans-stadial transmission of infection from nymphs to adults and the ability to further transmit infectious *C. burnetii* through faeces and bites. To this aim, we combined (i) an artificial feeding system to infect ticks in controlled experimental conditions with (ii) specific molecular tools to quantify *C. burnetii* infections and to avoid misidentification with other microorganisms present in ticks and with (iii) axenic and cellular cultures to check for the viability of *C. burnetii* excreted by ticks. We also examined the molting and mortality rates of ticks to assess whether *C. burnetii* infection is deleterious to their vectors. We further characterized the abundance of *C. burnetii* within the tick tissues, and investigated whether the infection could be transovarially transmitted through tick generations.

Methods

Ethics statement

Tick feeding and manipulation were performed in a Biosafety Level 2 insectarium according to the regulations established by the Ethical and Animal Welfare Committee of the institution where the experiments were conducted (CIRAD, Montpellier, France), complying with the European legislation. During the experiment, blood was taken from cows sheltered in the CIRAD animal facility according to a protocol approved under number APAFIS#1445-2015081217184829v2 by the French Ministry of Research. All cultivations of *C. burnetii* were carried out under Biosafety Level 2 laboratory conditions at IRIM (Montpellier, France).

Ticks and housing conditions

All ticks used in this study came from an *O. moubata sensu stricto* laboratory colony (Neuchâtel strain) initiated from field specimens collected in Southern Africa and maintained in the CIRAD insectary, Montpellier, France [35]. Ticks were maintained in the laboratory at 26°C with 80–90% relative humidity under complete darkness. The life cycle of *O. moubata* includes one larval stage, three to five nymphal stages, and the adult stage with a longevity of several years. A blood meal made of heparinized cow blood was offered to ticks at least every 7 weeks using an artificial feeding system as follows: Ticks were allowed to feed on blood through a parafilm membrane using a specific apparatus including three parts: (i) A tick chamber closed on top by a nylon cloth to avoid tick escape and closed below by the parafilm membrane, (ii) a blood chamber containing a magnet, and (iii) a hot magnetic steering device to mix and warm blood at 38°C. With this method, all the ticks used in the present experiments successfully fed at all stages. After feeding, each batch of ticks was kept in separate plastic containers until the next feeding.

Cultivation of *Coxiella burnetii*

We used a transposon mutant of Nile Mile RSA439 (phase II, clone 4) (NMIIC4) of *C. burnetii* [36]. This strain is avirulent in mammalian but not in arthropod models as further described.

This phase II *C. burnetii* clone primarily originates from spontaneous mutations after several *in vitro* passages of extremely virulent phase I *C. burnetii* and present a truncated lipopolysaccharide (LPS) [37]. These non-reversible mutations result in a strong attenuation of virulence but phase II *C. burnetii* are internalized more efficiently than phase I organisms by host cells and replicate then with similar kinetics than phase I [37]. The phase II *C. burnetii* remains yet virulent to some arthropods as it kills larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella* [36]. The NMIIC4 clone has been authorized for biosafety level 2 (BSL-2) manipulation and represents a convenient model to study *C. burnetii* infections [36].

We used in this study an eGFP-expressing, chloramphenicol-resistant NMIIC4 *C. burnetii* strain (Tn1832 strain) previously obtained by transposon insertion [36]. The transposon insertion is located at bp 1,776,921 of *C. burnetii* NMII genome, corresponding to an intergenic region between the genes *cbu1847b* and *cbu1849* (encoding for hypothetical proteins) and does not disrupt any bacterial function [36]. This *C. burnetii* strain was cultivated in the axenic medium ACCM2 supplemented with chloramphenicol (3 µg/ml) and incubated in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 2.5% O₂ at 37°C. Living *C. burnetii* obtained from this axenic medium (ACCM2) culture were used to initiate infections in ticks.

***Coxiella burnetii* infections in ticks and post-infection rearing**

Fourth-instar nymphs of *O. moubata* were randomly allocated to one of two batches: one exposed to infectious *C. burnetii* (infected batch), and another not exposed to *C. burnetii* (control batch). All specimens were subsequently fed on the same heparinized cow blood pack using an artificial feeding system. For the infected treatment batch, living *C. burnetii* obtained from an axenic culture were added to the blood meal at a final concentration of 5.10^{-4} bacteria/mL. For the control batch, nothing was added to the blood meal. After feeding, each batch of ticks was kept in separate plastic containers stored under standard housing conditions until the molting of nymphs to adults. A second blood meal was then provided to a random subsample of adults from each batch. No *C. burnetii* was added in this second blood meal, meaning that ticks from the infected treatment batch were exposed only once to *C. burnetii* (i.e. during the first blood meal). Engorged adult ticks were allowed to mate, and females were further allowed to lay eggs in individual vials. Samples of all heparinized cow blood packs were examined before and after the blood meal to control for the presence of *C. burnetii*.

DNA isolation and detection of *Coxiella burnetii*

DNA was extracted from blood samples and from the whole body, dissected organs, eggs and faeces of ticks using a DNA extraction kit according to the manufacturer's instructions (QIAGEN). Before extraction, faeces were solubilized into a standardized volume of phosphate-buffered saline solution (PBS 1X). To eliminate external (i.e. cuticular) contamination, ticks and eggs tick specimens were surface cleaned with bleach before DNA extraction following an existing protocol [28]. Tick organs (salivary glands, gut, Malpighian tubule system, and ovaries/testes) were dissected with sterile blades and forceps under microscopic observation and rinsed with sterile saline solution before a transfer to the QIAGEN lysis buffer.

Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was further used to check for the presence and the titration of *C. burnetii*. qPCR was performed with a LightCycler 480 (Roche) using the SYBR Select Master Mix (Thermo Scientific). For tick specimens or organs, two PCRs were performed: one was specific for the bacterial *egfp* gene, and the other was specific for the *O. moubata* *OmAct2* gene (Table 1). Assuming that both genes are present in a single copy per haploid genome of *C. burnetii* and *O. moubata*, the ratio between *egfp* and *OmAct2* concentrations provides the number of *C. burnetii* genomes relative to the number of *O.*

Table 1. Genes and primers used in this study. Nested PCR and qPCR assays were conducted for detection, titration, and typing of *Coxiella burnetii*.

Gene	Hypothetical product	Primers (5'-3')	Tm	Fragment size	Reference
<i>Ornithodoros moubata</i>					
<i>OmAct2</i>	Actin	Omou-actqF2 Omou-actqR1	60°C	qPCR assay: Orni_act2_qF/Orni_act2_qR: 140bp	[35]
<i>Coxiella burnetii</i>					
<i>egfp</i>	Enhanced green fluorescent protein	Coxbur-GFPqF2 Coxbur-GFPqR2	60°C	qPCR assay: Coxbur-GFPqF2/Coxbur-GFPqR2: 124bp	This study
<i>Coxiella</i>					
<i>rpoB</i>	DNA-directed RNA polymerase beta chain	CoxrpoB_F2 CoxrpoB_R1 CoxrpoB_F3 CoxrpoB_R3	56°C	Nested PCR assay: 1st round PCR: CoxrpoBF2/CoxrpoBR1: 610bp 2nd round PCR: CoxrpoBF3/CoxrpoBR3: 542bp	[25]

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009008.t001>

moubata genomes, thus correcting for tick size or tick organ size. Each DNA template was analyzed in triplicate for *egfp* and *OmAct2* quantification. Standard curves were plotted using dilutions of a pEX-A2 vector (Eurofins) containing one copy of each of the *egfp* and *OmAct2* gene fragments. For faeces and blood samples, only the qPCR specific for the bacterial *egfp* gene was performed, as described above.

Independent nested PCR assays for *C. burnetii* identification were also performed with the same DNA templates by amplifying the *Coxiella rpoB* gene fragment using specific primers (Table 1). The first PCR round was performed in a 10- μ L volume containing 20–50 ng of DNA, 1.25 mM of each dNTP (Thermo Scientific), 7.5 mM of MgCl₂ (Roche Diagnostics), 3 μ M of each external primer, 1 μ L of 10X PCR buffer (Roche Diagnostics), and 0.5 U of Taq DNA polymerase (Roche Diagnostics). A 1- μ L aliquot of the PCR product from the first reaction was then used as a template for the second round of amplification. The second PCR round was performed in a 25- μ L volume containing 3 mM of each dNTP (Thermo Scientific), 18.75 mM of MgCl₂ (Roche Diagnostics), 7.5 μ M of each internal primer, 2.5 μ L of 10X PCR buffer (Roche Diagnostics), and 1.25 U of Taq DNA polymerase (Roche Diagnostics). PCR amplifications were performed under the following conditions: initial denaturation at 84°C for 3 min, 35 cycles of denaturation (94°C, 30 s), annealing (T_m = 56°C, 30 s), extension (72°C, 1 min), and a final extension at 72°C for 3 min. Known positive and negative individuals were used as controls in each PCR assay. All PCR products were visualized via electrophoresis in a 1.5% agarose gel. Positive *rpoB* PCR products were purified and sequenced in both directions (Eurofins). Sequence chromatograms were manually cleaned with CHROMAS LITE (http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html), and alignments were performed using CLUSTALW, implemented in the MEGA software [38].

Amplification of *Coxiella burnetii* from blood and infection assay

We examined the viability of *C. burnetii* excreted by ticks as follows. Samples were haemolysed in distilled water and 2 mL was inoculated in 10 ml of ACCM2 and incubated in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 2.5% O₂ at 37°C. One week after inoculation, samples were re-inoculated in fresh ACCM2 and the replication of eGFP-expressing *C. burnetii* was monitored

over time for 6 days via fluorescence microscopy. Bacteria were then collected by centrifugation at 1940 x g for 45 min, resuspended in DMEM supplemented with 10% foetal calf serum and used to infect human U2OS cells (this cell line is widely used in biomedical research and has high infection efficiencies by *C. burnetii* [39]). Cells were centrifuged for 10 min at 110 x g and incubated in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. Intracellular bacterial replication was monitored over time via fluorescence microscopy. At 7 days post-infection, cells were fixed in 4% (wt/vol) paraformaldehyde in PBS solution at room temperature for 20 min. Samples were then rinsed in PBS solution and incubated in blocking solution (0.5% BSA, 50 mM NH₄Cl in PBS solution, pH 7.4). Subsequently, cells were incubated with an anti-LAMP1 antibody (Sigma) diluted in blocking solution for 1 h at room temperature, rinsed five times in PBS solution, and further incubated for 1 h with the secondary antibodies diluted in the blocking solution. Coverslips were mounted by using Fluoromount mounting medium (Sigma) supplemented with Hoechst 33258 for DNA staining. In all cases, images were acquired using an EVOS inverted fluorescence microscope (Thermo Scientific).

Statistical analyses

Analyses were carried out using the R statistical package (v3.6.2) and the lme4 package [40]. The *C. burnetii* load was analyzed using linear mixed-effects models after applying a log-transformation. The proportion of infected organs was analyzed using generalized mixed-effects models and a binomial distribution. To build models, organs (midgut/salivary glands/Malpighian tubules/carcass/reproductive organs) and sex (female/male) were fitted as fixed explanatory variables, while tick specimens were fitted as a random effect. The maximal model, including all higher-order interactions, was simplified by sequentially eliminating interactions and non-significant terms to establish a minimal model. A likelihood ratio test (LRT) (using a chi-square distribution and a *p*-value cut-off of 0.05) was performed to establish the difference between sequential models. To refine analyses, post hoc analyses were performed to establish significant differences between organ types.

Results

Coxiella burnetii infections in ticks

We provided a blood meal to 30 fourth-instar nymphs of *O. moubata* reared in the same standard laboratory conditions. No *C. burnetii* DNA was detected through qPCR in the blood prior to the experiment. For 20 nymphs, *C. burnetii* from an axenic culture was administered with the blood meal (infected batch), while for the 10 other nymphs, no bacterium was added (control batch). All the nymphs (*n* = 30) fully engorged in 1 h and were placed in separate plastic containers. Over the next 7 weeks, the exposure to *C. burnetii* did not affect the survival and molting of the ticks: All the nymphs of the infected batch survived and molted to adults (*n* = 20). None showed apparent physical abnormality and disease symptoms. All the ticks of the control batch also survived and molted to adults (*n* = 10). By the seventh week, all ticks had digested a large portion of their previous blood and produced abundant faeces.

Seven weeks after feeding, a subsample of *O. moubata* adults (four from the control batch and eight from the infected batch; *n* = 12) were analyzed by qPCR for infection. None of the *O. moubata* adults from the control batch was infected by *C. burnetii*, whereas all of the eight adults (four females and four males) from the infected batch were infected. Interestingly, qPCR also revealed variation of *C. burnetii* abundance between tick tissues (Fig 1). Indeed, *C. burnetii* was detected in the midgut of all adults, in the salivary glands of five of eight adults, in the Malpighian tubules of two of eight adults, in the reproductive organs of two of eight adults (i.e. in the ovaries of one of four females and the testes of one of four males) and in the rest of

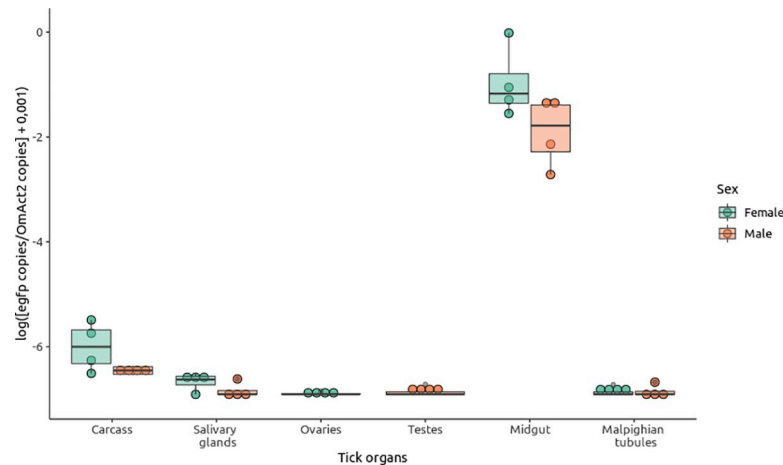


Fig 1. *Coxiella burnetii* according to sex and organ in *Ornithodoros moubata* ticks. Infection densities in males ($n = 4$, orange circles and boxplots) and females ($n = 4$, green circles and boxplots) were quantified by using the ratio of bacterial *egfp* gene copies per tick *OmAct2* gene copy and represented as the logarithm values ($\times + 0.001$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009008.g001>

body of all eight adults. The prevalence of *C. burnetii* in these organs was determined mainly by the organ type ($\chi^2 = 25.237$, $p = 5.10^{-5}$) and was independent of specimen sex ($\chi^2 = 0.7153$, $p = 0.40$). When considering the bacterial load, both organ type ($\chi^2 = 80.87$, $p = 2.2.10^{-16}$) and sex ($\chi^2 = 4.0093$, $p = 0.04525$) affected the density of *C. burnetii*. Thus, the density of *C. burnetii* in female organs was higher than in male organs (Fig 1). The density of *C. burnetii* was 277–2304 times higher in the midgut than in any of the other organs, both for male and female ticks. With the exception of the midgut, pairwise comparisons showed that the density of *C. burnetii* in salivary glands was 1.8–2.7 times higher than in reproductive organs and Malpighian tubules (post hoc analysis, $\chi^2 = 4.0613$, $p = 0.044$ and $\chi^2 = 0.4643$, $p = 0.496$, respectively) but 3.024 times lower than in the rest of body (post hoc analysis, $\chi^2 = 6.7787$, $p = 0.009$) (Fig 1).

Excretion of *Coxiella burnetii* in tick faeces

Faeces of *O. moubata* were collected 7 weeks after feeding and assayed for the presence of *C. burnetii* (one faeces sample per tick). qPCR was negative for all samples collected from the control batch ($n = 4$). By contrast, qPCR revealed the presence of *C. burnetii* DNA in the faeces of two of twelve adults. The number of *C. burnetii* DNA copies in these two faeces samples was estimated to 2 372 and 11 880, respectively. However, we were unable to cultivate *C. burnetii* from faeces samples of infected ticks ($n = 10$), suggesting that they are not infectious.

Transmission of *Coxiella burnetii* through tick bites

The efficiency of transmission of *C. burnetii* through tick bites was evaluated 7 weeks after the initial feeding. To this end, an additional blood meal without *C. burnetii* was provided to adults of the infected batch ($n = 8$) and of the control batch ($n = 4$). qPCR validated the absence of *C. burnetii* DNA in the blood prior to the experiment. Following the experiment, qPCR did not reveal the presence of *C. burnetii* in the blood of feeding units on which infected and control ticks fed. However, when all blood samples on which infected ticks fed were used to inoculate ACCM2, viable eGFP-expressing *C. burnetii* were readily amplified (Fig 2A). By contrast, no positive culture was obtained from ACCM2 inoculated with blood on which control ticks fed. Importantly, eGFP-expressing *C. burnetii* isolated from blood samples on which infected ticks

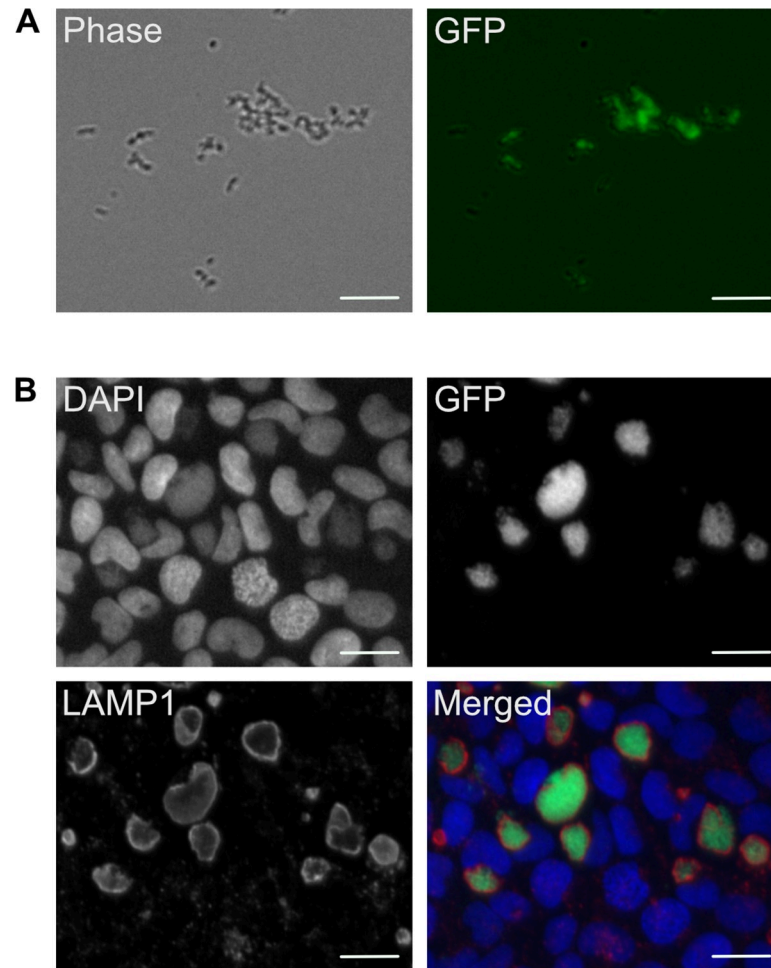


Fig 2. A. eGFP-expressing *C. burnetii* amplified from ACCM2 culture broth inoculated with samples from the second blood meal on which infected ticks fed. B. U2OS cells challenged with eGFP-expressing *C. burnetii* amplified as described in A were fixed and processed for immunofluorescence 6 days post-infection. Scale bars are 20 μm (A) and 10 μm (B).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009008.g002>

fed were effectively internalized by U2OS human epithelial cells upon infection, and developed the typical, LAMP1-positive intracellular replicative vacuole (Fig 2B).

Transovarial transmission of *Coxiella burnetii* in ticks

Ten weeks after the exposure to *C. burnetii*, four gravid females of the infected batch laid eggs that we collected to formally assess the efficiency of *C. burnetii* transovarial transmission. Examination of the four females through qPCR showed that they were all positive for *C. burnetii* DNA. We further examined pools of 20 eggs per clutch (four pools, 80 eggs in total), and further screened for *C. burnetii* DNA by qPCR. No egg pool was found positive for infection. Four additional egg pools (80 eggs in total) were also used in axenic and cell cultures, but none was positive for *C. burnetii*.

Discussion

In this study, we re-evaluated the transmission of *C. burnetii* in ticks, using the African soft tick *O. moubata* as model species. Observations of the three major traits related to vector

competence show a very efficient transmission of *C. burnetii* by *O. moubata*: (i) The exposure to an infected blood meal consistently resulted in viable infection in all tick specimens examined. Infections remain detectable at least 10 weeks after the blood meal, showing that ticks can maintain *C. burnetii* over long periods. (ii) A trans-stadial transmission of infection from nymphs to adults was observed in all infected specimens. (iii) *O. moubata* retained the ability to transmit infectious *C. burnetii* when feeding. Altogether, this corroborates an early observation of *C. burnetii* transmission by *O. moubata* based on microscopy [20]. However, qPCR revealed that infection was not systemic, with substantial differences between tick organs. While adult female ticks were infected, we also did not observe *C. burnetii* in eggs, suggesting that transovarial transmission is not efficient. Finally, both qPCR and culture assays showed that excretion in faeces is not an efficient mode of transmission in *O. moubata*.

Further observations showed that *C. burnetii* did not impact tick survival and molting to adulthood. This tolerance to infection may thus enhance the transmission risk by ticks over a large part of their lifespan. However, this tolerance to infection is actually not widespread in arthropods, since the avirulent Nine Mile phase II strain of *C. burnetii* (the same strain used in the present study) is also known to efficiently kill larvae of the greater wax moth, *G. mellonella*, in only a few days [36]. The *G. mellonella* moth is not a natural vector of *C. burnetii* but it is now used as an alternative model of infection: Infected specimens exhibit very similar cellular symptoms to those observed in infected vertebrates [36]. The fact that ticks and not *G. mellonella* are tolerant to *C. burnetii* may highlight pivotal biological differences between these arthropods. Indeed, recent observations showed that intracellular tick-borne pathogens modulate tick physiology and tick cell processes, including immunity and apoptosis, leading to tolerance of intracellular infections [41]. A similar modulation of *O. moubata* metabolism by *C. burnetii* may thus take place, not impacting tick survival and subsequently enhancing their vector competence. Obviously, more tick species are competent vectors of Q fever, as recently confirmed with two hard tick species of major medical and veterinary importance in Western Europe, *I. ricinus* and *D. marginatus* [32]. Of all the tick species examined thus far, only two, the soft ticks *O. gurneyi* and *O. turicata*, have been experimentally shown to be incompetent vectors [42,43]. Consequently, diverse tick species could be competent vectors for *C. burnetii*, at least in experimental systems.

Examination of infected *O. moubata* specimens showed that infection was not systemic: *C. burnetii* was largely detected in the midgut, to a lesser extent in the salivary glands and in the body, but only occasionally in the Malpighian tubules and reproductive organs. This pattern revealed that *C. burnetii* can cross the epithelium gut barrier and further colonize different tick organs. However, such infection pattern radically differs from early microscopy observations that consistently reported on systemic infections with high densities in Malpighian tubules and ovaries (reviewed in [15]). These contrasting results can be explained if endosymbionts of ticks, such as *Coxiella*-LE and *Francisella*-LE, were misidentified as *C. burnetii*. These endosymbionts are remarkably abundant in two organs of ticks: ovaries, which is consistent with their vertical transmission into developing oocytes, and Malpighian tubules, where B vitamins are possibly synthesized [35,44–46]. Since these endosymbionts of ticks are also intracellular with a roughly similar morphology to *C. burnetii*, the potential of misidentification is high without the use of molecular markers. Similar findings may explain why we did not observe any evidence of transovarial transmission whereas early microscopy studies did: Endosymbionts are maternally inherited, often in >90% of the progeny, and, as such, abundant in tick eggs [35,44–46] where they may have been misidentified as *C. burnetii*. To date, there is no molecular evidence of *C. burnetii* transovarial transmission in ticks: This suggests that maintenance of *C. burnetii* in tick populations cannot be possible without infectious transmission from vertebrates.

The most significant mechanism of *C. burnetii* transmission by *O. moubata* is salivary excretion during feeding, as typically observed for many other intracellular tick-borne pathogens. The detection of *C. burnetii* in salivary glands of some *O. moubata* specimens, and the isolation of viable *C. burnetii* from blood on which infected ticks fed, corroborate this hypothesis. However, the mechanism of transmission seems variable between tick species. Early microscopy studies found that ticks excrete large numbers of *C. burnetii* in faeces (up to 10^{10} bacteria per gram of faeces [17]); however, as discussed above, these bacteria could instead be endosymbionts. Our molecular assays detected *C. burnetii* DNA only in few faeces samples, and when present, the number of *C. burnetii* DNA copies was relatively low. Subsequent culture surveys of *O. moubata* faeces also failed to amplify *C. burnetii*, suggesting it is not a significant mechanism of transmission in this tick species and that only circulating *C. burnetii* DNA are excreted through faeces. Conversely, transmission through faeces (and not through biting) is efficient by *I. ricinus* and *D. marginatus*, as shown with the excretion of infectious *C. burnetii* in this way [32]. Biological dissimilarities between tick species could explain such variations in transmission mechanism: Indeed, soft ticks (Argasidae: *O. moubata*) and hard ticks (Ixodidae: *I. ricinus*, *D. marginatus*) differ in their feeding and digestive features [47]. Soft ticks are rapid feeders, ingesting a moderate amount of blood and further digesting only a portion of the blood meal as needed. This probably contributes to their ability to live for relatively long periods without an additional blood meal [47]. Hard ticks are slow feeders, ingesting a very large amount of blood and further digesting the entire blood meal. These biological dissimilarities may thus explain why *I. ricinus* and *D. marginatus*, and not *O. moubata*, excrete *C. burnetii* in their faeces.

As we used a phase II *C. burnetii* clone, some comment on the true infectious risk of these bacteria is appropriate. Given that phase II *C. burnetii* is an attenuated virulent form [37], it is likely that the infectious behaviour of isogenic phase I and phase II bacteria could be different in ticks. However, phase II *C. burnetii* is also internalized by host cells and replicate then with similar kinetics than phase I [37], and this explain why we observed a transmission of viable phase II *C. burnetii* able to infect human cells in laboratory conditions. Importantly, phase II *C. burnetii* is not avirulent: larvae of the *G. mellonella* moth are susceptible to phase II *C. burnetii* infections, as they showed typical cellular symptoms and died rapidly [36]. That ticks, and not the *G. mellonella* moth, are tolerant to infections showed that virulence in arthropods is not associated with *C. burnetii* phases. Furthermore, our investigations on phase II *C. burnetii* in *O. moubata* may also explain some differences with previous studies that only used phase I *C. burnetii*. However, Köner et al. [32] also used a phase II *C. burnetii* clone in *I. ricinus* and *D. marginatus* and observed a transmission through faeces that we did not observed in *O. moubata*. This showed that *C. burnetii* phases cannot explain all the differences reported by previous studies.

This study provides evidence that the African soft tick *O. moubata* is a competent vector of *C. burnetii*. However, Q fever is probably far more frequently transmitted through the airborne route than through ticks. Field surveys consistently showed that vector capacity (i.e. the transmission potential of a vector population in field conditions) of ticks in the field remains low: Only few unambiguous cases of natural *C. burnetii* infections in ticks exist [6,31]. Nevertheless, ticks may act as major drivers of the transmission and spatial dispersal of Q fever among vertebrates: Ticks can parasitize a broad diversity of hosts that potentially disperse over large distances on them. Ticks can also survive several months, or years depending on the species, off their vertebrate hosts and thus constitute substantial reservoirs of *C. burnetii* infections across time. Several pivotal traits of *C. burnetii* infections in ticks remain to be investigated; this includes the potential of *C. burnetii* to modulate tick metabolism and to enhance its tolerance, or the mechanisms driving variations of transmission between tick species. In this context,

comparative taxonomic approaches will be highly valuable in enhancing our understanding of the epidemiology of Q fever in ticks.

Acknowledgments

We are grateful to K. Huber and L. Vial for facilitating access to CIRAD tick rearing facilities. We also acknowledge useful discussions with members of the working group Tiques et Maladies à Tiques (TMT) from the Réseau Ecologique des Interactions Durables (REID).

Author Contributions

Conceptualization: Matteo Bonazzi, Olivier Duron.

Formal analysis: Marie Buysse, Franck Cantet, Matteo Bonazzi, Olivier Duron.

Investigation: Marie Buysse, Maxime Duhayon, Franck Cantet, Matteo Bonazzi, Olivier Duron.

Methodology: Marie Buysse, Maxime Duhayon, Franck Cantet, Matteo Bonazzi, Olivier Duron.

Project administration: Marie Buysse, Maxime Duhayon, Franck Cantet, Matteo Bonazzi, Olivier Duron.

Resources: Maxime Duhayon, Franck Cantet, Matteo Bonazzi.

Supervision: Matteo Bonazzi, Olivier Duron.

Validation: Marie Buysse, Maxime Duhayon, Franck Cantet, Matteo Bonazzi, Olivier Duron.

Writing – original draft: Marie Buysse, Matteo Bonazzi, Olivier Duron.

Writing – review & editing: Marie Buysse, Maxime Duhayon, Franck Cantet, Matteo Bonazzi, Olivier Duron.

References

1. Parker NR, Barralet JH, Bell AM. Q fever. *Lancet*. 2006; 367: 679–688. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68266-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68266-4) PMID: [16503466](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16503466/)
2. Tissot-Dupont H, Raoult D. Q fever. *Infect Dis Clin North Am*. 2008; 22: 505–514. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2008.03.002> PMID: [18755387](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18755387/)
3. Guatteo R, Seegers H, Taurel AF, Joly A, Beaudeau F. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: A critical review. *Vet Microbiol*. 2011; 149: 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.10.007> PMID: [21115308](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21115308/)
4. Van den Brom R, van Engelen E, Roest HIJ, van der Hoek W, Vellema P. *Coxiella burnetii* infections in sheep or goats: An opinionated review. *Vet Microbiol*. 2015; 181: 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.011> PMID: [26315774](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26315774/)
5. Christen J-R, Edouard S, Lamour T, Martinez E, Rousseau C, de Laval F, et al. Capybara and brush cutter involvement in Q fever outbreak in remote area of Amazon Rain Forest, French Guiana, 2014. *Emerg Infect Dis*. 2020; 26: 993–997. <https://doi.org/10.3201/eid2605.190242> PMID: [32310064](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32310064/)
6. Davoust B, Marié J Lou, Pommier de Santi V, Berenger JM, Edouard S, Raoult D. Three-toed sloth as putative reservoir of *Coxiella burnetii*, Cayenne, French Guiana. *Emerg Infect Dis*. 2014; 20: 1760–1761. <https://doi.org/10.3201/eid2010.140694> PMID: [25271976](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25271976/)
7. Gardon J, Héraud J, Laventure S, Ladam A, Capot P, Fouquet E, et al. Suburban transmission of Q fever in French Guiana: Evidence of a wild reservoir. *J Infect Dis*. 2001; 184: 278–284. <https://doi.org/10.1086/322034> PMID: [11443552](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11443552/)
8. Agerholm JS. *Coxiella burnetii* associated reproductive disorders in domestic animals—a critical review. *Acta Vet Scand*. 2013; 55: 13. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-13> PMID: [23419216](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23419216/)

9. Wegdam-Blans MCA, Kampschreur LM, Delsing CE, Bleeker-Rovers CP, Sprong T, Van Kasteren MEE, et al. Chronic Q fever: Review of the literature and a proposal of new diagnostic criteria. *J Infect*. 2012; 64: 247–259. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2011.12.014> PMID: [22226692](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22226692/)
10. Van Der Hoek W, Morroy G, Renders NHM, Wever PC, Hermans MHA, Leenders ACAP, et al. Epidemic Q fever in humans in the Netherlands. *Adv Exp Med Biol*. 2012; 984: 329–364. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4315-1_17 PMID: [22711640](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22711640/)
11. Epelboin L, Chesnais C, Boullé C, Drogoul AS, Raoult D, Djossou F, et al. Q fever pneumonia in French Guiana: Prevalence, risk factors, and prognostic score. *Clin Infect Dis*. 2012; 55: 67–74. <https://doi.org/10.1093/cid/cis288> PMID: [22441648](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22441648/)
12. Amitai Z, Bromberg M, Bernstein M, Raveh D, Keysary A, David D, et al. A large Q fever outbreak in an urban school in Central Israel. *Clin Infect Dis*. 2010; 50: 1433–1438. <https://doi.org/10.1086/652442> PMID: [20415568](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20415568/)
13. Madariaga MG, Rezai K, Trenholme GM, Weinstein RA. Q fever: A biological weapon in your backyard. *Lancet Infect Dis*. 2003; 3: 709–721. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(03\)00804-1](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(03)00804-1) PMID: [14592601](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14592601/)
14. Hazards EP on B. Scientific opinion on Q fever. *EFSA J*. 2010; 8: 1–114. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1595>
15. Duron O, Sidi-boumedine K, Rousset E, Moutailler S, Jourdain E. The importance of ticks in Q fever transmission: What has (and has not) been demonstrated? *Trends Parasitol*. 2015; 31: 536–552. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.06.014> PMID: [26458781](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26458781/)
16. McDade JE. Historical aspects of Q fever. CRC Press. In: Marrie T.J. ed., editor. *Q fever (Vol 1: The Disease)*. CRC Press. 1990. pp. 5–22.
17. Philip CB. Observations on experimental Q fever. *J Parasitol*. 1948; 34: 457–464. PMID: [18099928](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18099928/)
18. Parker RR, Davis GE. A filter-passing infectious agent isolated from ticks. II. Transmission by *Derma-centor andersoni*. *Public Health Rep*. 1938; 53: 2267–2270.
19. Smith DJW. Studies in the epidemiology of Q fever. 3. Transmission of Q fever by the tick *Haemaphysalis humerosa*. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 1940; 103–118.
20. Davis GE. American Q fever: Experimental transmission by the argasid ticks *Ornithodoros moubata* and *O. hermsi*. *Public Heal Rep*. 1943; 58: 984–987.
21. Duron O, Doublet P, Vavre F, Bouchon D. The importance of revisiting Legionellales diversity. *Trends Parasitol*. 2018; 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.09.008> PMID: [30322750](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30322750/)
22. Machado-Ferreira E, Vizzoni VF, Balsemao-Pires E, Moerbeck L, Gazeta GS, Piesman J, et al. *Coxiella* symbionts are widespread into hard ticks. *Parasitol Res*. 2016; 115: 4691–4699. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5230-z> PMID: [27595990](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27595990/)
23. Clay K, Klyachko O, Grindle N, Civitello D, Oleske D, Fuqua C. Microbial communities and interactions in the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Mol Ecol*. 2008; 17: 4371–4381. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2008.03914.x> PMID: [19378409](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19378409/)
24. Duron O, Jourdain E, McCoy KD. Diversity and global distribution of the *Coxiella* intracellular bacterium in seabird ticks. *Ticks Tick Borne Dis*. 2014; 5: 557–563. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.04.003> PMID: [24915875](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24915875/)
25. Duron O, Noël V, McCoy KD, Bonazzi M, Sidi-Boumedine K, Morel O, et al. The recent evolution of a maternally-inherited endosymbiont of ticks led to the emergence of the Q fever pathogen, *Coxiella burnetii*. *PLoS Pathog*. 2015; 11: 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004892> PMID: [25978383](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25978383/)
26. Duron O, Binetruy F, Noel V, Cremaschi J, McCoy K, Arnathau C, et al. Evolutionary changes in symbiont community structure in ticks. *Mol Ecol*. 2017; 26: 2905–2921. <https://doi.org/10.1111/mec.14094> PMID: [28281305](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28281305/)
27. Binetruy F, Buysse M, Lejarre Q, Barosi R, Villa M, Rahola N, et al. Microbial community structure reveals instability of nutritional symbiosis during the evolutionary radiation of *Amblyomma* ticks. *Mol Ecol*. 2020; 29: 1016–1029. <https://doi.org/10.1111/mec.15373> PMID: [32034827](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32034827/)
28. Binetruy F, Dupraz M, Buysse M, Duron O. Surface sterilization methods impact measures of internal microbial diversity in ticks. *Parasites and Vectors*. 2019; 12: 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3256-z> PMID: [30606222](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30606222/)
29. Jourdain E, Duron O, Barry S, González-Acuña D, Sidi-Boumedine K. Molecular methods routinely used to detect *Coxiella burnetii* in ticks cross-react with *Coxiella*-like bacteria. *Infect Ecol Epidemiol*. 2015; 5: 29230. <https://doi.org/10.3402/iee.v5.29230> PMID: [26609691](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26609691/)
30. Duron O. The IS1111 insertion sequence used for detection of *Coxiella burnetii* is widespread in *Coxiella*-like endosymbionts of ticks. *FEMS Microbiol Lett*. 2015; 362: 1–8. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv132> PMID: [26269380](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26269380/)

31. Pacheco RC, Echaide IE, Alves RN, Beletti ME, Nava S, Labruna MB. *Coxiella burnetii* in ticks, Argentina. *Emerg Infect Dis*. 2013; 19: 344–346. <https://doi.org/10.3201/eid1902.120362> PMID: [23343647](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23343647/)
32. Körner S, Makert GR, Mertens-Scholz K, Henning K, Pfeffer M, Starke A, et al. Uptake and fecal excretion of *Coxiella burnetii* by *Ixodes ricinus* and *Dermacentor marginatus* ticks. *Parasit Vectors*. 2020; 13: 75. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3956-z> PMID: [32059686](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32059686/)
33. Salifu SP, Bukari ARA, Frangoulidis D, Wheelhouse N. Current perspectives on the transmission of Q fever: Highlighting the need for a systematic molecular approach for a neglected disease in Africa. *Acta Trop*. 2019; 193: 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.02.032> PMID: [30831112](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30831112/)
34. Vanderburg S, Rubach MP, Halliday JEB, Cleaveland S, Reddy EA, Crump JA. Epidemiology of *Coxiella burnetii* Infection in Africa: A OneHealth Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002787> PMID: [24722554](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24722554/)
35. Duron O, Morel O, Noël V, Buysse M, Binetruy F, Lancelot R, et al. Tick-bacteria mutualism depends on B vitamin synthesis pathways. *Curr Biol*. 2018; 28: 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.007> PMID: [29249662](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29249662/)
36. Martinez E, Cantet F, Fava L, Norville I, Bonazzi M. Identification of *ompA*, a *Coxiella burnetii* protein involved in host cell invasion, by multi-phenotypic high-content screening. *PLoS Pathog*. 2014;10. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004013> PMID: [24651569](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24651569/)
37. Van Schaik EJ, Chen C, Mertens K, Weber MM, Samuel JE. Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group; 2013. pp. 561–573. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3049> PMID: [23797173](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23797173/)
38. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*. 2004; 5: 150–163. <https://doi.org/10.1093/bib/5.2.150> PMID: [15260895](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15260895/)
39. Martinez E, Allombert J, Cantet F, Lakhani A, Yandrapalli N, Neyret A, et al. *Coxiella burnetii* effector CvpB modulates phosphoinositide metabolism for optimal vacuole development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 113: E3260–E3269. <https://doi.org/10.1073/pnas.1522811113> PMID: [27226300](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27226300/)
40. Bates D, Mächler M, Bolker BM, Walker SC. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J Stat Softw*. 2015;67. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
41. Cabezas-Cruz A, Espinosa P, Alberdi P, de la Fuente J. Tick–pathogen interactions: The metabolic perspective. *Trends Parasitol*. 2019; 35: 316–328. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.01.006> PMID: [30711437](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30711437/)
42. Smith DJW. Studies in the epidemiology of Q fever. 11. Experimental infection of the ticks *Haemaphysalis bispinosa* and *Ornithodoros sp.* with *Rickettsia burnetii*. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 1942; 20: 295–296.
43. Davis GE. *Rickettsia diaporica*: Its persistence in the tissues of *Ornithodoros turicata*. *Public Heal Reports*. 1940; 55: 1862. <https://doi.org/10.2307/4583472>
44. Buysse M, Plantard O, McCoy KD, Duron O, Menard C. Tissue localization of *Coxiella*-like endosymbionts in three European tick species through fluorescence in situ hybridization. *Ticks Tick Borne Dis*. 2019; 10: 798–804. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.03.014> PMID: [30922601](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30922601/)
45. Lalzar I, Friedmann Y, Gottlieb Y. Tissue tropism and vertical transmission of *Coxiella* in *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus turanicus* ticks. *Environ Microbiol*. 2014; 16: 3657–3668. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12455> PMID: [24650112](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24650112/)
46. Wang M, Zhu D, Dai J, Zhong Z, Zhang Y, Wang J. Tissue localization and variation of major symbionts in *Haemaphysalis longicornis*, *Rhipicephalus haemaphysaloides* and *Dermacentor silvarum* in China. *Appl Environ Microbiol*. 2018. <https://doi.org/10.1128/AEM.00029-18> PMID: [29523550](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29523550/)
47. Coons LB, Rothschild M. Ticks (Acari: Ixodida). In: Capinera JL, editor. *Encyclopedia of Entomology*. Springer Netherlands; 2008. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6359-6_2457

[3] Publication d'un article

Titre : Ecological contacts and host specificity promote replacement of nutritional endosymbionts in ticks

Auteurs : Marie Buysse, Florian Binetruy, Raz Leibson, Yuval Gottlieb, Olivier Duron

Journal et année : Microbial Ecology, 2021

La symbiose avec des microbes apportant des vitamines est essentielle à la nutrition des animaux ayant des habitudes alimentaires spécialisées. Bien que la coévolution favorise l'interdépendance entre les partenaires symbiotiques, leurs associations ne sont pas nécessairement stables : Des symbiotes récemment acquis peuvent remplacer des symbiotes ancestraux. Dans cette étude, nous démontrons le remplacement réussi par des endosymbiotes de type *Francisella* (-LE), un groupe d'endosymbiotes fournissant des vitamines B, à travers les communautés de tiques, grâce à des transferts horizontaux. En utilisant une large collection d'espèces de tiques infectées par *Francisella*-LE, nous avons déterminé la diversité des haplotypes de *Francisella*-LE par une approche de typage de souche multi-locus et avons caractérisé leurs relations phylogénétiques et leur association avec les caractéristiques biologiques de leurs hôtes tiques. Les modèles observés montrent que les *Francisella*-LE se transfèrent généralement par le biais de réseaux écologiques similaires et de distributions géographiques partagées entre différentes espèces de tiques et, dans certains cas, par un brassage préférentiel entre espèces de tiques congénères. Dans l'ensemble, ces résultats révèlent l'importance de la proximité géographique, écologique et phylogénétique dans le façonnement du modèle de remplacement dans lequel de nouvelles symbioses nutritionnelles sont initiées.



Ecological Contacts and Host Specificity Promote Replacement of Nutritional Endosymbionts in Ticks

Marie Buysse^{1,2} · Florian Binetruy¹ · Raz Leibson³ · Yuval Gottlieb³ · Olivier Duron^{1,2}

Received: 3 February 2021 / Accepted: 12 May 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

Abstract

Symbiosis with vitamin-provisioning microbes is essential for the nutrition of animals with some specialized feeding habits. While coevolution favors the interdependence between symbiotic partners, their associations are not necessarily stable: Recently acquired symbionts can replace ancestral symbionts. In this study, we demonstrate successful replacement by *Francisella*-like endosymbionts (-LE), a group of B-vitamin-provisioning endosymbionts, across tick communities driven by horizontal transfers. Using a broad collection of *Francisella*-LE-infected tick species, we determined the diversity of *Francisella*-LE haplotypes through a multi-locus strain typing approach and further characterized their phylogenetic relationships and their association with biological traits of their tick hosts. The patterns observed showed that *Francisella*-LE commonly transfer through similar ecological networks and geographic distributions shared among different tick species and, in certain cases, through preferential shuffling across congeneric tick species. Altogether, these findings reveal the importance of geographic, ecological, and phylogenetic proximity in shaping the replacement pattern in which new nutritional symbioses are initiated.

Keywords Maternally inherited bacteria · Nutritional symbiosis · Horizontal transfer · Ticks · *Francisella* · *Coxiella*

Introduction

Mutualisms with microbes are at the origin of animal lineages feeding on nutritionally incomplete food resources [1–3]. Microbes can synthesize essential amino acids and

vitamins that animals cannot and thus have vital roles in compensating for nutritional deficiencies. Through this mechanism, symbiont acquisition enabled the emergence and expansion of many animal lineages, such as aphids, bed bugs, and leeches, which would otherwise not exist [1, 3, 4]. Over evolutionary times, hosts and nutritional symbionts coevolve traits that stabilize their interactions, often leading to strict host–symbiont co-cladogenesis [2, 4]. However, nutritional symbioses can be much more dynamic: Ancestral nutritional symbionts can be replaced by recently acquired symbionts able to provide similar or additional benefits to the hosts [1, 4–6]. Indeed, sap-feeding insects display a mosaic of nutritional symbiont combinations, reflecting repeated symbiont acquisitions, replacements, and losses [4]. These novel symbioses typically originate either following horizontal transfer from one host species to another or from uptake of novel symbionts from the environment and thus primarily depend on the symbiont's ability to successfully shift hosts across species boundaries [4, 5]. In arthropods, most of the novel nutritional symbionts evolve from intracellular or extracellular bacteria already adapted to the arthropod cell or gut environment, but not essential to host

Yuval Gottlieb and Olivier Duron Contributed equally to this work

✉ Marie Buysse
marie.buysse@ird.fr

✉ Yuval Gottlieb
gottlieb.yuval@mail.huji.ac.il

✉ Olivier Duron
olivier.duron@ird.fr

¹ Maladies Infectieuses et Vecteurs : Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) - Institut pour la Recherche et le Développement (IRD), Université de Montpellier (UM), Montpellier, France

² CREES (Centre de Recherche en Écologie et Évolution de la Santé), Montpellier, France

³ Koret School of Veterinary Medicine, The Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel

survival [4–6]. Yet, it remains unclear how symbionts are primarily acquired by novel host species.

Nutritional symbiotic systems in ticks (Arachnida: Ixodidae) have been impacted by repeated symbiont acquisitions, replacements, and losses [7–9]. Ticks are strict blood-feeders: They do not use any other food sources and, as such, they ingest high levels of protein, iron, and salt, but few carbohydrates, lipids, or vitamins [1, 10]. The genomes of ticks have evolved large repertoires of genes related to this nutritional challenge, but they themselves cannot synthesize the essential vitamins that are lacking in blood meal [11, 12]. To overcome these nutritional deficiencies, ticks have evolved obligate interactions with nutritional endosymbionts [1, 9, 13–19]. The most common obligate endosymbionts, *Coxiella*-like endosymbionts (*Coxiella*-LE hereafter; Legionellales: Coxiellaceae) and *Francisella*-like endosymbionts (*Francisella*-LE; Thiotrichales: Francisellaceae), are maternally inherited intracellular bacteria specifically associated with ticks [8, 20]. Although *Coxiella*-LE and *Francisella*-LE are distantly related, they have converged towards an analogous B-vitamin-based nutritional mutualism with ticks [1, 9, 13–17]. Their experimental elimination typically results in decreased tick survival, molting, fecundity, and egg viability, as well as in physical abnormalities [13, 16, 19, 21–23], which all are fully restored with an oral supplement of B vitamins [13]. The sequencing of *Coxiella*-LE and *Francisella*-LE genomes confirmed that they consistently produce three B vitamin types, biotin (vitamin B₇), riboflavin (B₂), and folate (B₉), which are required for the tick life cycle [9, 13–17]. Due to this requirement, these obligate endosymbionts are present in all individuals of their tick host species, at least at early stages of development [8, 13, 20, 24, 25]. However, in few tick species, *Francisella*-LE are facultative endosymbionts (i.e., not required for the tick life cycle, and exhibiting low prevalence in the tick population) coexisting with obligate endosymbionts (as *Coxiella*-LE) that ensure the tick's requirements for B vitamins [7, 8].

Recent surveys suggest that *Francisella*-LE are spreading through tick communities at the expense of *Coxiella*-LE [7, 8]. These endosymbionts rarely coexist together and a tick species hosting one usually does not harbor the other one. Phylogenetic reconstructions revealed that *Coxiella*-LE, but not *Francisella*-LE, are ancestral endosymbionts in most tick lineages: *Coxiella*-LE commonly form evolutionarily stable associations lasting for million years and leading to strict co-cladogenesis [7, 8, 18]. However, repeated replacements of *Coxiella*-LE by *Francisella*-LE are apparent across the tick phylogeny, with recent acquisitions of *Francisella*-LE through horizontal transfers and extinctions of ancestral *Coxiella*-LE in several tick lineages [7, 8]. Thanks to these dynamics, at least 20% of tick species may be infected either by obligate or by facultative *Francisella*-LE [8].

In this study, we explored the routes of *Francisella*-LE horizontal transmission to determine their impact on the stability of tick nutritional symbioses. We tested for the existence of two distinct mechanisms: (1) ecological contacts and (2) specificity towards the current tick hosts. Tick species may be involved in ecological contacts either directly (i.e., feeding on same vertebrate types) or indirectly (i.e., inhabiting the same geographic region). These contacts may create primary opportunities for symbiont horizontal transfers that can result in the distribution of related *Francisella*-LE in unrelated tick species. Specificity towards current tick hosts may be the consequence of coevolution between the symbiotic partners and imposes a certain *Francisella*-LE distribution that is restricted to the certain tick species and their close relatives with which they have coevolved. Each of these mechanisms have been reported in common facultative endosymbionts of arthropods (e.g. 25–29), but none has been examined in the context of nutritional symbioses in ticks. To investigate these routes of transmission, we first characterized *Francisella*-LE diversity using a multi-locus typing system, which was recently developed to study *Francisella*-LE evolution in the *Amblyomma* tick genus [7]. Here, we extended this multi-locus analysis to a more cosmopolitan tick collection and used phylogenetic reconstructions to estimate the proximity of *Francisella*-LE haplotypes, including obligate and facultative endosymbiotic forms, and retraced their evolutionary histories across tick species. We also compared this diversity with other members of the *Francisella* genus, including virulent intracellular pathogens of vertebrates such as the agent of tularemia, *F. tularensis*. We next traced the network of movements of *Francisella*-LE among tick species by examining the association of *Francisella*-LE haplotypes with tick phylogeny and their geographical and ecological traits.

Methods

Tick Collection

A collection of 51 individual DNA templates obtained from 51 specimens of 14 tick species was used (Table S1). For each DNA template, tick identification and infection by *Francisella*-LE have been formally characterized in previous studies by molecular and/or morphological characteristics (for ticks) and single-locus DNA sequencing (for *Francisella*-LE) (Table S1). Of the 14 tick species examined, one belongs to the Argasidae family (soft ticks), and to the *Ornithodoros* genus. The 13 other species belong to the Ixodidae family (hard ticks), and to the *Amblyomma* (one species), *Dermacentor* (three species), *Hyalomma* (seven species), *Ixodes* (two species), and *Rhipicephalus* (one species) genera. Most specimens were collected on vegetation

or on taxonomically diverse bird and mammal hosts while a few others were from a laboratory colony (Table S1). The 14 tick species were infected either by putative obligate *Francisella*-LE (11 species) or by facultative *Francisella*-LE (three species) (Table S1). The use of the genetic resources was declared to the French Ministry of the Environment (reference TREL19028117S/156).

Multi-locus Typing of *Francisella*-LE

Francisella-LE were genotyped through nested or semi-nested PCR assays and sequencing of five housekeeping genes (16S rRNA [695 bp], *rpoB* [379 bp], *groEL* [981 bp], *ftsZ* [713 bp], and *gyrB* [1035 bp]) recently developed for *Francisella*-LE multi-locus typing [7]. Primers and PCR conditions are detailed in Table S2. Following visualization via electrophoresis in 1.5% agarose gel, positive PCR products were sequenced by Eurofins. Sequence chromatograms were cleaned with Chromas Lite (http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html), and alignments were performed using ClustalW, implemented in the MEGA software package [30].

Alleles of *Francisella*-LE were determined on the basis of sequence identity in nucleotide alignments. Analyses of allelic profiles included multi-locus sequences of (1) the *Francisella*-LE of the 51 specimens belonging to the 14 tick species characterized in this study, (2) the *Francisella*-LE of 25 additional specimens belonging to 12 *Amblyomma* species and available on GenBank from Binetruy et al. (2020) [7] (16S rRNA: MN998628-MN998651; *rpoB*: MT000818-MT000841; *ftsZ*: MT000842-MT000865; *groEL*: MT000866-MT000889; *gyrB*: MT000890-MT000913), and (3) the four published *Francisella*-LE genomes from three other tick species, including the only formally described *Francisella*-LE species, *F. persica* (formerly known as *Wolbachia persica*) (F-Om: QAPC00000000; FLE-Om: LVCE00000000; FLE-Am: LNCT00000000; *F. persica*: CP012505) [9, 13, 14, 31] (Table 1). Overall, this dataset included *Francisella*-LE multi-locus sequences from 76 tick specimens and four *Francisella*-LE genomes. It included data from 29 tick species (three belonging to the Argasidae family and 26 to the Ixodidae family), including 22 species for which *Francisella*-LE were previously identified as putative obligate endosymbionts, six species with *Francisella*-LE as facultative endosymbionts, and one species with a *Francisella*-LE of undetermined status (Table 1). Key traits of the 29 tick species (family, geographic distribution, and vertebrate types on which they usually feed) are detailed in Table S3.

Molecular Phylogenetic Analyses

Phylogenetic analyses were based on sequence alignments of single or concatenated *Francisella*-LE gene sequences obtained for analyses of allelic profiles. Sequences of other *Francisella* species (*F. opportunistica*: CP022377; *F. tularensis*: AJ749949; *F. novicida*: CP009633; *F. hispaniensis*: CP018093) obtained from GenBank were also included in the analyses. The Gblocks program with default parameters was used to obtain non-ambiguous sequence alignments [32]. All sequence alignments were also checked for putative recombinant regions using the RDP3 analysis package [33]. Tree-based phylogenetic analyses were performed using maximum-likelihood (ML) analyses using MEGA. The evolutionary models that best fit the sequence data were determined using the Akaike information criterion. Clade robustness was assessed by bootstrap analysis using 1000 replicates.

The tick phylogeny was constructed as a simplified cladogram of tick genera adapted from Burger et al. [34]. This tree was used as for some tick species used in the *Francisella*-LE phylogeny, there was no available tick sequence in GenBank and lack of DNA for certain ticks prevents novel sequencing. To test for associations between *Francisella*-LE and tick phylogenies, we used the Procrustean Approach to Cophylogeny (PACo) method [35] implemented in R (<http://www.r-project.org>) using the APE [36] and VEGAN [37] packages. PACo is a global-fit method that assesses phylogenetic congruence with the explicit aim to test the dependency of one phylogeny on another. For *Francisella*-LE, the phylogeny was obtained with the 16S rRNA, *rpoB*, *groEL*, *ftsZ*, and *gyrB* concatenated dataset as described above. To avoid spurious clustering because of multiple *Francisella*-LE haplotypes per host species, we conducted cophylogenetic analyses by using only one representative *Francisella*-LE haplotype per host species. Because all *Francisella*-LE haplotypes found in a same tick species are always closely related (see “Results”), we randomly sampled one *Francisella*-LE haplotype per host species and used it in further cophylogenetic analyses. The significance of cophylogenetic tests was established by 10,000 random permutations of the association matrix.

Statistical Analyses

We explored the association of the phylogenetic distribution of *Francisella*-LE haplotypes with key traits, including endosymbiosis type (obligate vs. facultative endosymbiosis), geographic distribution (Eastern Hemisphere vs. Western Hemisphere, i.e., Europe, Africa, and Asia vs. North, Central, and South Americas), tick family (Argasidae vs. Ixodidae), and feeding preferences (i.e., vertebrate classes on which the tick host species usually feed: mammals, birds,

Table 1 Allelic profile of the five polymorphic genes in *Francisella*-LE from the 14 tick species examined in this study. Previously published sequences of *Francisella*-LE from additional 15 tick species (including genomic and multi-locus typing *Francisella*-LE datasets) were also included for analysis. Identification of *Francisella*-LE hap-

lotypes was based on 16S rRNA, *rpoB*, *groEL*, *ftsZ*, and *gyrB* allelic profiles. *, number of specimens (n) used to determine allelic profiles from multi-locus typing assays; NA, not applicable (for *Francisella*-LE genomes)

Tick species	<i>Francisella</i> -LE type	n*	Allelic profile					<i>Francisella</i> -LE haplotype	Reference for <i>Francisella</i> -LE typing
			16S rRNA	<i>rpoB</i>	<i>groEL</i>	<i>ftsZ</i>	<i>gyrB</i>		
Argasidae (soft ticks)									
<i>Ornithodoros porcinus</i>	Obligate	3	#1	#1	#1	#1	#1	#1	Multi-locus typing, this study
<i>Ornithodoros moubata</i>	Obligate	NA	#2	#2	#2	#2	#2	#2	F-Om genome [13]
	Obligate	NA	#3	#2	#2	#3	#2	#3	FLE-Om genome [9]
<i>Argas arboreus</i>	Unknown	NA	#4	#3	#3	#4	#3	#4	<i>Francisella persica</i> genome [31]
Ixodidae (hard ticks)									
<i>Amblyommalatum</i>	Obligate	2	#5	#4	#4	#5	#4	#5	Multi-locus typing, this study
<i>Amblyomma dissimile</i> #1	Obligate	1	#6	#5	#5	#6	#5	#6	Multi-locus typing [7]
<i>Amblyomma dissimile</i> #2	Obligate	1	#6	#5	#6	#6	#5	#7	Multi-locus typing [7]
<i>Amblyomma geayi</i>	Facultative	1	#6	#5	#5	#6	#5	#6	Multi-locus typing [7]
<i>Amblyomma goeldii</i>	Obligate	3	#7	#6	#7	#7	#6	#8	Multi-locus typing [7]
<i>Amblyomma humerale</i> #1	Obligate	3	#8	#7	#8	#8	#7	#9	Multi-locus typing [7]
<i>Amblyomma humerale</i> #2	Obligate	1	#8	#7	#9	#8	#7	#10	Multi-locus typing [7]
<i>Amblyomma latepunctatum</i>	Facultative	1	#6	#5	#5	#6	#5	#6	Multi-locus typing [7]
<i>Amblyomma longirostre</i>	Obligate	3	#9	#8	#10	#9	#8	#11	Multi-locus typing [7]
<i>Amblyomma maculatum</i>	Obligate	NA	#10	#9	#11	#10	#9	#12	FLE-Am genome [14]
<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>	Obligate	3	#11	#4	#4	#11	#10	#13	Multi-locus typing [7]
<i>Amblyomma pacae</i> #1	Obligate	1	#12	#4	#12	#12	#11	#14	Multi-locus typing [7]
<i>Amblyomma pacae</i> #2	Obligate	1	#13	#4	#13	#12	#12	#15	Multi-locus typing [7]
<i>Amblyomma paulopunctatum</i>	Obligate	1	#14	#10	#14	#1	#13	#16	Multi-locus typing [7]
<i>Amblyomma rotundatum</i> #1	Obligate	1	#15	#11	#15	#13	#14	#17	Multi-locus typing [7]
<i>Amblyomma rotundatum</i> #2	Obligate	1	#16	#11	#15	#14	#14	#18	Multi-locus typing [7]
<i>Amblyomma rotundatum</i> #3	Obligate	1	#17	#12	#16	#15	#15	#19	Multi-locus typing [7]
<i>Amblyomma sculptum</i>	Facultative	1	#18	#13	#17	#1	#1	#20	Multi-locus typing [7]
<i>Amblyomma varium</i> #1	Obligate	1	#19	#14	#18	#16	#16	#21	Multi-locus typing [7]
<i>Amblyomma varium</i> #2	Obligate	2	#19	#14	#19	#16	#16	#22	Multi-locus typing [7]
<i>Dermacentor nitens</i> #1	Obligate	1	#20	#15	#20	#17	#17	#23	Multi-locus typing, this study
<i>Dermacentor nitens</i> #2	Obligate	1	#20	#15	#20	#17	#18	#24	Multi-locus typing, this study
<i>Dermacentor occidentalis</i>	Obligate	4	#21	#16	#21	#18	#19	#25	Multi-locus typing, this study
<i>Dermacentor reticulatus</i>	Obligate	1	#22	#17	#22	#19	#20	#26	Multi-locus typing, this study
<i>Hyalomma aegyptium</i>	Obligate	5	#23	#18	#23	#20	#21	#27	Multi-locus typing, this study
<i>Hyalomma excavatum</i> #1	Obligate	2	#24	#19	#24	#1	#22	#28	Multi-locus typing, this study
<i>Hyalomma excavatum</i> #2	Obligate	1	#25	#19	#25	#1	#22	#29	Multi-locus typing, this study
<i>Hyalomma excavatum</i> #3	Obligate	1	#24	#19	#25	#1	#22	#30	Multi-locus typing, this study
<i>Hyalomma excavatum</i> #4	Obligate	4	#26	#19	#26	#27	#22	#31	Multi-locus typing, this study
<i>Hyalomma impeltatum</i>	Obligate	5	#27	#20	#27	#21	#23	#32	Multi-locus typing, this study
<i>Hyalomma lusitanicum</i>	Obligate	1	#28	#21	#28	#22	#24	#33	Multi-locus typing, this study
<i>Hyalomma marginatum</i>	Obligate	5	#29	#19	#29	#23	#25	#34	Multi-locus typing, this study
<i>Hyalomma rufipes</i>	Obligate	7	#29	#22	#30	#24	#26	#35	Multi-locus typing, this study
<i>Ixodes ricinus</i>	Facultative	3	#30	#17	#22	#19	#20	#36	Multi-locus typing, this study
<i>Ixodes scapularis</i>	Facultative	2	#31	#23	#31	#25	#27	#37	Multi-locus typing, this study
<i>Rhipicephalus decoloratus</i>	Facultative	1	#32	#24	#32	#26	#28	#38	Multi-locus typing, this study

and reptiles) (Table S3). There is a great variation of feeding preference in ticks: Some tick species (*A. latum* and *Hy.*

aegyptium) feed exclusively on reptiles while other species (*O. moubata* and *D. nitens*) only feed on mammals. Some

species (*A. maculatum* and *I. scapularis*) are more generalist species feeding on birds and mammals, but never on reptiles. A few tick species (*I. ricinus*) are also generalist, feeding on birds, mammals, and reptiles (Table S3).

We used the *D* metric [38] to estimate the overall degree of clustering of these traits on the *Francisella*-LE phylogeny. If a trait shows a phylogenetic signal, it may be assumed that *Francisella*-LE haplotypes sharing this trait are not randomly distributed over the phylogeny: They are more phylogenetically clustered than expected by chance. The *D* metric provides an estimate of phylogenetic conservatism for binary traits that can be compared either with a random shuffle of trait values at the tips of a phylogeny or with a Brownian motion model of evolution that allows one to depict evolutionary diversification processes along a topology [38]. A *D* value of 1 indicates a phylogenetically random distribution, whereas a *D* value inferior to 1 indicates phylogenetic clustering. A *D* value of 0 indicates that the trait is clustered as if it had evolved under Brownian motion of evolution (i.e., in a random dispersal with constant trait variance over time [39]), whereas a *D* value less than 0 indicates an extremely clustered trait [38]. To assess the significance of the *D* metric estimates, two *p*-values were furthermore calculated using permutation tests: $p(D < 1)$ indicates whether the *D* metric is significantly smaller than 1, meaning that the trait is not randomly distributed over the phylogeny, and $p(D > 0)$ indicates whether the *D* metric is significantly greater than 0, meaning that the trait has a significantly different distribution on the phylogeny from the Brownian threshold model of evolution. We calculated the *D* metric implemented by the function “phylo.d” in the R package *caper* [40] with the default parameter of 1000 permutations. Multiple testing was taken into account using the sequential Bonferroni procedure, according to Hochberg (1988) [41]. As done for cophylogenetic analyses to avoid spurious clustering, we calculated the *D* metric using only one representative *Francisella*-LE haplotype per host species.

We applied a second approach to examine the phylogenetic clustering of *Francisella*-LE haplotypes from the same tick genus and thus to test for the level of specificity of *Francisella*-LE. To this aim, we computed the pairwise distances between all *Francisella*-LE haplotypes from the concatenated ML phylogenetic tree using its branch lengths (using only one representative *Francisella*-LE haplotype per host species). We further partitioned this dataset into (1) pairwise phylogenetic distances between *Francisella*-LE haplotypes from a same tick genus (intra-genetic pairwise phylogenetic distances) and (2) pairwise phylogenetic distances between *Francisella*-LE haplotypes from different tick genera (inter-genetic pairwise phylogenetic distances). Intra-genetic pairwise phylogenetic distances for a given tick genus that are lower than inter-genetic pairwise phylogenetic distances indicate specificity of these

Francisella-LE haplotypes. We compared intra-genetic vs. inter-genetic pairwise phylogenetic distances using Wilcoxon signed-rank tests.

Results

Characterization of *Francisella*-LE Haplotypes

We amplified and sequenced the *Francisella*-LE 16S rRNA, *rpoB*, *groEL*, *ftsZ*, and *gyrB* gene sequences from the 51 DNA templates belonging to 14 tick species (Table 1). We supplemented these data with additional sequences from 15 other tick species that include genomic and multi-locus typing of *Francisella*-LE datasets available on GenBank (listed in Table 1). Overall, the complete multi-locus dataset included *Francisella*-LE sequences from 29 tick species.

On the basis of 16S rRNA, *rpoB*, *groEL*, *ftsZ*, and *gyrB* gene sequences, we characterized 24 to 32 distinct alleles depending on the gene, leading to the identification of 38 genetically different *Francisella*-LE haplotypes in the 29 tick species (Table 1). For 22 tick species, we only observed one *Francisella*-LE haplotype per tick species. For the seven other tick species, we detected sequence variation at one to five *Francisella*-LE genes between conspecific specimens, and up to four distinct *Francisella*-LE haplotypes could be present in the same tick species as observed in *Hyalomma excavatum* (Table 1). Of the 38 *Francisella*-LE haplotypes, 37 are specific to their respective tick species and are not shared by two or more tick species. Only the *Francisella*-LE haplotype #6 was detected in three tick species (*A. dissimile*, *A. geayi*, and *A. latepunctatum*) (Table 1).

Phylogenetic and Statistical Analyses

ML analyses based on 16S rRNA, *rpoB*, *groEL*, *ftsZ*, and *gyrB* gene sequences were conducted to examine the *Francisella*-LE phylogeny (Fig. S1–S5). We observed no sign of recombination in the dataset (all $p > 0.17$ for the GENECONV and RDP recombination detection tests) and we thus further conducted a new ML analysis based on the 16S rRNA, *rpoB*, *groEL*, *ftsZ*, and *gyrB* concatenated dataset (Fig. 1). All but one phylogenetic reconstruction showed that the *Francisella*-LE, including *F. persica*, delineate a robust monophyletic clade within the *Francisella* genus (Fig. 1, Fig. S2–S5). Only the topology of the 16S rRNA gene tree is poorly resolved due to insufficient sequence polymorphism (Fig. S1). The closest relative of *Francisella*-LE is an opportunistic *Francisella* pathogen (*F. opportunistica* [42]),

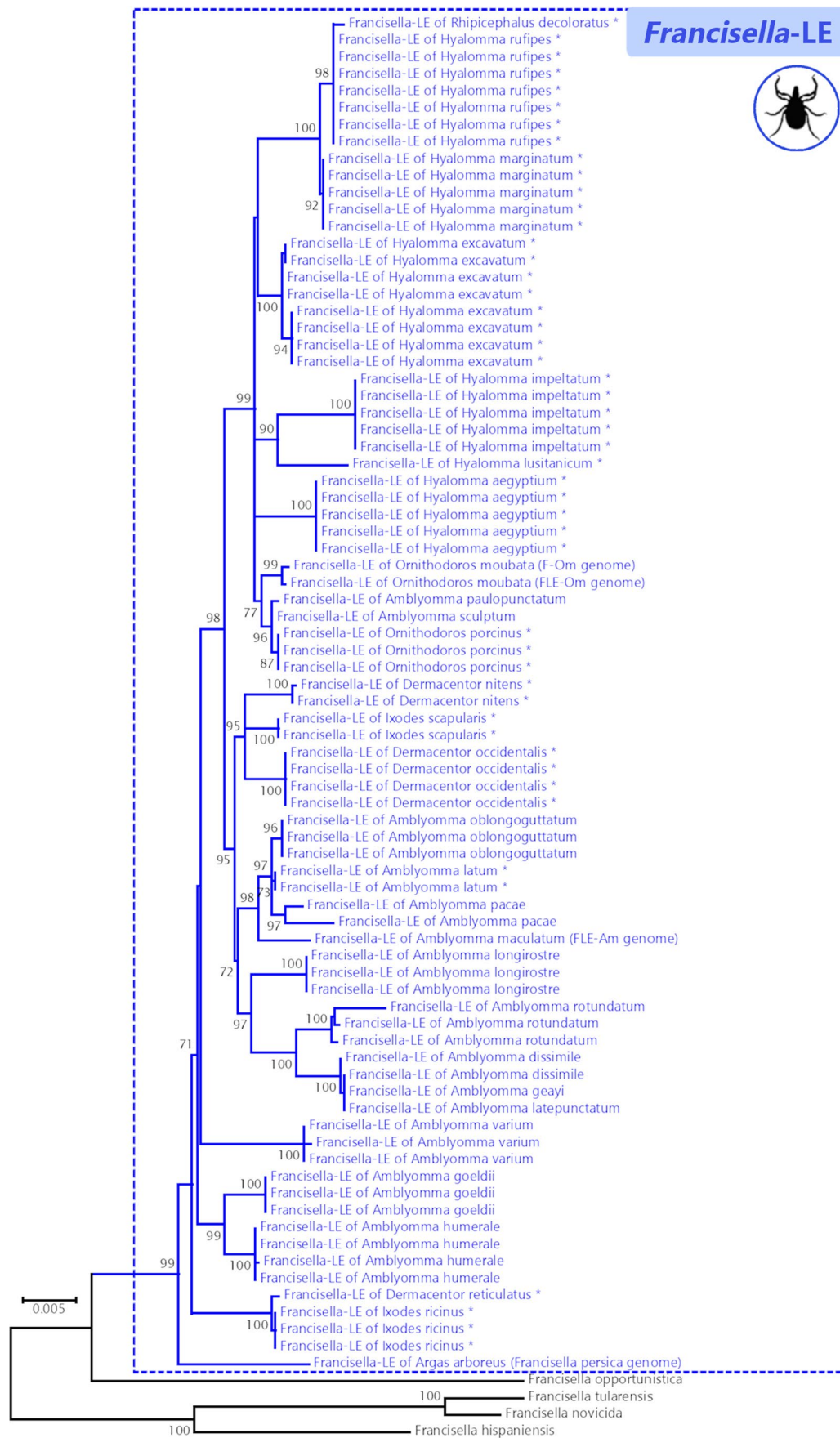


Fig. 1 *Francisella* phylogenetic tree constructed using maximum-likelihood (ML) estimations based on concatenated 16S rRNA, *rpoB*, *groEL*, *ftsZ*, and *gyrB* nucleotide sequences (3232 unambiguously aligned bp; best-fit approximation for the evolutionary model: GTR+G) from *Francisella*-LE of 29 tick species and from other *Francisella* species. Branch numbers indicate percentage bootstrap support (1000 replicates). Only bootstrap support values >70% are shown. The scale bar is in units of substitution/site. *, *Francisella*-LE sequences obtained in this study. *Francisella*-LE sequences are indicated by a blue font

as well as other *Francisella* pathogens, including the agent of tularemia, *F. tularensis* (Fig. 1, Fig. S1–S5).

Phylogenetic reconstructions showed that the different *Francisella*-LE haplotypes found in the same tick species always cluster together (Fig. 1). Indeed, the four *Francisella*-LE haplotypes of *Hy. excavatum* are more closely related to each other than to any other *Francisella*-LE haplotype. A similar pattern was observed for the six other tick species hosting more than one *Francisella*-LE haplotype.

The cophylogeny analysis returns a significant cophylogenetic signal between *Francisella*-LE and ticks (global sum of squared residuals: $m_{XY}^2 = 0.002$, $p < 0.001$, $n = 10,000$) (Fig. 2). This supports the hypothesis that the *Francisella*-LE phylogeny tracks the tick phylogeny and that the two partners have undergone coupled evolutionary change. Indeed, *Francisella*-LE of some tick species belonging to the same genus can cluster together along the phylogeny, as shown with the *Francisella*-LE of *A. varium*, *A. goeldi*, and *A. humerale* (Figs. 1 and 2). Further comparisons of pairwise phylogenetic distances showed evidence on *Francisella*-LE specificity in two tick genera, *Hyalomma* (Ixodidae) and *Ornithodoros* (Argasidae) (Fig. 3). *Francisella*-LE haplotypes of the *Hyalomma* genus are more closely related to each other (intrageneric pairwise phylogenetic distances, mean \pm SE: 0.0117 ± 0.0009 , $n = 15$ pairwise comparisons) than to *Francisella*-LE haplotypes of other tick genera (intergeneric pairwise phylogenetic distances, 0.0146 ± 0.0003 , $n = 253$) (Wilcoxon test, $W = 1106$, $p = 0.006$). No evidence of *Francisella*-LE specificity was observed in other tick genera (*Amblyomma*: $W = 4330$, $p = 0.26$; *Dermacentor*: $W = 446$, $p = 0.80$; *Ixodes*: $W = 153$, $p = 0.83$; *Ornithodoros*: $W = 11$, $p = 0.11$; *Argas* and *Rhipicephalus*: not applicable because only one haplotype was observed in each of these genera) (Fig. 3). However, it is noteworthy that some *Francisella*-LE of several *Amblyomma* species (e.g., *A. pacae*, *A. latum*, *A. oblongoguttatum*, *A. maculatum*, *A. longirostre*, *A. dissimile*, *A. geayi*, *A. latepunctatum*, and *A. rotundatum*) cluster together (Figs. 1 and 2): It suggests that some degree of *Francisella*-LE specificity in these *Amblyomma* species may also exist.

It is noteworthy that the tick phylogeny, while resolved at the genus level, lacks resolution at the level of species. To adjust for this, all congeneric tick species were arbitrarily

considered here as equally distant because of the lack of data for some tick species (see “Methods”). The detection of a cophylogenetic signal, thus, implies that it is driven by congruent branching patterns at the tick genus level and higher but not necessarily with tick species. However, the diagram of the interaction network shows some major phylogenetic incongruences (Fig. 2). As can be seen, no tick genus harbors a specific and monophyletic *Francisella*-LE subclade: The *Francisella*-LE of *Amblyomma* are scattered among *Francisella*-LE of other tick genera, as best shown with the *Francisella*-LE of *A. sculptum* and *A. paulopunctatum* that are more closely related to the *Francisella*-LE of the soft ticks *O. moubata* and *O. porcinus* than to the *Francisella*-LE of other *Amblyomma* species (Fig. 1). Hence, the *Francisella*-LE of *Amblyomma* belonged to a minimum of three distinct phylogenetic clusters (Figs. 1 and 2). Similarly, the *Francisella*-LE of *Dermacentor* tick species, as well as for *Ixodes* species, were each scattered among two different *Francisella*-LE branches (Figs. 1 and 2). In addition, we found a non-significant clustering signal for tick families (Argasidae and Ixodidae) on the phylogeny of *Francisella*-LE haplotypes ($D = -0.43$): Their distribution on the tree is significantly random ($p(D < 1) = 0.04$, non-significant after sequential Bonferroni correction) and statistically distinguishable from a clustered distribution expected by Brownian motion ($p(D > 0) = 0.67$) (Fig. 2). Overall, these patterns are the signatures of repeated horizontal transfer events, revealing the ability of *Francisella*-LE to extensively move among tick species.

We found no signal of phylogenetic clustering for *Francisella*-LE endosymbiosis types ($D = 1.81$): The distribution of obligate and facultative *Francisella*-LE on the tree is random ($p(D < 1) = 0.92$) and facultative *Francisella*-LE are scattered along the phylogeny among obligate *Francisella*-LE (Fig. 2). The *Francisella*-LE haplotype #6 illustrates this pattern well, as it was associated with obligate endosymbiosis in *A. dissimile* but with facultative endosymbiosis in *A. geayi* and *A. latepunctatum* (Table S3).

In contrast to the latter comparison, the geographic origin of *Francisella*-LE haplotypes showed a significant phylogenetic signal ($D = -0.08$, $p(D < 1) = 0.008$, $p(D > 0) = 0.59$) with a clear non-random distribution of *Francisella*-LE haplotypes between ticks from the Eastern and Western Hemispheres (Fig. 2). The best examples include *Francisella*-LE haplotypes of American *Dermacentor* and *Ixodes* species that cluster together within the same subclade, while *Francisella*-LE haplotypes of European *Dermacentor* and *Ixodes* species cluster together in another subclade. There are only a few exceptions to this geographical pattern as shown with the *Francisella*-LE haplotype of an African *Amblyomma* species, *A. latum*, which clusters within a clade otherwise only composed of American *Amblyomma* species (Fig. 2).

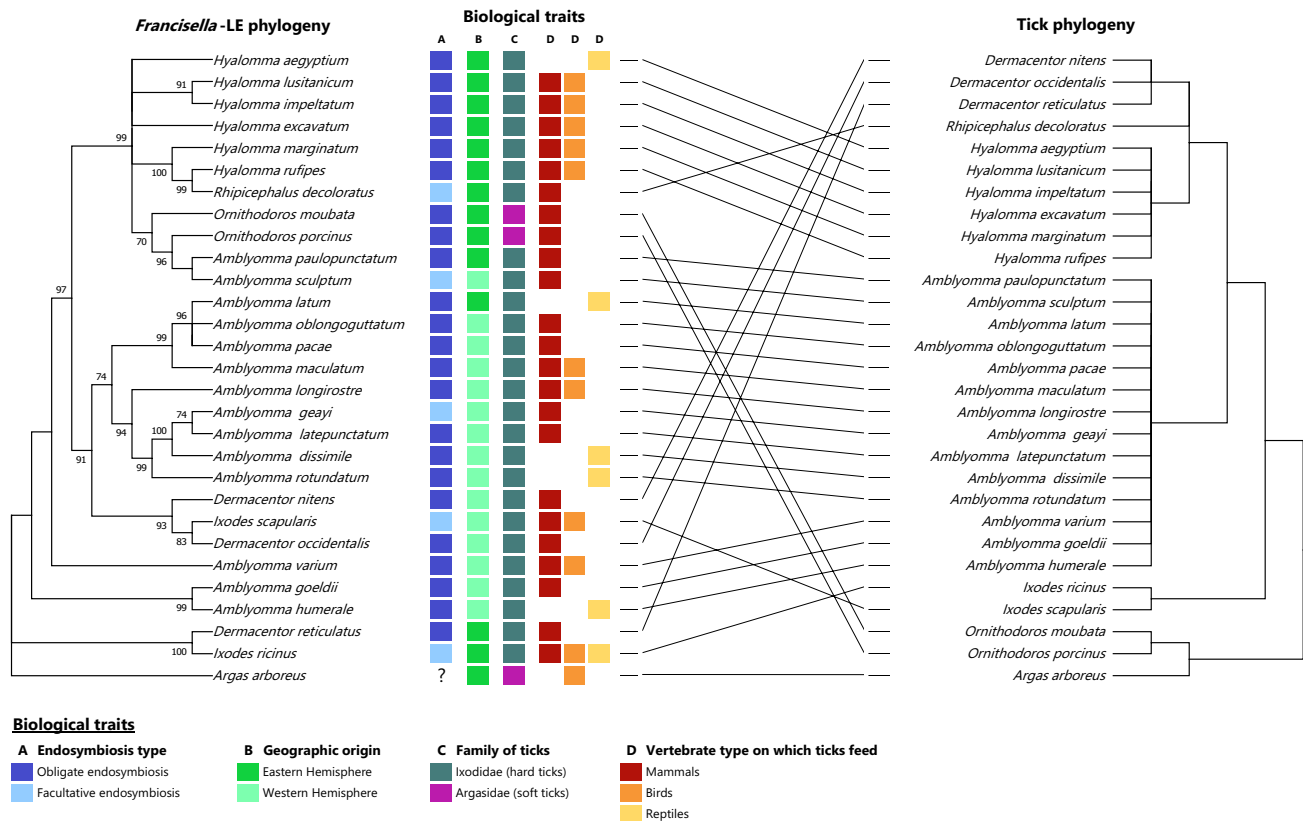


Fig. 2 Cladogram depicting the 50% majority-rule consensus of *Francisella*-LE haplotype phylogenetic trees (left part), association with key biological traits (middle) and network association with the tick phylogeny (right part). The *Francisella*-LE tree was constructed with the 29 *Francisella*-LE haplotypes characterized in the 29 tick species used in this study and using maximum-likelihood (ML) estimations based on concatenated 16S rRNA, *rpoB*, *groEL*, *ftsZ*, and

gyrB nucleotide sequences (3232 unambiguously aligned bp; best-fit approximation for the evolutionary model: GTR+G). Branch numbers indicate percentage bootstrap support for major branches (1000 replicates). Only bootstrap support values >70% are shown. The tick tree is a simplified cladogram of tick genera adapted from Burger et al. [34], and all congeneric tick species were arbitrarily considered as equally distant

We found no significant signal of phylogenetic clustering for certain vertebrates on which ticks feed (Fig. 2): *Francisella*-LE haplotypes do not cluster with tick species feeding on birds ($D=0.14$, $p(D < 1)=0.02$, non-significant after sequential Bonferroni correction, $p(D > 0)=0.39$), on mammals ($D=0.78$, $p(D < 1)=0.36$, $p(D > 0)=0.10$), or on reptiles ($D=0.99$, $p(D < 1)=0.51$, $p(D > 0)=0.06$). However, although globally non-significant, some tick species that exclusively feed on mammals (e.g., *O. moubata*, *O. porcinus*, *A. sculptum*, and *A. paulopunctatum*) harbor closely related *Francisella*-LE haplotypes (Fig. 2). Similarly, *A. rotundatum* and *A. dissimile*, which both feed on reptiles, harbor closely related *Francisella*-LE haplotypes. Exceptions are also observed on the haplotype-based tree as shown with *A. longirostre*: This species feeds on birds but harbors a *Francisella*-LE haplotype more closely related to haplotypes of *Amblyomma* species feeding on mammals and reptiles than to haplotypes of other tick species feeding on birds (Fig. 2).

Discussion

We identified 38 distinct *Francisella*-LE haplotypes, including obligate and facultative forms, from a broad collection of 29 tick species. All *Francisella*-LE haplotypes were clustered in a monophyletic clade nested within the *Francisella* genus among virulent intracellular pathogens of vertebrates. This confirms early studies showing that *Francisella*-LE emerged from a pathogenic *Francisella* ancestor of vertebrates that had evolved a specialized endosymbiotic lifestyle with ticks [9, 13, 14]. The distribution of current *Francisella*-LE haplotypes reveals how these endosymbionts spread in tick communities presumably at the expense of *Coxiella*-LE [7, 8].

Francisella-LE Commonly Move Along Ecological Networks Connecting Tick Species

The cophylogenetic analysis revealed that some *Francisella*-LE haplotype groups are consistently associated with certain

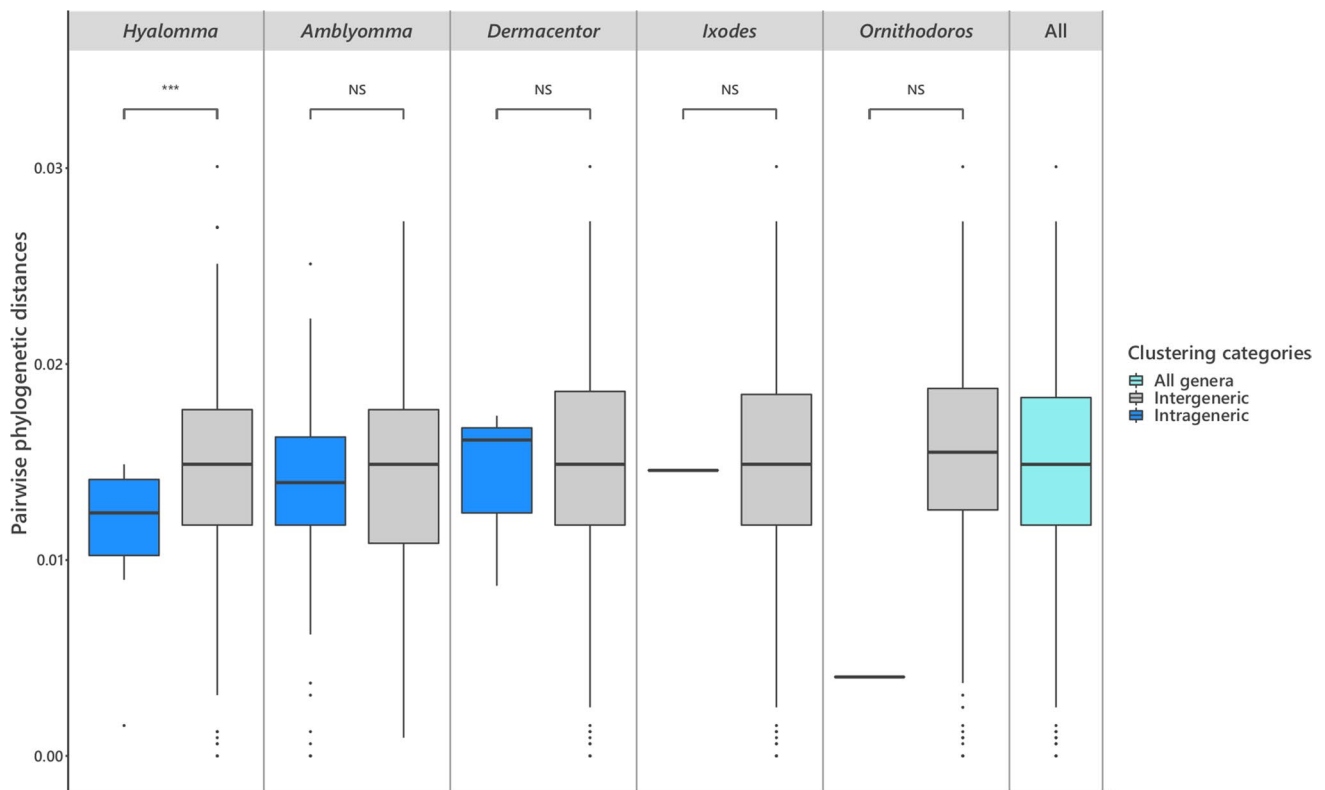


Fig. 3 Intragenetic and intergeneric pairwise phylogenetic distances of *Francisella*-LE haplotypes. Comparisons were conducted for each tick genus harboring more than one *Francisella*-LE haplotype. **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.001$; NS, not significant ($p > 0.05$)

tick genera, as *Amblyomma* and *Hyalomma*, suggesting a stable association with these ticks. However, the association of *Francisella*-LE with ticks is more complex: For instance, the infections found in some *Amblyomma* species are distantly related and do not form an *Amblyomma*-specific clade. Rather, phylogenetic analyses show that *Francisella*-LE of *Amblyomma* are actually scattered among *Francisella*-LE of other tick genera such as *Ixodes* and *Dermacentor*. Only extensive horizontal transfer of *Francisella*-LE among tick genera may explain these phylogenetic incongruences. Several lines of evidence indicate that related *Francisella*-LE haplotypes infect tick species that are ecologically interconnected. For instance, *Francisella*-LE haplotypes are deeply isolated by geographic barriers: Considerations of phylogenetic distributions revealed a strong split between *Francisella*-LE haplotypes from Eastern Hemisphere and Western Hemisphere. Furthermore, while the effect of tick feeding preference on association with *Francisella*-LE haplotypes is globally non-significant, some cases indicate that tick species can harbor related *Francisella*-LE haplotypes if they feed on the same vertebrate type: The *A. paulopunctatum*, *O. moubata*, and *O. porcinus* ticks are phylogenetically distantly related but they are all African species specialized on Suidae (pigs, warthogs) and harbor very closely related *Francisella*-LE haplotypes. Other noteworthy examples

include the *Dermacentor* and *Ixodes* genera, with species that all feed, at least partially, on mammals. The *Dermacentor* and *Ixodes* genera are distantly related since they belong to two divergent lineages within the Ixodidae (hard ticks) family: Metastrata and Prostrata, respectively. However, the *Francisella*-LE of American *Dermacentor* species, *D. occidentalis* and *D. nitens*, are more closely related to the *Francisella*-LE of an American *Ixodes* species, *I. scapularis*, than to the *Francisella*-LE of a European *Dermacentor* species, *D. reticulatus*. In the same way, the *Francisella*-LE of a European *Ixodes* species, *I. ricinus*, is more closely related to the European *D. reticulatus* than to the American *I. scapularis*. Altogether, this shows that similar ecologies and similar geographical distributions facilitate the horizontal transfer of *Francisella*-LE across tick species. As a result, the structure of tick communities is a major driver of *Francisella*-LE horizontal transfers.

The importance of intimate ecological contacts for *Francisella*-LE horizontal transfers may be favored by traits inherited from their pathogenic *Francisella* ancestor. *Francisella*-LE were occasionally detected in the salivary glands of several tick species [13, 24, 43, 44], suggesting that ticks could inject these endosymbionts during feeding. Ticks, unlike other arthropod vectors, often attach and aggregate on vertebrates for several days to obtain a blood

meal, a process termed “co-feeding”. The spatiotemporal proximity of ticks during co-feeding may favor the horizontal transfers of *Francisella*-LE between different tick species, as commonly observed for tick-borne pathogens [45, 46]. This process could also potentially lead to opportunistic infections in vertebrates, but such infection by *Francisella*-LE was only documented once and under laboratory conditions: The *Francisella*-LE of the soft tick *A. arboreus*, *F. persica*, was isolated following injection of a tick crushed into chick embryo yolk sacs, suggesting that it may be an opportunistic pathogen able to grow in vertebrate cells [47]. Using artificial infection protocols, *F. persica* was also shown to be slightly moderately pathogenic for the guinea pig, mouse, and newborn chick, but not for the cotton rat, adult chicken, or rabbit [47]. Interestingly, the genome of *F. persica*, but not those of other sequenced *Francisella*-LE, contains genes of the type VI secretion system (T6SS), and its associated *Francisella* pathogenicity island (FPI) [13] which are used for *Francisella* pathogenic species such as *F. tularensis* to infect macrophages of vertebrates [48, 49]. Certain *Francisella*-LE may thus induce opportunistic infections in vertebrates through their T6SS and FPI virulence genes and use vertebrates as an ecological arena for transfer across tick species.

Specificity of *Francisella*-LE in Some Tick Genera

We observed related *Francisella*-LE haplotypes in *Hyalomma* tick species and, to a lesser extent, *Amblyomma* genera. Because of maternal inheritance, co-divergence between *Francisella*-LE and ticks may explain this pattern, as recently observed in the *Hyalomma* genus [24]. However, multiple lines of evidence indicate that in *Amblyomma*, it was the consequence of multiple horizontal transfers between congeneric species rather than of co-divergence. For instance, *A. goeldi* and *A. humerale* harbored closely related *Francisella*-LE haplotypes although they are not closely related species within the *Amblyomma* genus [7]. A similar pattern is also observed with the *Francisella*-LE haplotype #6 found in *A. dissimile*, *A. geayi*, and *A. latepunctatum* that are not related tick species although they belong to the same genus [7]. Co-divergence alone is thus insufficient to explain why related *Francisella*-LE haplotypes are present in certain tick genera such as *Amblyomma*. The pattern observed suggests instead that some *Francisella*-LE are specific to related tick species, preferentially moving horizontally among congeneric species. Under this scenario, *Francisella*-LE may be preadapted to infect related tick species because they share similar physiological traits with their current tick hosts, a pattern also observed in endosymbionts of other arthropod species [26, 27]. Thus, certain *Francisella*-LE may have the

capacity to maintain infections in only a limited range of related tick species. This level of specificity seems variable depending on *Francisella*-LE haplotypes: High in some tick genera (*Hyalomma*, *Ornithodoros*, *Amblyomma*), but not in others (*Dermacentor*, *Ixodes*). As such, this diversity of specificity levels should impact movements of *Francisella*-LE across tick communities. However, it is also important to point out that association of some *Francisella*-LE haplotypes restrictively to a particular tick genus may not imply specificity, as suggested by the presence of a *Francisella*-LE haplotype in *R. decoloratus* closely related to haplotypes found in *Hyalomma* species. Instead, it could simply reflect a higher chance of *Francisella*-LE transfer and successful establishment of the endosymbiosis among interconnected tick species: *Hyalomma* species examined here were from the Eastern Hemisphere, as *R. decoloratus*. Hence, the pattern of *Francisella*-LE diversity observed in *Hyalomma* could reflect geographical structuring (as discussed above) rather than tick specificity.

Underestimation of *Francisella*-LE Diversity

It is our prediction that, despite recent genotyping efforts (including the present study), the diversity of *Francisella*-LE is underestimated. Our sampling was highly biased towards obligate *Francisella*-LE since they are fixed in tick populations, and thus more easily sampled. Inversely, facultative *Francisella*-LE have more variable infection frequencies in tick populations [7, 8], and they are rarely detected. For instance, surveys of 91 specimens of the African blue tick *R. decoloratus* from five distinct populations detected the presence of *Francisella*-LE in only one specimen [8]. This means that we have probably typed the diversity of obligate *Francisella*-LE well, but only of a small fraction of facultative *Francisella*-LE. Accounting for these missed facultative *Francisella*-LE, a large diversity of facultative *Francisella*-LE may be widely circulating, but at low infection frequencies, within tick communities.

Facultative *Francisella*-LE are probably pivotal to establishing novel endosymbioses. In arthropods, obligate endosymbionts commonly enter into an evolutionary route that leads to irreversible codependence with hosts and the secondary loss of the capability to move horizontally between host species [4, 5]. Conversely, facultative endosymbionts have more labile interactions with their hosts and undergo occasional horizontal transfers across arthropod species [4, 5], as commonly observed for diverse endosymbionts in ticks [8, 50, 51]. This suggests that novel nutritional *Francisella*-LE symbioses are initiated by facultative forms that further evolved to obligate forms. Once established as obligate endosymbionts, *Francisella*-LE may, however, enter into the same evolutionary route that limits any further horizontal transfers. The mixed facultative and obligate forms

on the *Francisella*-LE tree with no clear phylogenetic signal of clustering suggests that the transition from facultative to obligate forms is a common feature for these endosymbionts.

Concluding Remarks

This study confirmed that nutritional symbiosis in ticks is not a stable evolutionary state, but rather a dynamic system impacted by repeated acquisition of novel potential nutritional endosymbionts through horizontal transfers. Such an evolutionary succession of nutritional symbionts is more widespread than previously appreciated. In louse flies, it was observed with the recent acquisition of a *Sodalis* endosymbiont [52]. In sucking lice, there are independent lineages of B-vitamin-provisioning endosymbionts [53–56], suggesting several replacement events. Such pattern was also commonly observed in sap-feeding insects as in *Cinara* aphids [57] or Coccoidea scale insects [58] which display varied nutritional symbioses, reflecting repeated symbiont acquisitions, replacements, and losses. However, while it is clear that horizontal transfers create opportunity for new nutritional endosymbiosis to emerge, the biological features favoring the transfers are unclear. In this study, we have determined that ecological networks within tick communities, along with variable levels of *Francisella*-LE specificity to their current tick hosts, are important drivers of this symbiont's dynamics. These endosymbionts notably combine maternal inheritance with infectious transmission between tick species in a number of cases but also potentially using vertebrates as occasional hosts. The overall probability that such tick-to-vertebrate transfers of *Francisella*-LE occur may be high because ticks are found worldwide and feed on many different hosts. However, apart from cases obtained in artificial conditions with *F. persica* [47], all other *Francisella*-LE described to date seem to be confined to ticks. Nonetheless, future research will be necessary to describe the global diversity of *Francisella*-LE, to characterize the presence of virulence genes in their genomes, and then to assess the potential infection risk to vertebrates. Further investigation on endosymbiont genomes may also reveal the mechanisms providing the advantage to *Francisella*-LE over *Coxiella*-LE. Beyond B vitamins, the replacement of *Coxiella*-LE suggests that *Francisella*-LE could supply an additional benefit that *Coxiella*-LE was unable to supply to ticks, thereby out-competing them. The genomes of some *Coxiella*-LE have lost most of their gene contents, being usually small in size and dense in gene content but also suffering Muller's ratchet, with fixation of deleterious mutations through genetic drift [1]. *Coxiella*-LE may have evolved overly reduced (degraded) genomes and become maladapted, opening the road to replacement by a *Francisella*-LE.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01773-0>.

Acknowledgements We thank D. Ayala, C. Chevillon, F. Delsuc, B. de Thoisy, S. Garnier, H. Hawlena, Q. Lejarre, K. McCoy, C. Paupy, O. Plantard, N. Rahola, S. Moutailler, C. Galon, and L. Vial.

Author Contribution Y.G. and O.D. designed the study. M.B., Y.G., and O.D. wrote the manuscript. M.B., F.B., and R.L. performed the molecular typing. M.B. and O.D. performed the phylogenetic and statistical analyses. All authors agreed on the final version of the manuscript.

Funding This work has benefited from (1) an international grant (EVO-SYM) co-managed by the Ministry of Science, Technology and Space (Israel) and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France), from (2) "Investissements d'Avenir" managed by the Agence Nationale de la Recherche (ANR, France, Laboratoire d'Excellence CEBA, ANR-10-LABX-25-01), and from (3) the Israel Science Foundation (ISF grant No. 1074/18).

Data Availability Nucleotide sequences of *Francisella*-LE were deposited in the GenBank nucleotide database (16S rRNA: MW287912-MW287986; *rpoB*: MW286019-MW286093; *groEL*: MW285869-MW285943; *ftsZ*: MW285794-MW285868; *gyrB*: MW285944-MW286018).

Code Availability Scripts used for the statistical analyses are available on GitHub (<https://github.com/mariebuysse/pending>).

Declarations

Conflict of Interest The authors declare no competing interests.

References

- Duron O, Gottlieb Y (2020) Convergence of nutritional symbioses in obligate blood-feeders. *Trends Parasitol*. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.07.007>
- Moran NA, McCutcheon JP, Nakabachi A (2008) Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Ann Rev Genet* 42:165–190. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130119>
- Wernegreen JJ (2012) Endosymbiosis. *Curr Biol* 22:555–561. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.06.010>
- Bennett GM, Moran NA (2015) Heritable symbiosis: the advantages and perils of an evolutionary rabbit hole. *PNAS* 112:10169–10176. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421388112>
- McCutcheon JP, Boyd BM, Dale C (2019) The life of an insect endosymbiont from the cradle to the grave. *Curr Biol* 29:485–495. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.03.032>
- Sudakaran S, Kost C, Kaltenpoth M (2017) Symbiont acquisition and replacement as a source of ecological innovation. *Trends Microbiol* 25. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.02.014>
- Binetruy F, Buysse M, Lejarre Q et al (2020) Microbial community structure reveals instability of nutritional symbiosis during the evolutionary radiation of *Amblyomma* ticks. *Mol Ecol* 29:1016–1029. <https://doi.org/10.1111/mec.15373>
- Duron O, Binetruy F, Noel V et al (2017) Evolutionary changes in symbiont community structure in ticks. *Mol Ecol* 26:2905–2921. <https://doi.org/10.1111/mec.14094>

9. Gerhart JG, Auguste Dutcher H, Brenner AE et al (2018) Multiple acquisitions of pathogen-derived *Francisella* endosymbionts in soft ticks. *Genome Biol Evol* 10:607–615. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy021>
10. Sterkel M, Oliveira JHM, Bottino-Rojas V, et al (2017) The dose makes the poison: Nutritional overload determines the life traits of blood-feeding Arthropods. *Trends Parasitol* 33:633–644. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.04.008>
11. Gulia-Nuss M, Nuss AB, Meyer JM, et al (2016) Genomic insights into the *Ixodes scapularis* tick vector of Lyme disease *Nat Commun* 7 <https://doi.org/10.1038/ncomms10507>
12. Jia N, Wang J, Shi W et al (2020) Large-scale comparative analyses of tick genomes elucidate their genetic diversity and vector capacities. *Cell* 182(1328):1340.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.023>
13. Duron O, Morel O, Noël V et al (2018) Tick-bacteria mutualism depends on B vitamin synthesis pathways. *Curr Biol* 28:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.04.038>
14. Gerhart JG, Moses AS, Raghavan R (2016) A *Francisella*-like endosymbiont in the Gulf Coast tick evolved from a mammalian pathogen. *Sci Rep* 6:1–6. <https://doi.org/10.1038/srep33670>
15. Gottlieb Y, Lalzar I, Klasson L (2015) Distinctive genome reduction rates revealed by genomic analyses of two *Coxiella*-like endosymbionts in ticks. *Genome Biol Evol* 7:1779–1796. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv108>
16. Guizzo MG, Parizi LF, Nunes RD et al (2017) A *Coxiella* mutualist symbiont is essential to the development of *Rhipicephalus microplus*. *Sci Rep* 7:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17309-x>
17. Smith TA, Driscoll T, Gillespie JJ, Raghavan R (2015) A *Coxiella*-like endosymbiont is a potential vitamin source for the lone star tick. *Genome Biol Evol* 7:831–838. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv016>
18. Tsementzi D, Castro Gordillo J, Mahagna M et al (2018) Comparison of closely related, uncultivated *Coxiella* tick endosymbiont population genomes reveals clues about the mechanisms of symbiosis. *Environ Microbiol* 20:1751–1764. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14104>
19. Ben-Yosef M, Rot A, Mahagna M et al (2020) *Coxiella*-Like endosymbiont of *Rhipicephalus sanguineus* is required for physiological processes during ontogeny. *Front Microbiol* 11:1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00493>
20. Duron O, Noël V, McCoy KD et al (2015) The recent evolution of a maternally-inherited endosymbiont of ticks led to the emergence of the Q fever pathogen, *Coxiella burnetii*. *PLoS Pathog* 11:1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004892>
21. Li L-H, Zhang Y, Zhu D (2018) Effects of antibiotic treatment on the fecundity of *Rhipicephalus haemaphysaloides* ticks. *Parasit Vectors* 11:242. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2807-7>
22. Zhang C-M, Li N-X, Zhang T-T et al (2017) Endosymbiont CLS-HI plays a role in reproduction and development of *Haemaphysalis longicornis*. *Exp Appl Acarol* 73:429–438. <https://doi.org/10.1007/s10493-017-0194-y>
23. Zhong J, Jasinskas A, Barbour AG (2007) Antibiotic treatment of the tick vector *Amblyomma americanum* reduced reproductive fitness. *PLoS ONE* 2:1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000405>
24. Azagi T, Klement E, Perlman G et al (2017) *Francisella*-like endosymbionts and *Rickettsia* species in local and imported *Hyalomma* ticks. *Appl Environ Microbiol* 83:1–14
25. Lalzar I, Harrus S, Mumcuoglu KY, Gottlieb Y (2012) Composition and seasonal variation of *Rhipicephalus turanicus* and *Rhipicephalus sanguineus* bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* 78:4110–4116. <https://doi.org/10.1128/AEM.00323-12>
26. Baldo L, Ayoub NA, Hayashi CY et al (2008) Insight into the routes of *Wolbachia* invasion: high levels of horizontal transfer in the spider genus *Agelenopsis* revealed by *Wolbachia* strain and mitochondrial DNA diversity. *Mol Ecol* 17:557–569. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03608.x>
27. Russell JA, Moreau CS, Goldman-Huertas B et al (2009) Bacterial gut symbionts are tightly linked with the evolution of herbivory in ants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:21236–21241. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907926106>
28. Duron O, Wilkes TE, Hurst GDD (2010) Interspecific transmission of a male-killing bacterium on an ecological timescale. *Ecol Lett* 13:1139–1148. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01502.x>
29. Vavre F, Fleury F, Lepetit D et al (1999) Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Mol Biol Evol* 16:1711–1723. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026084>
30. Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5:150–163. <https://doi.org/10.1093/bib/5.2.150>
31. Sjödin A, Svensson K, Öhrman C, et al (2012) Genome characterisation of the genus *Francisella* reveals insight into similar evolutionary paths in pathogens of mammals and fish. *BMC Genomics* 13 <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-268>
32. Castresana J (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* 17:540–552. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334>
33. Martin DP, Lemey P, Lott M et al (2010) RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* 26:2462–2463. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq467>
34. Burger TD, Shao R, Beati L et al (2012) Phylogenetic analysis of ticks (Acari: Ixodida) using mitochondrial genomes and nuclear rRNA genes indicates that the genus *Amblyomma* is polyphyletic. *Mol Phylogenet Evol* 64:45–55. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.03.004>
35. Balbuena JA, Míguez-Lozano R, Blasco-Costa I (2013) PACo: a novel procrustes application to cophylogenetic analysis. *PLoS ONE* 8 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061048>
36. Paradis E, Claude J, Strimmer K (2004) APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20:289–290. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg412>
37. Oksanen AJ, Blanchet FG, Friendly M et al (2013) Vegan: community ecology package. *Package Vegan*
38. Fritz SA, Purvis A (2010) Selectivity in mammalian extinction risk and threat types: a new measure of phylogenetic signal strength in binary traits. *Conserv Biol* 24:1042–1051. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2010.01455.x>
39. Felsenstein J (1985) Phylogenies and the comparative method. *Am Nat* 125:1–15. <https://doi.org/10.1086/284325>
40. Orme D, Freckleton R, Thomas G et al (2013) The caper package: comparative analysis of phylogenetics and evolution in R. *R Packag version* 5:1–36
41. Hochberg Y (1988) A sharper Bonferroni procedure for multiple tests of significance. *Biometrika* 75:800–802. <https://doi.org/10.1093/biomet/75.4.800>
42. Kugeler KJ, Mead PS, McGowan KL et al (2008) Isolation and characterization of a novel *Francisella* sp. from human cerebrospinal fluid and blood. *J Clin Microbiol* 46:2428–2431. <https://doi.org/10.1128/JCM.00698-08>
43. Budachetri K, Browning RE, Adamson SW et al (2014) An insight into the microbiome of the *Amblyomma maculatum* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 51:119–129. <https://doi.org/10.1603/me12223>
44. Liu JN, Yu ZJ, Liu LM et al (2016) Identification, distribution and population dynamics of *Francisella*-like endosymbiont in

- Haemaphysalis doenitzii* (Acari: Ixodidae). Sci Rep 6:1–9. <https://doi.org/10.1038/srep35178>
45. Wright CL, Sonenshine DE, Gaff HD, Hynes WL (2015) *Rickettsia parkeri* transmission to *Amblyomma americanum* by co-feeding with *Amblyomma maculatum* (Acari: Ixodidae) and potential for spillover. J Med Entomol 52:1090–1095. <https://doi.org/10.1093/jme/tjv086>
 46. Voordouw MJ (2015) Co-feeding transmission in Lyme disease pathogens. Parasitology 142:290–302. <https://doi.org/10.1017/S0031182014001486>
 47. Saito EC, Weiss E (1961) Isolation of a Rickettsialike microorganism (*Wolbachia persica*, n. sp.) from *Argas persicus* (Oken). J Infect Dis 108:95–106. <https://www.jstor.org/stable/30099293>
 48. Barker JR, Chong A, Wehrly TD et al (2009) The *Francisella tularensis* pathogenicity island encodes a secretion system that is required for phagosome escape and virulence. Mol Microbiol 74:1459–1470. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06947.x>
 49. Nano FE, Scherck C (2007) The *Francisella* pathogenicity island. Ann N Y Acad Sci 1105:122–137. <https://doi.org/10.1196/annals.1409.000>
 50. Binetruy F, Bailly X, Chevillon C et al (2019) Phylogenetics of the *Spiroplasma ixodetis* endosymbiont reveals past transfers between ticks and other arthropods. Ticks Tick Borne Dis 10:575–584. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.02.001>
 51. Buysse M, Duron O (2018) Multi-locus phylogenetics of the Midichloria endosymbionts reveals variable specificity of association with ticks. Parasitology 1–10 <https://doi.org/10.1017/S0031182018000793>
 52. Šochová E, Husník F, Nováková E et al (2017) *Arsenophonus* and *Sodalis* replacements shape evolution of symbiosis in louse flies. PeerJ 2017:1–23. <https://doi.org/10.7717/peerj.4099>
 53. Boyd BM, Allen JM, Nguyen NP et al (2017) Primates, lice and bacteria: speciation and genome evolution in the symbionts of hominid lice. Mol Biol Evol 34:1743–1757. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx117>
 54. Allen JM, Burleigh JG, Light JE, Reed DL (2016) Effects of 16S rDNA sampling on estimates of the number of endosymbiont lineages in sucking lice. PeerJ 2016. <https://doi.org/10.7717/peerj.2187>
 55. Hypša V, Křížek J (2007) Molecular evidence for polyphyletic origin of the primary symbionts of sucking lice (Phthiraptera, Anoplura). Microb Ecol 54:242–251. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9194-x>
 56. Říhová J, Nováková E, Husník F, Hypša V (2017) *Legionella* becoming a mutualist: adaptive processes shaping the genome of symbiont in the louse *Polyplax serrata*. Genome Biol Evol 9:2946–2957. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx217>
 57. Manzano-Marín A, Coeur d’acier A, Clamens AL, et al (2020) Serial horizontal transfer of vitamin-biosynthetic genes enables the establishment of new nutritional symbionts in aphids’ di-symbiotic systems. ISME J 14:259–273. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0533-6>
 58. Rosenblueth M, Sayavedra L, Sámano-Sánchez H et al (2012) Evolutionary relationships of flavobacterial and enterobacterial endosymbionts with their scale insect hosts (Hemiptera: Coccoidea). J Evol Biol 25:2357–2368. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02611.x>

Poster réalisé dans le cadre de l'ISS10/Holobiont3 :

TICKS AND THEIR NUTRITIONAL PARTNERS

When tick metagenomes do their bit

Buyse Marie^{1,2} and Duron Olivier^{1,2}

¹ UMR MIVEGEC (CNRS-UM-IRD), Montpellier, France

² Montpellier Ecology and Evolution of Disease Network (MEEDIN), France

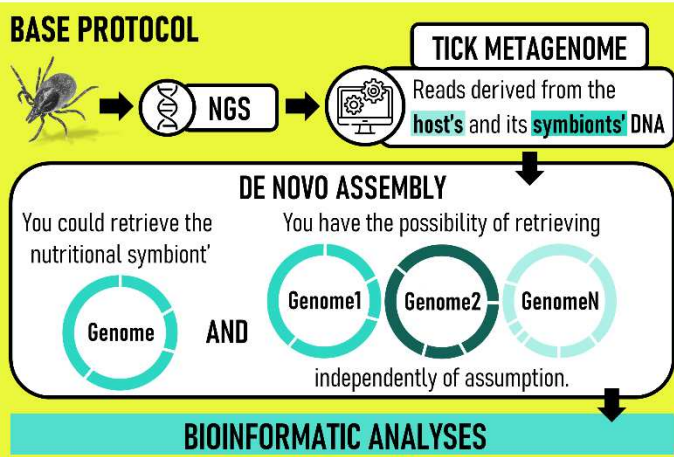
CONTEXT

Ok, ticks are infected by tick-borne pathogens (TBP) but not only...

Contrary to mosquitoes, ticks only fed on blood and rely on bacterial endosymbionts, called **obligate nutritional symbionts**, to supplement them in B vitamins and components.

Multiple bacterial genera are associated with ticks as nutritional symbionts. Usually each tick species is infected by **one main symbiont**, presenting **specific interactions** and **co-evolution processes**.

Partners' genomes contain insights on their interaction. As these bacteria are uncultivable, obtaining their genomes remains challenging and nowadays **tick metagenomes** are the best lead to start with.



PROJECTS

Project A

Reanalyzing published metagenomes of 6 ticks species that reported high prevalence of TBP and no/low prevalence of expected nutritional symbionts³. Interestingly, the TBP reported and the symbionts expected are from same genera but different species. **Were there some misidentifications?**

Project B

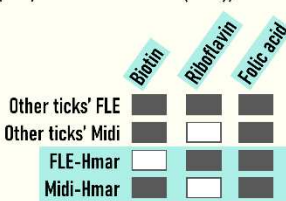
Studying metagenomes from a tick species that seem infected by two nutritional symbionts at once.

Did this tick species harbors a dual-partner system? Why?

RESULTS OF PROJECT B

In *Hyalomma marginatum*, we evidenced two symbionts (*Francisella*-like (FLE) and *Midichloria* (Midi)). In their genomes, we searched for their ability

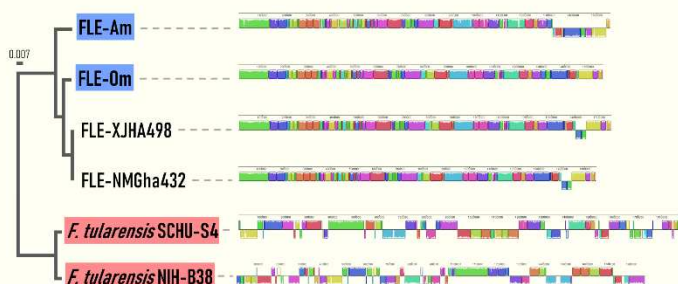
to encode pathways of 3 majors B vitamins and compared them to other representatives in ticks.



FLE-Hmar exhibits extensive genome erosion that endangers the nutritional symbiotic interactions (no functional biotin biosynthesis), but Midi-Hmar encompasses an intact biotin operon. By comparing this operon with those of other bacteria, it seems primarily acquired via HGT from unrelated intracellular bacteria commonly infecting arthropods.

RESULTS OF PROJECT A

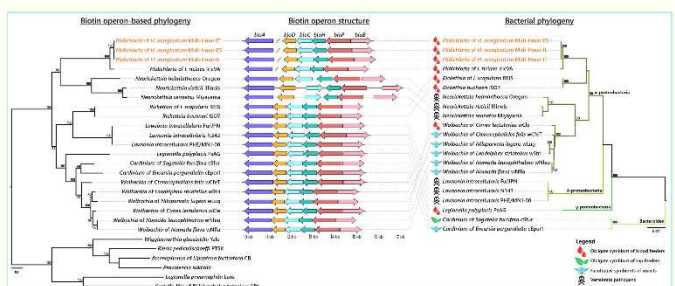
First, we phylogenetically assigned our obtained bacterial genomes based on comparison with genomes of TBP and tick nutritional symbionts from the same genera (here *Francisella*) and examined their genome structure.



To discuss their phenotype, we determined the completeness of virulence genes and metabolic pathways involved in the nutritional symbiosis (B vitamins).

	Virulence	B vitamins
SCHU-S4	Complete genes	Complete genes
FLE-Am	Pseudogenized genes	Complete genes
FLE-0m	Complete genes	Complete genes
FLE-XJHA498	Complete genes	Complete genes
FLE-NM6ha432	Complete genes	Complete genes

Phylogenomics and genomic content/structure supported that nutritional symbionts were misidentified as TBP. Only few TBP were reported. (Buyse and Duron, Cell, 2021⁴)



In *H. marginatum*, a mosaic of co-evolved symbionts incorporating gene combinations of distant phylogenetic origins emerged to prevent the collapse of an ancestral nutritional symbiosis. (Buyse, Floriano and al., eLife, 2021⁵)

DISCUSSION AND PERSPECTIVES

Being unfocused on a particular microbe, tick metagenomes revealed themselves powerful tools to investigate the **mosaic of interactions between ticks and their nutritional endosymbionts**. Those analyses could be extended to other symbionts as pathogen or facultative ones.

Metagenomes allow to retrieve genomic information from both a single tick individual and its symbionts, a perspective to further analyses.

If number of bioinformatic tools is expanding, we need to **remain aware of their limits** to avoid incorrect assumptions and choose correct **combinations of tools** to our goals.

³ doi:10.1016/j.cell.2020.07.023

⁴ doi:10.1016/j.cell.2021.03.053 ⁵ doi:10.7554/eLife.72747



Appels à projet obtenus dans le cadre de la thèse

[1] Appel à projet du Labex CeMEB « Equipes de Recherche Junior » – projet MISTICKS (Microbial Symbioses in TICKS) porté par Marie Buysse et encadré par Olivier Duron

Recrutement et encadrement d'un étudiant de Master 1 pour une durée de 6 mois et gestion d'un budget de 6000€

Le microbiome des tiques se compose d'endosymbiotes transmis verticalement, d'autres potentiellement acquis lors d'un repas sanguin (agents pathogènes, à transmission horizontale) et aussi de microorganismes environnementaux. Ainsi, le microbiome des tiques est complexe, dynamique à l'échelle du cycle de vie des individus et variable entre les espèces. Pour comprendre la dynamique de ces associations microbiennes, il est important d'établir parmi ces symbiotes lesquels sont transmis entre générations et, si oui, dans quelle proportion. La recherche de l'étudiant en master constituait à caractériser les taux de transmission maternelle des symbiotes de tiques, ainsi que la stabilité évolutive de cette transmission. Dans ce but, l'étudiant a été chargé tout d'abord de décrire le microbiome des individus de trois espèces de tiques Européennes, *Ixodes ricinus*, *Dermacentor marginatus* et *D. reticulatus*, pour lesquelles nous avons plusieurs populations déjà échantillonnées par une approche de barcoding basé sur l'amplification du 16S rRNA. Nous avons notamment dans ces collections des femelles accompagnées de leurs descendances pour plusieurs populations, nous avons donc pu comparer le microbiome des mères avec celui de leurs œufs (en individuel, à raison de 10 œufs par mère). La comparaison du microbiome des femelles et de leurs descendants a permis de déterminer les taux de transmission de chaque symbiote au sein des populations. Nous avons également étudié si ces taux variaient pour un même symbiote entre les différentes populations et espèces de tiques. Dans un second temps, nous prévoyons d'évaluer la stabilité évolutive des patrons de transmission maternelle en examinant l'association entre les microbiomes et les lignées maternelles de tiques. Pour les mêmes individus qu'utilisés précédemment, l'étudiant a séquencé

le mitogénome complet par une approche d'amplifications (PCR) longs fragments associée à un séquençage MiSeq. Des analyses statistiques (test de Mantel, par exemple) nous permettront ensuite d'examiner la corrélation entre les lignages mitochondriaux de tiques et la présence de certains symbiotes. Une corrélation positive serait ainsi un indicateur de la stabilité de l'association symbiotique.

Ce projet financé, porté entre mars et août 2021, a permis le recrutement et la formation de la stagiaire M1 Justine GRILLET et s'est traduit par la validation de plusieurs protocoles (études de metabarcodes œuf par œuf, javelés ; protocoles d'amplification de mitogénomes complets pour trois espèces de tiques). La première partie des analyses sur la caractérisation du microbiome des différentes populations de tiques et sur la transmission du microbiome a pu être réalisée en parallèle des travaux de thèse. Les résultats concernant l'association microbiome – lignées maternelles seront traités prochainement. L'ensemble de ces résultats fera l'objet de deux publications qui seront écrites durant l'année 2023.

Il est à noter que sur la base de ce projet MISTICKS nous avons également comparé et analysé le microbiome mère – œufs pour d'autres espèces de tiques, notamment des espèces du genre *Ixodes* : *I. hexagonus*, *I. frontalis* et *I. ventralloi*.

[2] Appel à projet en partenariat avec Montpellier Université d'Excellence « Bourse de master conjoint KIM RIVE / RIVOC » – projet PHYLOTIQUE (Phylosymbiose chez les tiques) porté par Olivier Duron et Marie Buysse

Recrutement et encadrement d'un étudiant de Master 1 pour une durée de 6 mois

Les vecteurs sont les hôtes de communautés de microorganismes constituées d'agents pathogènes de vertébrés, mais également de symbiotes non pathogènes pouvant assurer des fonctions biologiques essentielles. Chez les tiques, ces deux types de microorganismes coexistent fréquemment, mais la majorité des études se focalisent sur les agents pathogènes ou, plus rarement, sur un symbiote en particulier. Aujourd'hui, il manque une vision globale de ces communautés microbiennes, notamment de l'importance des processus coévolutifs dans leur structuration. Ainsi, la composition spécifique de ces microbiomes pourrait être le fruit de millions d'années de coévolution entre les microbes qui les composent et les tiques. Sous cette hypothèse, dite de phylosymbiose, des espèces phylogénétiquement proches de tiques devraient présenter des microbiomes similaires. Ces processus de phylosymbiose n'ont à ce jour été pratiquement jamais été recherchés chez les tiques. Cette recherche est pourtant essentielle pour déterminer l'importance des microbiomes dans l'écologie et l'évolution des tiques. L'objectif du projet PHYLOTIQUE est de déterminer si des processus de phylosymbiose structurent, au moins en partie, la diversité bactérienne totale hébergée par les tiques. Pour cela, nous avons choisi de nous focaliser sur les tiques du genre *Ixodes*, qui regroupe des vecteurs majeurs d'agents de maladies à tiques zoonotiques comme *Ixodes ricinus*, le vecteur de l'agent de la maladie de Lyme, mais également des espèces ne se nourrissant principalement que sur la faune sauvage comme *Ixodes hexagonus* et *Ixodes ventralloi*. Cette diversité permet au projet PHYLOTIQUE d'avoir une approche écologique large (i.e. non centrée sur les espèces d'intérêt médical), et ainsi d'avoir une vision globale de l'évolution des communautés bactériennes et de leur impact sur l'écologie et l'évolution des tiques. Le projet porte sur l'étude de 12 espèces de tique du genre *Ixodes*. De 5 à 20 individus ont été examinés par espèces, suivant les disponibilités. Un métabarcodage bactérien 16S rRNA avait été effectué en amont du stage, dans des conditions standardisées pour ces

individus. Dans un premier temps, le travail de l'étudiant consistait à réaliser une phylogénie moléculaire des tiques du genre *Ixodes*. Cette phylogénie est encore imparfaitement documentée dans la littérature (qui est biaisée vers les espèces d'intérêt médical vétérinaire, et ne considère toutes les espèces incluses dans notre étude). Pour ce faire, l'étudiant et ses encadrants ont travaillé à la mise au point de protocoles d'amplification de mitogénomes complets. En 2021, nous avons mis au point une méthode à cette fin sur *Ixodes ricinus* : nous amplifions par PCR long range deux grands fragments recouvrant d'ADNmt (7 et 9 kb, respectivement) qui sont ensuite séquencés avec la technologie Illumina. Le génome mitochondrial complet est ensuite reconstruit pour chaque individu par bioinformatique, et ces séquences servent ensuite à construire les phylogénies suivant la méthode de maximum de vraisemblance. Ici, manquant de séquences de référence pour produire des primers spécifiques, le premier travail de l'étudiant a été d'amplifier et séquencer deux gènes mitochondriaux (*col* et *nad4*) chez les différentes espèces de tiques (hors *I. ricinus*). Les différentes séquences ont ensuite été le support pour la mise au point et l'optimisation des protocoles d'amplification des mitogénomes complets. Dans un deuxième temps, l'étudiant a commencé à comparer la phylogénie moléculaire produite à partir des séquences du gène *col* aux microbiomes des individus. Pour cette partie nous avons testé la significativité des associations, par exemple en contrastant la phylogénie des tiques avec les données de diversité microbiennes individuelles avec des tests de Mantel. Notre but est d'aller plus loin en réalisant des phylogénies des bactéries dominantes présentes chez les tiques, notamment celles appartenant à l'ordre des Rickettsiales (la littérature les décrit comme très présentes chez les tiques *Ixodes*). Nous avons déjà des protocoles de typage multi-locus pour ces Rickettsiales, Des tests de cophylogénie permettront de déterminer si les phylogénies des tiques et des Rickettsiales sont interdépendantes.

Ce projet financé, porté entre mars 2022 et août 2022, a permis le recrutement et la formation du stagiaire M1 Julien AMOROS. Il se poursuit aujourd'hui par la finalisation des amplifications des mitogénomes complets. Des premières analyses préliminaires à partir de la phylogénie du gène *col* et des analyses de communautés microbiennes des 12 espèces de tiques mettraient en évidence l'existence d'un signal phylogénétique. Ces résultats seront traités et feront l'objet d'une publication qui sera écrite durant l'année 2023.