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

En Biologie des Interactions

École doctorale GAIA

Unité de recherche mixte ASTRE, CIRAD et INRAE

Caractérisation des risques sanitaires liés à l'installation de la tique *Hyalomma marginatum* dans le sud de la France : possibilité d'émergence du virus de la Fièvre Hémorragique de Crimée-Congo

Présentée par Célia BERNARD
Le 20 octobre 2023

Sous la direction de Philippe HOLZMULLER
Et la co-direction de Laurence VIAL

Devant le jury composé de

Sarah Bonnet, Directrice de Recherche, INRAE	Rapportrice
Mohamed Gharbi, Professeur (PU-PH), Université de Manouba	Rapporteur
Annelise Tran, Chargée de recherche, CIRAD	Examinatrice
Jean-François Guégan, Directeur de Recherche de classe exceptionnelle, IRD, INRAE	Président du jury
Vincent Legros, Maître de conférences, Vetagro Sup	Examinateur
Philippe Holzmuller, Chargé de recherche, CIRAD	Directeur de thèse
Laurence Vial, Chargée de recherche, CIRAD	Co-directrice
Benoit Combes, Directeur, ELIZ	Invité
Matthieu Bastien, Chargé de mission, ELIZ	Invité

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Et un jour, ça se passe ~~mal~~ bien… 🥰

REMERCIEMENTS

Si seulement les mots pouvaient suffire à exprimer toute la gratitude que je ressens envers toutes les personnes qui ont pris part de près ou de loin à ce travail...

Je tiens à remercier ceux qui ont permis de réaliser ces travaux, l'ANRT et le FEDER Grand-Est pour la bourse qui m'a été accordée dans le cadre de cette CIFRE et la DGAl pour avoir participé au financement de la partie technique de la thèse et d'avoir permis de prolonger l'aventure de quelques mois.

Merci aux membres de mon comité de thèse, Sara Moutailler, Alessandra Falchi, Aurélie Binot et Catherine Moulia pour vos conseils avisés, votre soutien et votre bienveillance tout au long de cette thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers Sarah Bonnet et Mohamed Gharbi, qui ont généreusement accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. À l'heure où ces lignes sont écrites, ils ne mesurent pas encore l'étendue de leur contribution précieuse à ce manuscrit. Mes pensées se dirigent également vers Annelise Tran, Jean-François Guégan et Vincent Legros, qui, sans aucun doute, formeront un excellent jury.

Cette thèse a eu lieu au sein de l'Entente de Lutte et d'Intervention contre les Zoonoses (ELIZ) et le Centre de coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) à l'UMR ASTRE où j'ai passé le plus clair de mon temps. Merci à ces deux organismes de m'avoir fait confiance et d'avoir permis que cette thèse se déroule dans les meilleures conditions possibles et merci à Nathalie Vachiery de m'avoir accueillie dans son unité.

A ELIZ, malgré la distance, merci de m'avoir toujours fait confiance et de m'avoir laissé une extrême liberté dans ce que je faisais à Montpellier. C'est toujours un plaisir de vous voir lors de divers évènements : conseils d'administration, réunions, congrès… M. Combes, merci pour vos encouragements, votre confiance et votre bonne humeur à chacune de nos rencontres durant ces quatre dernières années. Matthieu, merci pour ton soutien, ton expertise scientifique et pour tous ces moments partagés. Aussi, un grand merci à Stéphanie, ce fût un plaisir de te rencontrer et de partager ces moments aux conseils d'administration (tu as toujours fait preuve d'une grande patience quand je n'envoyais pas mes justificatifs de note de frais 😉). Enfin, Valentin, merci d'avoir partagé cette aventure avec moi, on s'est soutenu, aidé et conseillé, nous voilà sur la fin, bon courage pour ta soutenance qui approche !

A l'unité ASTRE, je vais commencer cette longue liste de remerciements, où j'espère tout le monde trouvera sa place, par ma direction de thèse. Un énorme merci à Laurence et philippe de m'avoir donné l'opportunité de travailler à vos côtés. Si tout le monde pouvait bénéficier d'un encadrement comme le vôtre l'univers du doctorat ne s'en porterait que mieux. Que ce soit d'un point de vue professionnel ou humain, vous êtes supers ! Grâce à vous, je deviens petit à petit un bébé chercheur, j'ai tellement appris en quelques années à vos côtés, merci infiniment. Pour tout cela, je ne peux, que, vous remercier chaleureusement et je ne vous serai jamais assez reconnaissante pour tout ce que vous avez fait pour moi.

- Laurence, je suis particulièrement fière et honorée d'avoir pu réaliser cette thèse avec une personne et une chercheuse comme toi. Tu as été et tu es toujours là dans les bons et les moins bons moments. Et la vie, durant ces dernières années, ne nous a pas rendu la tâche facile entre les multiples confinements et ton épaule ! Merci pour tout ce que tu as eu à m'offrir, ton temps, ta patience, tes conseils, ton expertise tique, ta bonne humeur et ta joie de vivre. On aura bien bossé mais surtout qu'est-ce qu'on aura rigolé, en mission et sur le terrain (en Corse, dans les PO, les Alpes-Maritimes, à Marseille, Nîmes, Bourges, en Roumanie et prochainement en Grèce), souvent accompagnées d'une part de quiche aux blettes. Ta bienveillance et ton écoute font de toi une personne formidable. Merci pour ces ~~3~~ 4 belles années, j'en garderais un souvenir impérissable.
- Philippe, merci beaucoup pour ces réunions chouquettes et ces moments de partage, personnels ou professionnels. Je ne suis pas familière du monde de la microbiologie et de l'immunologie mais grâce à toi, ces deux volets m'ont paru plus simple. Je te souhaite bien de belles choses pour la suite, au volant d'une Porsche, d'une 4L ou d'une 2CV 😇

Dans cette unité si accueillante, il y a tellement de personnes à remercier. A commencer par le bâtiment G (oui la jonction entre les deux bâtiments est toujours bien présente, les habitudes ont la vie dure). Ainsi, merci aux membres du Collectif Microbiologie de Montpellier et du Collectif Vecteur (j'aimerais tous vous citer mais je ne voudrais oublier personne et il ne faudrait pas que mes remerciements soient plus longs que mon manuscrit),

pour cette bonne humeur permanente qui règne dans ce bâtiment, les pauses café, l'entraide au laboratoire ou encore les sourires quand on se croise dans les couloirs. J'espère qu'après mon départ les éphémérides vont être maintenus et je compte sur Maxime D. pour continuer à inventer des « Journées internationales » et à Maxime P. de les illustrer. Quelques mercis particuliers pour :

- Ignace pour ta volonté à toute épreuve, tu es toujours partant pour tout. Merci pour les rigolades en session terrain, pour ta conduite en toute circonstance et pour tous tes t-shirts avec des lémuriens 🐿️
- Un énorme merci à Armelle, notre maman du laboratoire, qui a toujours réponse à la moindre de nos interrogations. Merci pour toutes nos discussions, pour tous ces beaux moments mais aussi pour m'avoir fait découvrir l'univers de la sérologie. Je suis ravie de soutenir le jour de ton anniversaire et je suis sûre que ça me portera bonheur
- Merci à Frédéric, pour avoir répondu à toutes mes questions sur les tiques et ces discussions passionnantes notamment sur l'île de Batz (un jour, on s'y croisera, qui sait)
- Merci également à Phonsiri pour ces longues journées dans notre belle salle séro à faire tout un tas de plaque.

Mais je tiens également à remercier les personnes présente dans le bâtiment E. Ca a toujours été un plaisir de vous croiser en réunion ou pour un pot ou une pause-café.

- Andrea, merci beaucoup pour ton aide sur les statistiques, ce n'était pas gagné, ce n'est pas vraiment mon fort mais tu as toujours réussi à m'expliquer et me faire comprendre ce que je devais faire 😊 (Tu vois j'ai écrit, maintenant apprêtes toi à m'entendre parler !)
- Claire, vraiment merci pour tout, ton temps, tes bons conseils et pour avoir fait en sorte que cette thèse se termine dans les meilleures conditions.

Et évidemment merci à tous ceux que je n'ai pas directement cités. Sachez que vous avez tous contribué à ce que cette thèse se passe au mieux et mille mercis pour cela. Merci à vous tous pour les moments de partage, pour les conseils avisés et pour les souvenirs que je garderai de ces quelques années. Passer quatre ans avec les mêmes personnes permet de créer des liens, et certains sont devenus plus que des collègues. Je ne vous remercierai jamais assez d'avoir été présents et d'avoir fait que ce lieu de travail devienne comme une deuxième maison dans laquelle je me sens bien et qui me manquera, c'est sûr.

Au cours d'une thèse, on peut être amenés à rencontrer de nombreux doctorants et stagiaires et évidemment la mienne n'a pas dérogé à la règle. Merci alors à la première vague d'étudiants que j'ai connu qui m'a permis de bien débuter cette thèse et de voir à quoi il fallait que je m'attende (malgré les confinements qui nous sont brutalement tombés dessus) : Célia, Cécile, Rémi et Roger, Antoine et Yannis pour avoir, en plus du reste, partagé un bureau pendant quelques mois avec moi. Au second groupe, vous savez tout ce que je pense de vous… j'ai passé des moments incroyables à vos côtés malgré une guerre des bureaux (et je maintiens, c'est le G(amais)203 qui l'emporte !) :

- Charlotte, quelle joie de voir débarquer une si jolie personne après quelques mois entourée de testostérone. Merci pour tous ces bons moments, pour l'amour des plantes et de la décoration que l'on partage mais aussi pour le labo car on est une sacrée équipe, à nous deux le haut débit n'a qu'à bien se tenir. Je ne m'inquiète pas pour la suite, l'histoire sera aussi belle qu'elle ne l'est déjà 🌺
- Carla, je sais à quel point on partage, la passion étrange des tiques et notamment de Hyalomma, merci pour tous les bons moments de ces dernières années (et oui tu vas bientôt être là depuis aussi longtemps que moi), j'ai hâte de tout connaître sur l'origine de nos tiques en France !
- Paola, merci pour tous les bons moments, je te souhaite pleins de belles choses pour la suite
- Jordan, merci pour tous ces moments de « viro or smoke drive » à la fenêtre du bureau, pour ces moments partagés et pour toute ton expertise sur les virus, tu feras un brillant virologiste, j'en suis certaine 😊
- Maxime P, les moustiques n'ont qu'à bien se tenir à tes côtés ! Je ne comprendrais probablement jamais la passion que tu voues à ces terribles individus mais bon... merci pour ces fous rires, ces blagues qui ne passent pas toujours inaperçus et pour la quantité de bêtises 🦟

- Léo, ton premier degré m'aura amusé tout au long de cette thèse et nous aura permis de bons moments de rire et d'évasion. Courage pour cette dernière ligne droite ! PS : Je ne suis pas mariée 😉
- Aadel, merci pour toutes ces discussions, pleins de belles choses pour la suite de cette thèse !
- Madiou, on a partagé une thèse, les « jumeaux » diaboliques de Lolo, *Hyalomma* avait encore trop de secrets pour un seul étudiant, et c'était fort sympathique, merci pour toute ton aide en statistiques et tes bons conseils.

A mes collègues de bureau, je ne garderai que des bons souvenirs de cette collocation

- Côme, ta folie me manquera ! Merci pour tout, les fous rires, les discussions, les missions « eau » jusqu'au bâtiment A, tes conseils, ton aide et ta bonne humeur permanente. N'oublie pas quand même que les tiques > moustiques. Je te souhaite que du bonheur et beaucoup de réussites pour la suite. C'est Ciaoooo espèce d'ordure.
- Florian, merci pour ta bonne humeur permanente, ce sourire que tu affiches toujours sur ton visage et pour tes moments de folie. La vie dans le bureau c'était « trop fou » et merci pour ça (je garde les photos de toi dormant sur le canape sécrètes, promis). Tu feras un très bon professeur, j'en suis sûre.

A tous les stagiaires (Felix, Chloé, Léa, Manon, Vincent L., Axelle, Valentin, Laurie, Marie, Alice, Oussama) que j'ai pu croiser lors d'un déjeuner, assis dans l'herbe ou au labo merci, je n'en garde que de bons souvenirs !

Evidemment merci au collectif assistante qui a tant fait pour m'aider malgré les ATM, ordre de missions et autres déboires administratifs.

Merci à l'UMR BIPAR, pour son accueil lors de mes déplacements à Paris. Ces quelques semaines passées à vos côtés ont été riches, en travail, en apprentissage mais aussi en découvertes, en partages et en rires. Merci à Sara pour son accueil, à Clémence et Aurélie pour leur aide précieuse, à Camille et Lisa pour le bureau et tous ces moments partagés. Mais aussi à Angélique, Sabine, Clothilde, Ladislav, Alejandra, Alejandro, Lourdes… pour tous les moments conviviaux. Un merci supplémentaire à Ladislav pour ta patience et ta formation express sur les micro-injections dans les tiques. Au plaisir de tous vous recroiser, à Paris, en congrès, ou ailleurs.

A tous ceux, qui, depuis la Corse ont participé à ce travail, merci ! Merci à Alessandra, Vincent, Paloma et Morena de l'UMR Bioscope pour toutes ces discussions sur les tiques et la CCHF en Corse, pour ces moments sur le terrain, au laboratoire également et simplement pendant tous ces moments de partage lors de nos missions à Cargèse ou à Corte. Ce fût un plaisir de travailler avec vous sur des sujets qui interagissent. Merci également à Jean-Christophe Paoli, Paul-Eric Poli et Bastien Trabucco du LRDE pour les collectes de tiques et de sérums, les informations sur les élevages, sur les biotopes et pour votre gentillesse.

Merci à tous les partenaires qui ont rendu mes analyses possibles : les laboratoires départementaux d'analyses (Pyrénées-Orientales, Hérault, Gard, Bouches-du-Rhône, Alpes-Maritimes, Aveyron, Lozère, Tarn, Haute-Corse et Corse du Sud) et en particulier à Nicolas Keck et Raphaëlle Pin ; les GDS de tous ces départements ainsi que le FRGDS. Merci aussi aux Fédérations Départementales et Nationales de la Chasse et à Eva Faure. Et un grand merci aux éleveurs qui m'ont autorisé à analyser le sérum de leurs animaux, une pensée particulière à certains d'entre eux, Christine Marc, Sebastien Amiel, Natacha Casteil… qui ont tant fait pour que l'on réponde à nos interrogations dans les PO 🐄.

Pendant mon travail, j'ai eu la chance de pouvoir encadrer un stagiaire de M1 et deux de M2 qui ont représenté une première expérience d'encadrement enrichissante.

Merci à Valentin Chauvin pour son stage de Master 1. Ton travail sur la sérologie de la faune sauvage m'a été d'une grande aide pour ma thèse. Merci à Ferran Jori pour avoir encadré le stage et m'avoir fait confiance pour faire partie de l'équipe. Merci à Julien Sabardeil et Romain Clerget pour leur stage de Master 2 et leur travail respectif sur la protéomique et les pratiques d'élevage.

Durant ma thèse, j'ai eu la chance de donner des cours aux étudiants du master GIZMAT et SEHMA, je tiens donc à remercier Hélène Jourdan, Laurence Vial et Marie-Marie Olive pour cette opportunité.

Je souhaite également remercier Loic Comtet et IDVet et Olivier Ferraris de l'IRBA pour vos conseils et discussions autour des sérologies, leurs résultats et leur confirmation.

Evidemment, et il est essentiel de le préciser, merci à tous les bovins et chevaux d'avoir collaboré. On ne vous a pas dérangé pour rien (et en vrai, vous aimiez bien les gratouilles 😁) ! Il ne faut pas oublier mes plus chères collaboratrices, mes petites tiques, que j'ai appris à découvrir et à aimer (mais aussi à broyer).

Mes ami(e)s de toujours, mes copines de l'amour, évidemment merci. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à des personnes très spéciales, Leslie et Manon, qui ont été à mes côtés tout au long de cette aventure académique. Léna, merci d'être là et d'être toi depuis tant d'années, après une superbe colloc' voilà que l'on s'est retrouvée ici dans le Sud et merci pour ces moments partagés pour ta folie et ton sourire à toute épreuve. Aussi, grâce à toi j'ai rencontré Lilie, quelle bonne idée, merci à toi aussi, la folie de notre trio me manque déjà. Votre soutien indéfectible, votre encouragement constant et vos moments de détente bien mérités ont fait toute la différence, mes spéculums vous avez une place particulière dans mon cœur, je vous aime 💕.

Clémence, ma meilleure amie depuis si longtemps, merci pour tout, d'être simplement la personne qui me comprend qui m'accompagne et qui m'encourage chaque jour. Tu as apporté de la lumière aux journées les plus sombres de cette thèse et a rendu chaque étape de ce parcours plus significative. Ton amitié précieuse est un trésor que je chérirai toujours. Merci d'avoir été là pour moi, et d'avoir partagé ce voyage avec moi. Merci de faire bientôt de moi une tata comblée, je t'aime ♥

A mes parents, sans qui je n'en serais pas là. Grâce à vous j'ai eu tout ce dont j'avais besoin pour réussir, une belle éducation (c'est ça d'avoir une maman maîtresse, merci pour la relecture du manuscrit d'ailleurs) mais surtout beaucoup d'amour. Vous n'avez jamais douté de moi et m'avez permis d'en arriver là où je suis. Il n'y a pas de mots pour exprimer la reconnaissance et l'amour éternel que j'ai pour vous. Merci à ma « petite » sœur, mon petit chat, pour tout ce que tu es, ta folie me fait tant rire. Tu vas révolutionner l'art des statistiques j'en suis certaine. Evidemment merci au reste de ma famille, mes petites mamies, oncles et tante, mes cousines et ma belle-famille, loin des yeux, mais près du cœur 💟.

Dimitri, merci d'être toi, de continuer à partager ma vie depuis toutes ces années. J'ai hâte de continuer ma vie à tes côtés et de voir ce que l'avenir nous réserve.

Aux personnes parties trop tôt…

🐰

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE 1
I- Maladies et transmission d'agents infectieux 1
a. Infections et maladies 1
b. Voies de transmission 1
i. Transmission directe 2
ii. Transmission indirecte 2
1. Aliments, eau, produits biologiques, matériel 3
2. Transmission aérienne 3
3. Vecteurs arthropodes 3
c. Facteurs influençant la transmission d'agents infectieux 6
i. Facteurs liés à l'agent infectieux 6
ii. Facteurs liés à l'hôte 7
iii. Facteurs liés à l'environnement 11
II- Espèces exotiques introduites et invasions biologiques 12
a. Processus d'invasion 14
i. Introductions involontaires 15
ii. Introductions volontaires 16
b. Installation et dispersion après introduction 17
i. Biologie de l'organisme introduit 18
ii. Conditions physico-chimiques de l'environnement 19
c. Conséquences écologiques liées à l'introduction d'espèces exotiques 22
i. Compétition / Prédation 22
ii. Hybridation 22
iii. Transformation des habitats et paysages 22
III- Tiques : espèces introduites favorables aux invasions biologiques et bons vecteurs d'agents infectieux 25
a. Taxonomie 25
b. Morphologie externe 27
i. Le capitulum 28
ii. L'idiosome 29
c. Physiologie et morphologie interne 30
i. Le système digestif 30
ii. Glandes salivaires 32
iii. Tubes de Malpighi 33
iv. Système respiratoire 33
v. Système circulatoire 33

vi. Système nerveux 34
vii. Système reproducteur 34
d. Bio-écologie 35
i. Endo ou exophilie 35
ii. Cycle de développement 36
iii. Tropisme ou préférence d'hôtes 38
e. Transmission d'agents infectieux 39
f. Cas particulier de la tique *Hyalomma marginatum*, récemment installée en France 41
IV- Fièvre Hémorragique de Crimée-Congo 46
a. Description du VFHCC 46
i. Cycle de réplication intracellulaire 49
ii. Conditions de survie du virus 51
b. Transmission du VFHCC 51
c. La FHCC chez l'homme 53
d. Epidémiologie de la FHCC : maladie émergente en Europe 55
i. Exemple de la Turquie au Moyen-Orient : situation épidémique depuis 2002 56
ii. Exemple du Sénégal en Afrique de l'ouest : situation épi-enzootique historique 57
iii. Exemple de l'Espagne en Europe de l'ouest : émergence de cas ponctuels depuis 2016 58
iv. Situation de la France : cas particulier de la Corse et du risque d'émergence 58
e. Méthodes diagnostiques 59
i. Culture cellulaire 59
ii. Réaction de Polymérase en Chaîne (PCR) 60
iii. ELISA 60
iv. Séroneutralisation 61
v. Immunofluorescence indirect (IFA) 62
Contexte, question de recherche et objectifs de la thèse 63
Chapitre 1 : Cycle supposé de transmission du VFHCC en France 67
Article 1 : 71
Article 2 : 98
Conclusion du chapitre 1 : 116
Chapitre 2 : Evaluation de la circulation de VFHCC en France par sérologie et déterminants de la transmission 121
I- La situation en Corse 125
a. Faune domestique 125
b. Faune sauvage 131
II- La situation en France continentale 132
Article 3 : 132

Conclusion du chapitre 2 : 160
Chapitre 3 : Micro-organismes, agents infectieux et symbiotiques, portés par *Hyalomma marginatum* 165
I. Partie 1 : Détection, à travers une méthode génomique ciblée, des agents infectieux présents dans les tiques *H. marginatum* du Sud de la France. 169
Article 4 169
II. Partie 2 : Détection, par métaprotéomique, des micro-organismes (agents infectieux et commensaux/symbiontes) présents dans les organes des tiques *H. marginatum* du Sud de la France. 190
Matériel et Méthodes 190
Matériel biologique et site d'étude 190
Extraction de protéines 191
Identification des peptides par spectrométrie de masse 192
Résultats 195
Discussion 199
Conclusion chapitre 3 202
DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 205
Bibliographie 223

TABLE DES ILLUSTRATIONS

|Tableau 1 : Abondance relative des micro-organismes détectés dans le tube digestif (vert et marron) et les glandes salivaires (bleu) de Hyalomma marginatum 198

| Figure 1 : Différentes voies de transmission d'agents infectieux 2
| Figure 2 : Cycle générique de la transmission d'agent infectieux 5
| Figure 3 : Organigramme des voies d'introduction et de dispersion des EEI et EEE d'après (Dutartre 2019) 14
|Figure 4 : Classification systématique des tiques (Ixodida). Classification taxonomique réalisée d'après Mathilde Gondard (2017). 26
|Figure 5 : Caractéristiques morphologiques des tiques. Différences principales entre les tiques molles et les tiques dures d'après (Pérez-Eid 2007) et adapté à partir de (Barker et Walker 2014) 27
|Figure 6 : Détail du capitulum des tiques dures, adapté d'après (Boulanger et McCoy 2017; Pérez-Eid 2007; Sonenshine et al. 2014a). 28
|Figure 7: Les différents types de capitulum retrouvés chez les tiques dures d'après (Pérez-Eid 2007) 29
|Figure 8 : Anatomie externe d'une tique dure (S. Bonnet et al. 2017 ; Pérez-Eid 2007) 30
|Figure 9 : Représentation schématique de l'anatomie interne d'une femelle ixodidae avec le système digestif, circulatoire, nerveux et reproducteur (Dessin : Côme Morel). 32
|Figure 10 : Appareil respiratoire, exemple de la tique dure à partir de (Sonenshine et al. 2014 ; Barker et Walker 2014) 33
|Figure 11: Photographie du synganglion de la tique Rhipicephalus appendiculatus adaptée de Šimo et al. (2009) 34
|Figure 12 : Cycle de développement polyxène des tiques molles de la famille des Argasidae. 37
|Figure 13 : Différents cycle de développement des tiques (monoxène, dixène ou trixène) adapté de (Sonenshine et al. 2014a) 38
|Figure 14 : Mécanisme général de l'acquisition et de la transmission des agents infectieux par la tique, adaptée à partir de (S. Bonnet, George, et Boulanger 2017). Voir Figure 9 pour légendes anatomiques. 39
|Figure 15 : Modes de transmission du VFHCC chez les tiques. 41
| Figure 16 : Site de fixation de Hyalomma marginatum sur ses hôtes 42
|Figure 17 : Représentation, centrée sur l'Europe, de la distribution de la tique Hyalomma marginatum 44
|Figure 18 : Structure du virus de la Fièvre Hémorragique de Crimée-Congo 47
|Figure 19 : Séquences des 3 segments génomiques du virus de la Fièvre Hémorragique de Crimée-Congo 48
|Figure 20 : Cycle de réplication intracellulaire du VFHCC adapté d'après Bente et al. (2013) ; Garrison et al. (2020) 50
|Figure 21 : Observation d'une large ecchymose sur le bras d'un patient atteint de FHCC. D'après Ergonul et al. (2008) 55
|Figure 22 : Répartition des cas et de la présence du VFHCC dans le monde (WHO 2022). 55
|Figure 23 : Statut des communes corses vis-à-vis de la présence d'anticorps contre le VHFCC en 2019-2020 (en comparaison à 2014-2016) 127

|Figure 24 : Évolution du statut des communes par sérologie au VCCHF en 2019-2020 par rapport à la campagne 2014-2016 127
|Figure 25 : Séroprévalence au VCCHF moyenne par commune, en Corse, en 2019-2020... 129
|Figure 26 : Séroprévalences par commune et par élevage au sein des communes, dans la zone de forte circulation de VFHCC au Nord-Ouest de la Corse..... 130
|Figure 27 : Distribution des valeurs de Densités Optiques (DO) obtenues par ELISA VFHCC pour les sérums de bovins corses, en 2019-2020..... 131
|Figure 28 : Dissection d'une tique mâle H. marginatum sous loupe binoculaire. 191
|Figure 29 : Plan d'échantillonnage des protéines des organes (glandes salivaires GS et tube digestif TD) de Hyalomma marginatum..... 192
|Figure 30 : Workflow analytique de métaprotéomique par phylopeptidomique. 194
|Figure 31 : ACP de la distribution des échantillons de Hyalomma marginatum sur les dimensions 1 et 2. Les microbiotes des 24 échantillons sont analysés comparativement en fonction des nombres de TSM et speTSM pour chaque genre microbien. SG : glandes salivaires, DT : tube digestif, F : femelle, M : mâle, CT : insectarium, WT : terrain..... 195
|Figure 32 : ACP montrant la distribution des échantillons de Hyalomma marginatum sur les dimensions 1 et 2 selon l'organe et le lieu d'origine. Les échantillons ont été regroupés selon leurs origines (SG : glandes salivaires vs DT : et Control vs Wild Type). 63 genres de micro-organismes ont été retenus dans l'analyse..... 196
|Figure 33 : Volcano plot des microbiotes significativement présents dans les glandes salivaires et le tube digestif des tiques Hyalomma marginatum..... 197

INTRODUCTION GENERALE

I- Maladies et transmission d'agents infectieux

a. Infections et maladies

De la grippe à des maladies plus graves comme la tuberculose ou le VIH, les agents infectieux, qui en sont responsables, sont des entités biologiques complexes (appellation générique de microbes) qui défient la science et la médecine depuis des siècles. Un agent infectieux en tant qu'organisme vivant (comme une bactérie, un virus, un champignon, un parasite) ou une particule infectieuse (comme un prion), peut causer une infection, soit en se maintenant dans un état quiescent, soit en se multipliant. Cette multiplication peut rester asymptomatique ou engendrer des signes cliniques de degrés de sévérité divers (ces agents infectieux deviennent alors pathogènes). Les agents infectieux peuvent infecter différents types d'organismes, tels que les humains, les animaux et les plantes, et ils se propagent généralement par contact direct ou indirect auprès d'un porteur infecté, ou par l'intermédiaire d'un vecteur arthropode piqueur tel qu'un moustique, une tique, une puce, une mouche piqueuse ou un moucheron, ou encore une punaise. Les agents pathogènes peuvent causer une large gamme de maladies, allant de légères à graves, voire mortelles, en fonction de leur virulence et de la réponse immunitaire de l'hôte.

Lorsqu'il s'agit de la transmission des agents infectieux, il est important de considérer les différents rôles que peuvent jouer les organismes dans ce processus. Certains organismes sont des hôtes réfractaires, ce qui signifie qu'ils ne peuvent pas être contaminés par un agent infectieux particulier alors que d'autres sont des hôtes susceptibles, ils peuvent être infectés mais ne développent pas nécessairement de symptômes cliniques. Enfin, certains organismes sont des hôtes sensibles à la fois susceptibles d'être infectés et de développer des symptômes. Il est également important de noter que certains organismes peuvent agir en tant que réservoirs pour les agents infectieux. Les réservoirs sont des organismes qui abritent un agent infectieux sans forcément développer des symptômes pour la maladie, mais peuvent le transmettre à d'autres organismes. Dans la suite de cette partie, nous nous intéresserons uniquement aux agents infectieux affectant les humains et les animaux.

b. Voies de transmission

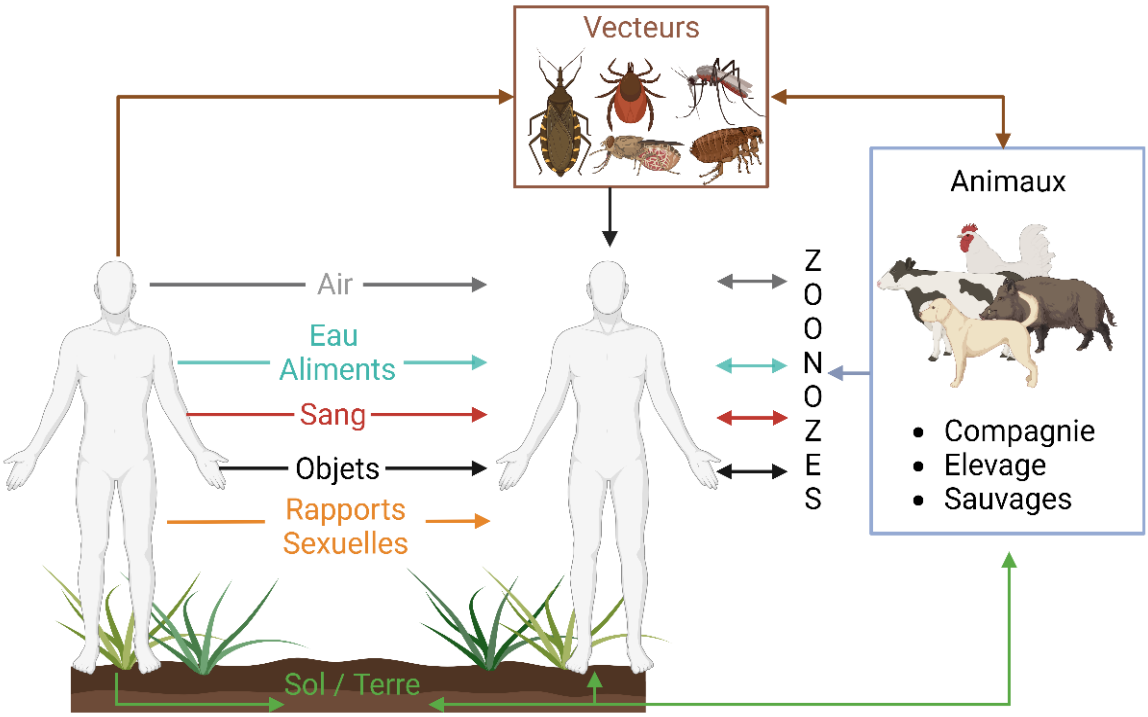


Figure 1 : Différentes voies de transmission d'agents infectieux

i. Transmission directe

La transmission directe est le transfert immédiat de l'agent infectieux d'un hôte ou d'un réservoir infecté à un point d'entrée approprié par lequel l'infection peut avoir lieu.

Cela peut être par contact direct, comme au toucher, lors de baisers ou de rapports sexuels, ou par la propagation directe de gouttelettes (Richard *et al.* 2017). La propagation des gouttelettes fait référence à la pulvérisation d'aérosols relativement gros et à courte portée produits par les éternuements, la toux ou même lors d'une conversation (Desenclos 2008).

Les transfusions sanguines et l'infection transplacentaire de la mère au fœtus sont d'autres moyens importants de transmission directe (Kengne et al. 2021).

ii. Transmission indirecte

La transmission indirecte peut être véhiculée, aérienne ou vectorielle.

1. Aliments, eau, produits biologiques, matériel

On appelle voie orale ou entérique, la voie qui consiste à s'infecter en mangeant ou en buvant des aliments contaminés. Les aliments sont contaminés le plus souvent à partir de l'eau (Baudart et Paniel 2014). De nombreuses maladies infectieuses, dont les agents responsables se développent dans le tube digestif, sont transmises de cette façon : gastroentérites bactériennes et virales, choléra, fièvres typho-paratyphoïdes, shigelloses, brucelloses, douves, certaines hépatites virales, poliomyélite, et parasitoses diverses tels que les vers intestinaux (Dupeyron 2018; Baudart et Paniel 2014). Les agents infectieux peuvent être véhiculés par d'autres moyens : les produits biologiques (sang) et le matériel (objets inanimés tels que les mouchoirs, les scalpels chirurgicaux, bottes, roues des tracteurs…) (Hall 1983; Ribbens *et al.* 2004 ; Simonsen *et al.* 1999).

2. Transmission aérienne

La transmission aérienne d'agents infectieux se réfère à la propagation des agents indirectement à travers l'air. Les agents infectieux sont transportés par l'air et se déposent sur des surfaces, où ils peuvent survivre pendant un certain temps et être transmis lorsqu'une personne ou un animal touche ces surfaces puis se touche la bouche, le nez ou les yeux (Mattioli et al. 2013). Les agents infectieux qui peuvent être transmis par voie aérienne comprennent des virus tels que ceux responsables du rhume commun, de la grippe, de la rougeole ou de la varicelle, ainsi que des bactéries telles que celles responsables de la tuberculose ou de la légionellose. La transmission aérienne peut être évitée en prenant des précautions telles que le port de masques pour les humains, la ventilation appropriée des espaces fermés et le maintien d'une distance physique (Chiu et al. 2020).

3. Vecteurs arthropodes

Dans la transmission vectorielle aux hommes ou aux animaux, l'élément intermédiaire est un arthropode.

Les infections à transmission vectorielle sont celles dans lesquelles un agent infectieux est transmis d'un hôte infecté (un hôte vertébré tel qu'un humain ou un animal) à un autre par l'intermédiaire d'un arthropode hématophage (comme un moustique, une tique, une puce ou un pou) (Robert 2012). Ces infections, entraînant parfois des maladies telles que le paludisme et la dengue, ont un impact important sur la santé humaine à travers le monde, ainsi que sur la santé animale, avec des maladies comme la fièvre de la vallée du Rift et la fièvre catarrhale ovine ou la theilériose tropicale bovine et peuvent parfois être des zoonoses (transmises de l'animal aux humains et inversement) (Bhatt *et al.* 2013 ; Ikegami et Makino 2011 ; Murray *et al.* 2012 ; Saegerman, Berkvens, et Mellor 2008 ; WHO 2018,

2020), cela entraîne un fardeau important sur la santé et le développement des pays touchés. En raison de l'intense circulation mondiale des personnes et des biens, les agents infectieux à transmission vectorielle peuvent rapidement se propager, soit par la diffusion de vecteurs infectés soit par l'introduction d'agents infectieux pouvant infecter des vecteurs locaux, et causer des épidémies dans des zones auparavant indemnes, comme cela s'est produit avec le virus West Nile aux États-Unis, le chikungunya à la Réunion et en Italie, ainsi que la diffusion de la fièvre catarrhale ovine en Europe (Angelini *et al.* 2007 ; Josseran *et al.* 2006 ; Petersen, Brault, et Nasci 2013 ; Saegerman, Berkvens, et Mellor 2008). Ces maladies font, pour certaines, partie des maladies émergentes, ou ré-émergentes, et constituent un défi majeur pour la santé publique (Ronca *et al.*, 2021).

Au sein de la transmission vectorielle, on peut distinguer deux catégories. La première concerne la capacité de l'agent infectieux à se répliquer dans l'arthropode vecteur et à disséminer vers ses organes de transmission. C'est une transmission active et on parle alors de vecteurs "biologiques" tels que les moustiques, les puces et les tiques généralement. L'agent peut subir un cycle de maturation dans le vecteur, plus ou moins complexe avant de devenir infectieux. Par exemple, le cas du paludisme, causé par le parasite *Plasmodium* et transmis par les moustiques *Anopheles*. Lorsqu'un moustique se nourrit du sang d'une personne infectée, il ingère des sporozoïtes du parasite. Dans le moustique, les sporozoïtes subissent une maturation complexe, se multipliant pour former des oocystes. Ces oocystes éclatent, libérant des sporozoïtes qui migrent vers les glandes salivaires du moustique. Lors d'une piqûre ultérieure, les sporozoïtes sont injectés dans le sang de la personne, amorçant un nouveau cycle d'infection (Tuteja 2007).

Les arthropodes s'infectent lors du gorgement et lorsque l'agent infectieux est capable de se répliquer dans l'arthropode vecteur et de se disséminer vers ses organes de transmission, on parle de transmission active et de vecteurs biologiques et ainsi de compétence vectorielle. Les vecteurs biologiques sont donc essentiels pour la survie et la propagation des agents infectieux.

La seconde catégorie concerne certains vecteurs qui peuvent être responsables de transmission passive. Cette fois il s'agit de vecteurs dits "mécaniques", c'est-à-dire qu'ils ne sont pas des hôtes pour l'agent infectieux. Ils agissent simplement comme des transporteurs passifs de l'agent sur leur corps ou dans leur tractus digestif. Les mouches domestiques sont un exemple courant de vecteurs mécaniques, transportant des bactéries et des virus d'une surface contaminée à une autre, ou d'un tas de fumier à un aliment. Par exemple, la puce du rat (*Xenopsylla cheopis*) peut transporter et transmettre la bactérie Yersinia pestis, responsable de la peste bubonique. Bien que la puce ne soit pas nécessaire au cycle de vie complet de la bactérie, elle agit comme vecteur mécanique en transportant les bactéries d'un hôte infecté à un autre. Lorsqu'une puce se nourrit du sang d'un rat

infecté par *Yersinia pestis*, elle peut ingérer les bactéries. Ensuite, lorsqu'elle se nourrit du sang d'un nouvel hôte, elle peut régurgiter des bactéries dans la plaie causée par sa piqûre, infectant ainsi cet hôte. Ce processus mécanique de transmission peut contribuer à la propagation de la peste entre les populations de rongeurs et éventuellement aux êtres humains. Les vecteurs mécaniques peuvent donc contribuer à la propagation d'agents infectieux responsables de maladies, mais ils ne sont pas essentiels à la survie du micro-organisme.

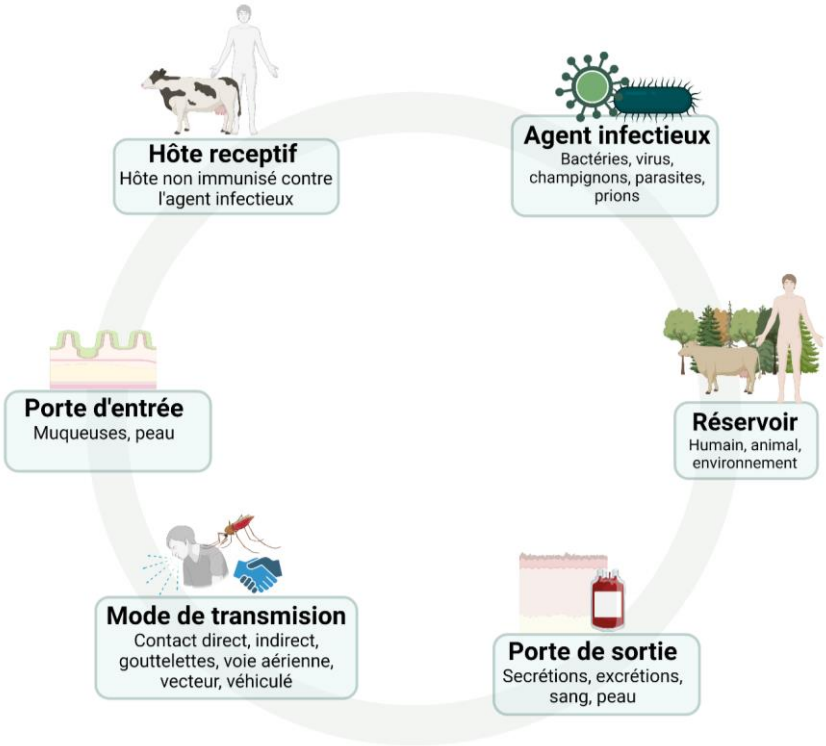


Figure 2 : Cycle générique de la transmission d'agent infectieux

Les six maillons présentés dans la figure ci-dessus (Figure 2) représentent les conditions nécessaires à la transmission de l'infection. En effet, des facteurs liés à l'agent infectieux (pathogénicité, virulence…), à l'hôte (statut immunitaire, âge, état de santé…) ou à l'environnement (température, humidité…) influencent les conditions de transmission. Il est également essentiel qu'il y ait un réservoir, capable de maintenir la survie de l'agent infectieux. Cet agent quittera ainsi le réservoir par une porte de sortie (sécrétions, excrétions, sang…) et pourra être transmis par les moyens précédemment cités avant de s'introduire dans l'hôte pour le contaminer par la porte d'entrée (muqueuses, peau…). Enfin, l'agent infectieux ne peut pas se transmettre si l'hôte n'est pas réceptif à l'infection, par exemple si l'hôte est immunisé contre l'agent infectieux à la suite d'une vaccination ou, dans certains cas, après avoir contracté la maladie.

c. Facteurs influençant la transmission d'agents infectieux

Un agent est infectieux (qu'il soit pathogène ou non) s'il est capable de transmettre et créer une infection par sa réplication chez un hôte. La transmission d'agents infectieux dépend de plusieurs facteurs, notamment les caractéristiques de l'agent (différentes chez un virus, une bactérie, un parasite uni- ou pluricellulaire), des hôtes (mammifères ou arthropodes), de l'environnement et des modes de transmission. Comprendre ces facteurs peut aider à surveiller, voire prévenir la transmission d'agents infectieux et à contrôler les maladies.

i. Facteurs liés à l'agent infectieux

La taille de l'agent infectieux est un facteur important pour sa transmission. Les agents infectieux de petite taille, comme beaucoup de virus, peuvent être transportés par l'air et se propager sur de plus ou moins longues distances (Garner 1996; Duguid 1946; Xie et al. 2007), tandis que les agents infectieux de plus grande taille, comme de nombreuses bactéries, sont généralement transportés par des gouttelettes et se propagent sur des distances plus courtes (Macias et al. 2009).

Un autre facteur à prendre en compte est la pathogénicité de l'agent infectieux qui fait référence à la capacité d'un organisme à provoquer une maladie chez son ou ses hôtes (c'est-à-dire à nuire à l'hôte). Cette capacité dépend de composantes génétiques de l'agent infectieux, dont l'expression va conduire à un phénotype dont les effets biologiques seront délétères pour l'hôte, et les dommages causés à l'hôte sont étroitement liés aux interactions hôte-pathogène (Cann 2016; Shapiro-Ilan et al. 2005). Certains agents infectieux n'ont d'ailleurs pas la capacité de provoquer de maladie, ou chez certains de leurs hôtes et pas les autres, ou encore avoir des pathogénicités différentes selon les hôtes. Lorsque les agents infectieux sont dits très virulents, c'est-à-dire capable de se développer et se multiplier efficacement chez un hôte, causant des symptômes graves tels qu'une forte toux, des éruptions cutanées, ou encore des hémorragies, cela peut favoriser la propagation de l'infection via la production de gouttelettes respiratoires ou des effusions sanguines fortement contaminantes (Bull 1994). Par exemple, le virus Ebola est très virulent chez l'homme et peut se propager rapidement dans les communautés touchées en raison des symptômes graves qu'il provoque, tels que des saignements internes et externes, des vomissements et de la diarrhée. Les patients atteints d'Ebola peuvent produire des quantités élevées de virus dans leur sang et d'autres liquides corporels, ce qui augmente le risque de transmission à d'autres personnes (si ces personnes sont au contact des malades, des villages peuvent être décimés puis l'épidémie s'arrête faute d'hôtes humains, le virus se trouve alors dans des réservoirs animaux) (Reichler et al. 2020). Cependant, il convient de noter que la virulence d'un agent infectieux ne

détermine pas toujours sa capacité de transmission. Il est à noter également, qu'un agent pathogène très virulent peut tuer son hôte en empêchant toute transmission. Certains agents infectieux moins virulents peuvent encore se propager rapidement s'ils sont transmis par contact étroit ou par l'air. Par exemple, le virus de la grippe est moins agressif chez l'homme que le virus Ebola, mais il se propage facilement dans les communautés en raison de sa capacité à être transmis par des gouttelettes respiratoires, c'est-à-dire à atteindre les cellules des voies respiratoires.

Enfin, la résistance aux conditions environnementales est un facteur important qui influe sur la transmission des agents infectieux. Les conditions environnementales, telles que la température, l'humidité, la lumière, la pression et le *pH*, peuvent avoir des effets différents sur la viabilité de ces agents. La capacité de l'agent infectieux à survivre dans l'environnement et à rester viable influence la facilité des agents infectieux à se transmettre. Lorsque l'agent infectieux contenu par exemple dans des fluides biologiques ou déjections se retrouve dans l'environnement, il peut y survivre un certain temps, ce qui entraîne sa capacité à se transmettre. Ainsi, les micro-organismes peuvent survivre et demeurer infectieux pour une durée variable, selon leur propre viabilité, mais aussi selon les conditions du milieu, de la surface ou des substances (ex. : sécrétions) où ils se trouvent. Par exemple, les kystes de certains parasites peuvent survivre plusieurs mois dans certaines conditions de température et d'humidité (Bouchaud et al. 2009). Quant au rotavirus, un des agents responsables de la diarrhée, il peut survivre plusieurs semaines sur une surface inerte non poreuse de type comptoir de bar (Ansari, Springthorpe, et Sattar 1991). Certains virus respiratoires, dont le virus de la grippe, demeurent viables jusqu'à 5 minutes sur la peau des mains (Bean et al. 1982).

La résistance des agents infectieux aux conditions environnementales est également liée à leur mode de transmission. Les agents infectieux transmis par les aliments peuvent survivre dans des conditions de température et de *pH* spécifiques, c'est d'ailleurs le cas de virus de la Peste Porcine Africaine (PPA) qui survit dans la viande crue mais également dans la viande ayant subi une étape de salaison (Mazur-Panasiuk, Żmudzki, et Woźniakowski 2019).

ii. Facteurs liés à l'hôte

La réponse immunitaire de l'hôte est également un facteur clé qui peut influer sur la prise en charge de l'agent infectieux par notre organisme. Le système immunitaire inné, qui fournit une réponse immunitaire rapide et non spécifique contre les infections, est particulièrement important pour empêcher la propagation rapide de l'agent infectieux. Le système immunitaire adaptatif, qui fournit une réponse immunitaire spécifique et à long terme, avec une régulation plus fine des acteurs

cellulaires et moléculaires mis en oeuvre pour éliminer l'agent infectieux et enregistrer son profil antigénique permettant une réactivation rapide, est essentiel pour protéger l'hôte contre une réinfection (Dagenais, Villalba-Guerrero, et Olivier 2023; Hillion *et al.* 2020 ; Sun *et al.* 2020). L'immunologie, la branche de la biologie qui étudie notre système immunitaire, s'est longtemps concentrée sur la dissection des mécanismes moléculaires qui régissent notre réponse physiologique aux infections, en considérant cependant qu'elle ne changeait pas d'un individu à l'autre. Une hypothèse mise à mal par plusieurs études récentes, suggérant que nous ne sommes pas égaux face aux agents infectieux (Holzmuller et al. 2016). L'âge, le sexe, le passé infectieux, le patrimoine génétique, peuvent influencer le système immunitaire, et rendre plus sensible aux maladies. C'est d'ailleurs ce qui a été montré par Patin *et al.* (2018) et Piasecka *et al.* (2018), les deux études confirment qu'une grande partie de la variation du système immunitaire entre individus est due à des différences de sexe et d'âge. Ils ont également regardé si le patrimoine génétique pouvait contribuer aux différences de réponses immunitaires entre les individus. Ils ont identifié des centaines de variations génétiques qui changent l'expression de molécules clés de la réponse immunitaire dont certaines sont associées à un plus grand risque de développer des maladies telles que l'allergie aux pollens, le lupus érythémateux, ou encore le diabète de type 1. L'immunité joue un rôle crucial dans la transmission des agents infectieux. Lorsqu'une personne est immunisée contre un agent infectieux, cela peut réduire sa capacité à transmettre l'infection à d'autres individus. D'une part, l'immunité innée ou adaptative peut aider à réduire la charge microbienne chez une personne infectée. Une charge microbienne plus faible diminue la quantité de micro-organismes excrétée dans les sécrétions respiratoires, les selles ou d'autres fluides corporels, ce qui réduit la probabilité de transmission à d'autres individus, et/ou augmente la capacité du système immunitaire de ces individus à éliminer immédiatement la faible quantité de micro-organismes transmis. D'autre part, cela contribue à raccourcir la durée pendant laquelle une personne infectée est contagieuse. Il est possible que cela corresponde à une réponse immunitaire plus rapide et plus efficace contrôlant l'infection plus rapidement, réduisant ainsi la période pendant laquelle l'individu peut transmettre l'agent infectieux.

Les comportements individuels ou collectifs des hôtes sont aussi des facteurs importants dans la transmission des agents infectieux, car ils peuvent influencer leur exposition aux infections. Dans le cas des animaux, certaines espèces ont des comportements alimentaires qui favorisent l'exposition aux agents infectieux. Par exemple, les bovins paissent de l'herbe tendre près des points d'eau et se contaminent avec des douves (trématodes dont l'hôte intermédiaire est un escargot nécessitant des points d'eau) (Meyer 2023). Chez l'homme, ces comportements peuvent être déterminés par des

facteurs sociaux, économiques, culturels et psychologiques. Les contacts sociaux, tels que les rassemblements publics ou les interactions étroites avec d'autres personnes, peuvent augmenter la transmission d'agents infectieux transmis par les gouttelettes ou par l'air, comme la grippe, la tuberculose et le SARS-CoV-2 (Desenclos 2008). La vaccination peut réduire la propagation de maladies infectieuses en limitant l'impact de la transmission de l'agent infectieux au sein de la population grâce à une réponse immunitaire individuelle optimisée qui conduit à une immunité collective. Ainsi le R0 (taux de reproduction de base) d'un agent infectieux, c'est-à-dire la capacité à se transmettre d'une personne contaminée à une personne non malade, peut passer en deçà de 1 (Fine, Eames, et Heymann 2011). Les comportements liés à l'alimentation, tels que la consommation d'aliments crus ou insuffisamment cuits, peuvent augmenter la transmission d'agents infectieux d'origine alimentaire, tels que la salmonelle, la listeria, l'*E. coli* et aussi de nombreux protozoaires. Enfin, les déplacements, qu'ils soient locaux ou internationaux, peuvent favoriser la propagation des agents infectieux en augmentant la dispersion géographique des hôtes infectés et en créant des opportunités pour l'introduction de nouveaux agents infectieux dans de nouvelles populations (c'est en partie ce qui a été observé avec le SARS-CoV-2). L'hygiène personnelle, telle que le lavage régulier des mains, la désinfection des surfaces de contact peuvent limiter la transmission par contact direct ou indirect. Les comportements sexuels peuvent également avoir un impact sur la transmission d'agents infectieux sexuellement transmissibles, comme l'utilisation de préservatifs qui peut réduire la transmission du VIH, de la syphilis et du papillomavirus humain (HPV). Le style de vie peut aussi favoriser l'exposition (usage de drogue par voie veineuse et risque d'infection à VIH ou VHC) (Desenclos 2005). La pratique de certains loisirs ou professions d'extérieur peut favoriser l'exposition à certains agents infectieux ou à des vecteurs arthropodes d'agents infectieux (fréquentation des forêts et exposition aux tiques transmettant les spirochètes responsables de la maladie de Lyme (Meha 2013), pratique du canoë kayak et leptospirose (Monahan, Miller, et Nally 2009). Un autre exemple porte sur la transmission du virus de la Fièvre Hémorragique de Crimée-Congo qui peut avoir lieu, dans le cycle naturel, uniquement par piqûre de tique, mais, pour la transmission à l'humain, peut également avoir lieu par contact direct avec des fluides biologiques d'animaux ou d'humains contaminés. De nombreuses études ont montré que certains métiers ou activités (personnels d'abattoir, éleveurs, promeneurs, chasseurs…) présentaient plus de risques de contact avec le virus (Ak, Ergönül, et Gönen 2020; Cikman *et al.* 2016 ; Gergova et Kamarinchev 2014 ; Kilinc *et al.* 2016 ; Sargianou *et al.* 2013). Chez les animaux, certains comportements vont avoir des effets facilitateurs ou au contraire limitant la transmission d'agents infectieux. Les comportements de rassemblement et de migration peuvent jouer un rôle dans la transmission et la dissémination d'agents infectieux chez les animaux. Par

exemple, les mouvements migratoires peuvent contribuer à la propagation de maladies d'une région à l'autre comme c'est le cas pour le virus du West Nile transporté par ses réservoirs naturels, les oiseaux (Jourdain *et al.* 2007 ; Pauli *et al.* 2013), tandis que les rassemblements d'animaux sauvages ou domestiques peuvent favoriser la propagation de maladies entre individus, comme la PPA (Martin et al. 2011).

Facteurs spécifiques à la transmission vectorielle :

Dans le cas de la transmission vectorielle biologique, l'arthropode vecteur agit en tant qu'hôte pour l'agent infectieux. L'immunité de l'arthropode joue un rôle crucial dans le maintien d'un équilibre délicat entre la réplication de l'agent infectieux et sa transmission à d'autres hôtes, qu'ils soient vertébrés ou arthropodes. L'immunité chez les arthropodes peut être plus rudimentaire que chez les autres organismes, mais elle reste essentielle pour contrôler la réplication de l'agent infectieux (Ming *et al.* 2023 ; Stanley, Haas, et Kim 2023 ; Wu *et al.* 2022 ; Zeng *et al.* 2022). Elle permet de maintenir la réplication de l'agent infectieux à un niveau suffisamment bas pour ne pas causer de dommages graves à l'arthropode lui-même, tout en garantissant qu'il reste suffisamment élevé afin de permettre la transmission à d'autres hôtes. La thèse de Rémi Perreira de Oliveira (2020) sur *Ornithodoros* fournit un exemple illustratif de cet équilibre. Dans le cas d'*O. moubata*, il a été démontré que l'arthropode réplique et transmet très efficacement le génotype I du virus de la peste porcine africaine (PPA), mais cela entraîne sa mort. En revanche, il réplique et transmet légèrement moins bien le génotype II de la PPA, mais il survit. D'autre part, *O. erraticus* n'est pas capable de répliquer suffisamment ces deux génotypes pour les transmettre, mais reste infectée et peut transmettre l'infection lorsqu'elle est consommée par des porcs (Pereira de Oliveira 2020). Cet équilibre entre la réplication de l'agent infectieux et l'immunité de l'arthropode influence directement sa compétence vectorielle, c'est-à-dire sa capacité à transmettre efficacement l'agent infectieux à d'autres hôtes.

En outre, les comportements des vecteurs jouent un rôle crucial dans la transmission des agents infectieux, notamment en ce qui concerne leurs préférences trophiques. Les vecteurs, tels que les tiques, peuvent avoir des préférences spécifiques pour certaines espèces d'hôtes vertébrés pour leur repas de sang. Ces préférences trophiques peuvent avoir un impact significatif sur la transmission des agents infectieux. Certains hôtes vertébrés peuvent être de bons amplificateurs ou réservoirs d'agents infectieux, ce qui signifie qu'ils ont une concentration élevée de l'agent pathogène et qu'ils sont susceptibles de le transmettre aux vecteurs lorsqu'ils se font piquer. D'autres espèces d'hôtes peuvent être moins compétentes pour l'infection ou ne présentent pas de charge microbienne élevée, ce qui

limite leur rôle dans la transmission de l'agent infectieux aux vecteurs. Un exemple classique de cette dynamique est la bactérie responsable de la maladie de Lyme, qui est transmise par les tiques. Les tiques peuvent préférer se nourrir sur certains réservoirs d'agents infectieux, tels que les petits mammifères ou les cervidés, qui sont des hôtes amplificateurs de la bactérie responsable de la maladie de Lyme. Lorsque les tiques se nourrissent de ces hôtes, elles peuvent acquérir la bactérie et la transmettre à d'autres hôtes, y compris les humains, lors de repas ultérieurs. Cette préférence trophique peut être influencée par différents facteurs, tels que les signaux chimiques émis par les hôtes, la disponibilité des proies ou la localisation des hôtes dans l'environnement. En conséquence, les arthropodes peuvent être plus abondants dans les zones où leurs préférences trophiques correspondent aux espèces d'hôtes présentes

Les arthropodes, tout comme les hôtes vertébrés, occupent des niches écologiques spécifiques qui influencent leur répartition, leur abondance et leurs interactions avec d'autres espèces. Ces niches écologiques déterminent les conditions dans lesquelles les arthropodes se développent, se nourrissent et se reproduisent. La rencontre entre les arthropodes et les hôtes se produit toujours par superposition de leurs niches respectives. Par exemple, certaines espèces de tiques peuvent être plus abondantes dans les zones boisées où elles trouvent des hôtes tels que les petits mammifères et les cervidés, qui sont des réservoirs potentiels pour les agents infectieux qu'elles transmettent. Cette superposition des niches écologiques favorise les interactions entre les arthropodes et les hôtes, ce qui influence la transmission des agents infectieux. Notamment, l'homme, par ses activités, va circuler dans les zones boisées et devenir hôte pour des tiques vectrices d'agents infectieux zoonotiques.

De nombreux facteurs sont identifiés, tels que la préférence trophique, l'abondance des vecteurs, la compétence vectorielle (capacité de l'arthropode à maintenir, reproduire et transmettre l'agent infectieux), la durée d'incubation et d'infectiosité de l'agent infectieux dans le vecteur, les facteurs environnementaux et d'autres caractéristiques spécifiques à l'interaction entre l'arthropode vecteur, l'agent infectieux et l'hôte, et c'est ce qu'on appelle la **capacité vectorielle**.

iii. Facteurs liés à l'environnement

Les caractéristiques géographiques de l'environnement peuvent influencer la transmission des agents infectieux. Par exemple, les zones urbaines peuvent favoriser la transmission par les gouttelettes de certains agents infectieux responsables de maladies respiratoires telles que la grippe, en raison de la proximité des personnes et de l'augmentation des contacts sociaux (Neiderud 2015). En outre, la dengue semble être plus présente dans les zones urbaines et périurbaines du fait de conditions favorables à la survie et au développement de populations abondantes de moustiques vecteurs du genre

Aedes qui sont particulièrement bien adaptés et très anthropophiles (Morse 1995; Inserm 2017). De même, les zones rurales avec des populations importantes d'animaux domestiques peuvent favoriser la transmission d'agents infectieux zoonotiques, tels que le virus de la fièvre de la vallée du Rift, en raison du contact étroit entre les humains et les animaux (Pepin et al. 2010).

Les conditions climatiques, telles que la température, l'humidité et les précipitations, peuvent influencer la transmission des agents infectieux en affectant leur survie et leur propagation. Par exemple, les virus de la grippe se propagent plus facilement pendant les mois d'hiver en raison de l'humidité et de la baisse de la température, qui favorisent la survie des virus dans l'air. De même, les agents infectieux transmis par les moustiques, tels que ceux responsables du paludisme et de la dengue, sont plus répandus dans les zones chaudes et humides en raison de conditions climatiques favorables à la survie et au développement sur une grande partie de l'année, voire toute l'année, de populations abondantes de moustiques vecteurs (Spengler 2012). Les moustiques Anophèles, vecteurs du paludisme, sont hétérothermes et leur capacité à transmettre le parasite dépend de leur température corporelle. Des études ont montré que des températures plus basses peuvent réduire la capacité vectorielle des moustiques, c'est-à-dire leur capacité à transmettre efficacement le parasite (Noden, Kent, et Beier 1995).

Enfin, les conditions sanitaires de l'environnement, telles que l'accès à l'eau potable et aux installations sanitaires peuvent influencer la transmission des agents infectieux par voie hydrique et fécale-orale. Les zones où l'accès à l'eau potable est limité, où les installations sanitaires sont insuffisantes ou inadéquates, peuvent favoriser par exemple la propagation du choléra et de la typhoïde (OMS 2019). De même, la qualité de l'air peut influencer la propagation des maladies respiratoires, comme les maladies pulmonaires liées à la pollution atmosphérique (Prüss-Üstün et al. 2016; OMS 2019).

Les arthropodes vecteurs sont des organismes particulièrement sensibles à leur environnement, et leur niche écologique peut être affectée par les changements climatiques. Ces changements peuvent modifier la répartition géographique des vecteurs et leur capacité à transmettre des agents infectieux. En raison de leurs déplacements actifs ou passifs via leurs hôtes, il existe un risque d'introduction des arthropodes vecteurs dans de nouvelles zones, parfois éloignées de leur habitat d'origine. Cette introduction peut avoir un impact considérable sur les schémas de transmission des agents infectieux vectorisés et sur l'épidémiologie des maladies associées.

II- Espèces exotiques introduites et invasions biologiques

Les Espèces Exotiques Introduites (EEI) sont des organismes vivants, tels que des animaux, plantes, champignons ou même micro-organismes, qui ont été introduits dans des écosystèmes qui ne sont pas leur habitat naturel (ou tout au moins originel), soit intentionnellement (par exemple, pour la lutte biologique contre des ravageurs) ou involontairement (par exemple, lors du transport de marchandises ou d'animaux ou d'humains, ou encore par simple déplacements naturels) (Vanderhoeven et al. 2006). Ces organismes s'installent dans le milieu si les conditions environnementales leur sont favorables ou s'ils présentent une capacité d'adaptation suffisante pour croître sous des conditions différentes de leur zone d'origine. Ils s'installent d'autant mieux qu'ils sont compétitifs vis-à-vis des espèces locales. Ils peuvent alors proliférer fortement et causer des dommages environnementaux, économiques et sanitaires considérables (Sanders, Mellor, et Wilson 2010). Ces Espèces Exotiques deviennent alors Envahissantes (EEE) ou Invasives et se caractérisent par leur grande capacité d'adaptation et de dispersion dans de nouveaux environnements, ainsi que leur capacité de prolifération rapide, qui peut leur permettre de dominer les espèces indigènes ; en effet, cela peut entraîner la diminution des ressources disponibles, la destruction des habitats et la diminution des populations indigènes, mettant en péril l'équilibre fragile des écosystèmes locaux (Chabrerie et al. 2019). Ils peuvent également avoir une grande plasticité phénotypique, ce qui signifie qu'ils peuvent modifier leur comportement, leur morphologie et leur physiologie pour s'adapter à leur nouvel environnement et augmenter leur succès reproductif (Chown et al. 2007). Ces organismes peuvent être soit directement des agents infectieux, soit des vecteurs d'agents pathogènes se transmettant aux populations locales d'hôtes naïfs, y compris les humains, pouvant ainsi causer des maladies graves (Wilson *et al.* 2017 ; Duvallet *et al.* 2018). Avec l'augmentation de leur introduction depuis ces deux derniers siècles (Seebens et al. 2017), les EEE ont des impacts sur les écosystèmes mais également pour la biodiversité (Semenza et Suk 2018). Le risque est alors d'en voir émerger de nouveaux (OneHealth). Le moustique tigre (*Aedes albopictus*) est un exemple frappant de la façon dont les arthropodes vecteurs peuvent se disperser à l'échelle mondiale et modifier les schémas de transmission des agents infectieux responsables de maladies. Originellement présent en Asie du Sud-Est, il a réussi à se répandre dans de nombreux pays à travers le monde. L'une des principales voies de dispersion est le commerce international de pneus d'occasion, dans lesquels les œufs du moustique peuvent survivre et être transportés sur de longues distances. De plus, ce qui rend ce moustique particulièrement adapté aux milieux urbains, c'est sa capacité à se reproduire dans de petites quantités d'eau stagnante, même dans des environnements urbains densément peuplés. De plus, les œufs du moustique tigre peuvent survivre pendant des mois voire des années dans des conditions défavorables, grâce à un état de dormance appelé diapause. *Aedes albopictus* a également été en mesure de coloniser des niches écologiques vides, notamment dans les

zones urbaines où d'autres espèces de moustiques étaient peu présentes ou absentes. En raison de sa forte anthropophilie, c'est-à-dire sa préférence à se nourrir de sang humain, le moustique tigre est un vecteur important pour plusieurs maladies d'origine virale, notamment le Chikungunya, la Dengue et le Zika (Higa 2011; Killilea *et al.* 2008 ; Weaver *et al.* 2018 ; Whitehouse 2004).

a. Processus d'invasion

Hulme *et al.* (2009) ont identifié différentes voies pour les invasions biologiques (introduction et établissement d'une espèce vivante) (Figure 3). Une seule d'entre elles est fondée sur des motivations intentionnelles, à savoir la dissémination délibérée d'organismes comme pour la lutte biologique, les autres étant non intentionnelles, souvent accidentelles, et principalement liées aux mouvements des personnes, des animaux et des biens, et pouvant donc avoir une grande diversité de provenances. Dans ce cas, les espèces peuvent s'évader d'environnements confinés (de captivité), être transportées lorsqu'elles sont sur des hôtes mais aussi lorsqu'elles sont dans la nourriture, les plantes, le bois… Les EEI et EEE peuvent aussi être des passagers clandestins dans des moyens de transports. Elles peuvent enfin coloniser une région voisine grâce à leur propre capacité de dispersion (Dutrieux 2017).

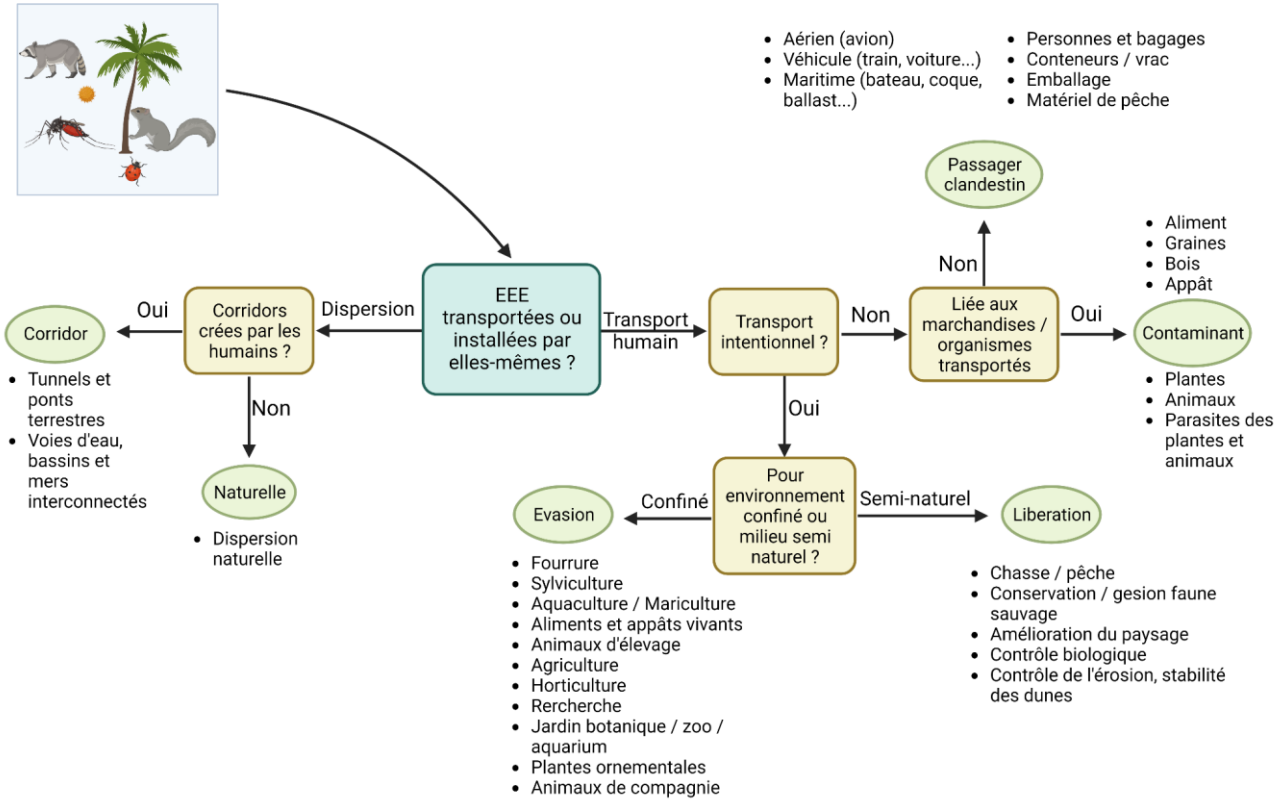


Figure 3 : Organigramme des voies d'introduction et de dispersion des EEI et EEE d'après *(Dutartre 2019)*. Cet organigramme rassemble toutes les catégories (rectangles jaunes) et sous-catégories

(ronds verts) des voies d'introduction, c'est-à-dire les introductions intentionnelles et/ou non intentionnelles et le mécanisme d'introduction, soit l'importation d'une marchandise, l'arrivée via un vecteur de transport, l'établissement d'un corridor de dispersion anthropique ou la propagation naturelle à partir d'une région où l'espèce est elle-même étrangère.

i. Introductions involontaires

Les introductions non intentionnelles d'espèces sont généralement le résultat de l'activité humaine, mais peuvent aussi être dues à des phénomènes naturels. Pour ces derniers, les espèces peuvent être transportées d'une région à une autre par les courants océaniques, les vents, les inondations, les feux de forêt (par la fuite des animaux vers de nouveaux milieux), les tempêtes, la fragmentation des habitats ou la succession écologique (processus naturel d'évolution des écosystèmes), mais également par les animaux migrateurs. Par exemple, des graines de plantes exotiques peuvent être transportées par le vent mais également par les oiseaux qui s'en nourrissent et les déposent via leurs excréments dans des nouvelles zones. Il peut y avoir des échappements d'individus d'élevage comme en mai 2020, en France, où des fortes pluies ont entraîné le débordement de bassins de pisciculture (UICN Comité français et OFB 2022). Il est important de noter que les oiseaux migrateurs jouent un rôle important aussi bien en termes d'introduction d'agents infectieux que d'arthropodes vecteurs (comme les tiques). Ils sont d'ailleurs responsables de l'introduction du virus du West Nile en Europe, lors de leur changement d'habitat en provenance d'Afrique. Le virus est actuellement installé et endémique dans plusieurs zones d'Europe du Sud et centrale. Les phénomènes d'introduction par des oiseaux migrateurs se conjuguent à une endémisation progressive. La lignée 2 du virus, détectée pour la première fois sur un oiseau en Hongrie en 2004, se diffuse peu à peu en Europe et coexiste dorénavant avec la lignée 1, qui était historiquement la seule présente en Europe (Kutasi *et al.* 2011 ; Lecollinet 2012).

Le commerce international de plantes, d'animaux, d'insectes, de produits alimentaires, de matériaux de construction, de matériel de loisirs, etc… est une des principales voies d'introduction d'espèces exotiques (Anderson *et al.* 2015 ; Torchin *et al.*, 2002). Lorsque les moyens de transports déchargent leur cargaison, ils peuvent également introduire des espèces exotiques (graines, animaux, plantes…) dans les zones portuaires ou aéroportuaires et les zones avoisinantes (Bailey 2015; Buck 2010) via leurs cargaisons de bois, fruits, légumes, plantes, fleurs, textiles, meubles ou dans des emballages en bois (Kenis et al. 2007). Également, lors des déplacements de personnes, qu'ils soient dus au tourisme, aux activités professionnelles ou à l'immigration (Schwarz, 1996), des espèces exotiques peuvent être transportées involontairement par les voyageurs dans leurs affaires (vêtements, sacs à dos, tentes, ...). Parfois, les importations agricoles peuvent conduire fortuitement à l'introduction d'EEE. Un exemple

courant d'introduction de graines de plantes exotiques est celui des espèces de renouée asiatique (*Reynoutria* spp.). Ces plantes envahissantes, originaires d'Asie, peuvent produire une grande quantité de graines qui sont facilement transportées par le vent, l'eau, les véhicules et les marchandises… ce qui entraîne leur dispersion dans de nouveaux habitats. Une fois établies, ces plantes exotiques peuvent se propager rapidement et supplanter les espèces locales, provoquant des perturbations dans les écosystèmes locaux (GT IBMA 2016a). Les transports maritimes sont particulièrement à risque d'introduction d'EEE, les navires pouvant déplacer des organismes attachés à leur coque, ce qui est connu sous le nom d'encrassement biologique. C'est ainsi que les moules zébrées d'Europe ont été introduites sur les côtes américaines par bateaux (Schloesser 1995). Des EEE peuvent aussi être déplacées dans les ballasts des navires, qui sont des réservoirs d'eau de mer utilisés pour stabiliser les navires pendant leur chargement/déchargement et navigation.

L'importation de bétail peut conduire à l'introduction de nouveaux agents infectieux, comme ce fut le cas en 2006, où le Nord-Est de la France (ainsi que les pays environnants) a été confronté à une épidémie de fièvre catarrhale ovine, probablement causée par l'introduction de bétail infecté provenant d'autres régions du monde, telles que l'Afrique ou l'Amérique du Sud, où la souche circulante avait déjà été identifiée. L'importation de ces animaux infectés a permis la transmission du virus aux animaux locaux, ce qui a entraîné la propagation de la maladie sur le territoire français. Les mouvements des animaux peuvent également entraîner l'arrivée de nouvelles espèces de vecteurs comme les tiques qui présentent la particularité de rester attachées plusieurs jours voire semaines sur un même hôte pour leur repas sanguin, ce qui favorise leur transport passif lorsqu'aucune mesure de contrôle des parasites externes n'est prise à l'embarquement des animaux (Yadav et al. 2013).
Enfin, les différents stades de développement des arthropodes vecteurs peuvent se dissimuler dans les vêtements, dans les bagages ou les véhicules des voyageurs (Reinhardt et Siva-Jothy 2007). Ainsi, on recense de nombreux cas d'importation de moustiques sur des terres indemnes via les transports aériens, avec création de populations introduites à proximité des aéroports (Ibañez-Justicia *et al.* 2017 ; Ibáñez-Justicia *et al.* 2020). C'est d'ailleurs le cas de l'introduction d'*Ae. aegypti* en Europe à l'aéroport international de Schiphol, aux Pays-Bas ou encore *Ae. albopictus* aux aéroports de Roissy ou Strasbourg (Ibañez-Justicia et al. 2017; EID 2019).

ii. Introductions volontaires

Les voies intentionnelles d'introduction d'EEE incluent le transport d'espèces pour une utilisation en laboratoire, en agriculture, à but cynégétique ou de conservation, à visée commerciale ou pour la lutte

antiparasitaire. L'ornementation fait référence à l'utilisation d'espèces exotiques pour des raisons esthétiques, comme les animaux de compagnie (poissons d'aquarium, les reptiles et les oiseaux : les perruches échappées qui sont devenues des espèces communes de nos villes) ou les plantes ornementales. Les espèces exotiques sont souvent choisies pour leur apparence unique ou leur comportement intéressant. Une étude menée aux États-Unis (Stringham et al. 2021), a montré que de nombreuses espèces animales exotiques ont été introduites aux États-Unis via le commerce des nouveaux animaux de compagnie, dont environ 20% étaient considérées comme des espèces envahissantesPar exemple, l'introduction de la renouée du Japon (*Fallopia japonica*) en Europe pour des raisons ornementales et de stabilisation des sols a entraîné sa propagation incontrôlable dans les habitats naturels. D'autre part, dans un objectif de repeuplement des populations de lapins de Garenne, ce sont des centaines de milliers de lapins qui ont été lâchés chaque année en France et dans la péninsule Ibérique. Mais la majorité de ces lâchers, traditionnellement effectués en hiver après la fermeture de la chasse, sont connus pour donner des résultats souvent décevants, la plupart des lapins lâchés n'étant plus jamais revus ensuite (Aubineau 2006). Aussi, des bouquetins ont été réintroduits dans les Pyrénées après l'extinction de la sous-espèce *Capra pyrenaica pyrenaica.* Cette fois, ce fut un succès, car avec 253 animaux réintroduits, ce sont maintenant plus de 480 individus qui sont dénombrés (Garnier 2021; Bouquetin Pyrénées 2016). L'introduction peut aussi être à des fins d'amélioration des qualités bouchères. Enfin, dans certains cas, certaines races sont naturellement capables d'exprimer une résistance à des agents infectieux ou aux ectoparasites comme les tiques. C'est ce que l'on observe avec la race bovine N'dama qui est trypanotolérante (moins affectée lors d'une infection par les trypanosomes, parasites unicellulaires sanguins) et qui semble plus résistante aux tiques (Ganyo et al. 2018). Ces races peuvent dans certains cas être introduites pour limiter l'effet de ces parasites. Une dernière raison de l'introduction de nouvelles espèces est la lutte biologique. L'introduction de la coccinelle asiatique partait d'une bonne intention. Elle avait été importée en Europe et aux Etats-Unis dans les années 1980 pour lutter de manière biologique contre les pucerons dont elle raffole. Bien que très efficace, les coccinelles locales, elles, n'ont pas suffisamment à manger et, en plus, transportent dans leurs oeufs les parasites transmis par les concurrentes asiatiques et mortels pour leur espèce (OFB 2022).

b. Installation et dispersion après introduction

Une fois introduite, une espèce peut connaître différents scénarios d'installation et de dispersion. L'installation d'une espèce dans un nouveau milieu dépend de plusieurs facteurs, notamment des caractéristiques biologiques de l'espèce elle-même, des conditions environnementales du nouvel

habitat et des interactions avec les espèces indigènes présentes. Pour commencer, il faut que l'espèce soit capable de survivre et de s'établir dans le nouveau milieu, cela dépend de sa capacité à s'adapter aux conditions environnementales locales, telles que le climat, le sol, la disponibilité des ressources et la compétition avec d'autres espèces. Ensuite, il faut que l'espèce puisse se reproduire pour établir des populations viables et pérennes. A partir de certains individus issus de ces populations viables, capables de se déplacer par eux-mêmes ou au travers de moyens de transports, aura lieu la dispersion de l'espèce introduite.

i. Biologie de l'organisme introduit

Un des facteurs biologiques qui favorise l'installation des espèces exotiques introduites est leur capacité à se reproduire rapidement. Certaines espèces végétales, comme l'ambroisie (*Ambrosia artemisiifolia L.*), peuvent produire des centaines de milliers de graines, ce qui leur permet de maintenir un niveau de survie dans des conditions environnementales difficiles (CDR EEE 2018). D'autres, comme la renouée du Japon (*Reynoutria japonica*), utilisent la multiplication asexuée pour se reproduire sans attendre la saison de reproduction. Elles développent un long réseau de rhizomes qui leur permet de s'ancrer dans le milieu (GT IBMA 2016a).

Certaines espèces exotiques peuvent également avoir des adaptations physiologiques, comportementales ou liées aux interactions complexes avec les autres espèces de l'écosystème, leur permettant de s'adapter rapidement aux nouvelles conditions environnementales, de concurrencer les espèces indigènes pour la nourriture, l'espace ou les ressources, ou d'éviter les prédateurs. Par exemple, le spartine maritime (*Spartina alterniflora*) et l'agave américaine (*Agave americana*) sont capables de tolérer des niveaux élevés de sel ou de températures extrêmes (GT IBMA 2016b; OFB & UICN France 2020a). L'ajonc européen (*Ulex europaeus*) possède un système racinaire qui lui permet de pousser dans des sols pauvres en nutriments (Atlan et al. 2015). L'écrevisse américaine (*Orconectes limosus*) est une espèce exotique ayant été introduite à des fins d'élevage et représentant une menace pour les écrevisses indigènes en raison de la compétition et de la transmission de la peste des écrevisses dont elle est porteuse asymptomatique (Basilico et al. 2013).

Mais bien sûr, pour qu'une espèce puisse s'installer, il faut que les ressources alimentaires qui lui sont nécessaires soient disponibles. Lorsqu'une espèce exotique invasive est introduite dans un nouvel écosystème, sa capacité à trouver et à exploiter des ressources alimentaires joue un rôle crucial dans sa survie et son succès. Si les ressources alimentaires nécessaires sont abondantes et disponibles, cela

peut favoriser l'établissement et la propagation de l'espèce invasive. Quand elles sont introduites, soit elles sont naturellement associées à plusieurs hôtes (comme les tiques *Hyalomma marginatum* qui trouvent toujours des hôtes sur lesquels se fixer même dans de nouveaux milieux) ou soit elles sont capables de s'adapter. Certains micro-organismes sont équipés de mécanismes spécifiques qui leur permettent de coloniser de nouveaux environnements et certains sont transportés avec leur hôte (c'est d'ailleurs le cas des agents infectieux entraînant ainsi, parfois, des invasions multiples). Les micro-organismes qui se reproduisent rapidement et efficacement ont une plus grande capacité de propagation. Certains micro-organismes peuvent avoir des cycles de vie courts avec une reproduction asexuée rapide, tandis que d'autres peuvent former des spores.

Les espèces exotiques ont souvent une capacité de reproduction élevée, ce qui leur permet de proliférer rapidement dans de nouveaux environnements. Elles peuvent produire un grand nombre de descendants, avoir des cycles de reproduction courts ou bénéficier d'autres stratégies de reproduction efficaces, telles que la production de propagules légères ou résistantes. Elles peuvent aussi présenter des caractéristiques qui leur confèrent un avantage compétitif par rapport aux espèces indigènes. Elles peuvent être plus efficaces pour exploiter les ressources disponibles, avoir une meilleure capacité de croissance ou bénéficier de mécanismes de défense plus efficaces contre les prédateurs ou les maladies. Lorsqu'une espèce est introduite dans un nouvel environnement sans ses prédateurs ou parasites naturels, elle peut se retrouver sans régulateurs biologiques et connaître une croissance non contrôlée. Cela peut favoriser sa propagation et sa prolifération, car elle n'est pas soumise aux mêmes pressions de prédation ou de parasitisme que dans son habitat d'origine. Un dernier facteur, qui concerne aussi bien les micro-organismes que certains organismes comme les tiques, est le fait d'être présent au sein d'un hôte se déplaçant en restant longtemps présent, permet la dispersion (i.e. les tiques sur les oiseaux migrateurs ou les ongulés et les micro-organismes au sein de ces tiques (Mancuso et al. 2019)).

ii. Conditions physico-chimiques de l'environnement

L'environnement d'accueil joue un rôle important dans le développement d'une invasion. D'après Williamson et Fitter (1996), toutes les communautés sont susceptibles d'être envahies mais certaines plus que d'autres en raison de leur fragilité. Ainsi, il semblerait que les perturbations écologiques des habitats soient un facteur favorable aux invasions biologiques : l'anthropisation et l'artificialisation des milieux concourent à diminuer les capacités de résistance et de résilience des écosystèmes face aux invasions (Mack *et al.* 2000 hn; Williamson et Fitter 1996) et favorisent les espèces exotiques opportunistes. Il en serait de même pour les écosystèmes comportant des niches écologiques vacantes ou comportant un faible nombre d'espèces (Mack *et al.* 2000 ; Williamson et Fitter 1996).

Les caractéristiques géographiques, telles que la topographie et la proximité des cours d'eau ou des zones humides, peuvent offrir des voies de transport pour les graines et les plantes, ainsi qu'un habitat favorable pour les espèces exotiques. Parfois, les zones humides peuvent fournir un habitat idéal pour des espèces de grenouilles et de tortues exotiques, un exemple bien connu est la tortue de Floride (*Trachemys scripta elegans*), considérée comme un NAC, elle a été relâchée dans l'environnement, à proximité de cours d'eau, où elle a continué à proliférer. Les zones côtières peuvent également offrir des habitats pour les espèces de crabes et de mollusques exotiques, qui peuvent être transportées sur des bateaux ou dans des ballasts d'eau. Le climat joue également un rôle crucial, car certaines espèces exotiques préfèrent les environnements chauds et secs, tandis que d'autres préfèrent les environnements humides et frais. Par exemple, le lézard commun (*Podarcis muralis*), originaire d'Europe, a été introduit dans plusieurs régions du monde. Il présente des adaptations physiologiques, telles que des capacités de thermorégulation et de tolérance à des températures élevées, qui lui permettent de coloniser des habitats divers (Braña 1991). Les températures plus chaudes peuvent également favoriser la germination précoce des graines et la croissance accélérée des plantes, ce qui peut faciliter la dispersion des espèces exotiques. C'est d'ailleurs le cas pour l'herbe de la pampa (*Cortaderia selloana*) qui produit de grandes quantités de graines légères pouvant être dispersées par le vent sur de longues distances. Les températures plus chaudes, typiques des climats méditerranéens ou tempérés, peuvent stimuler la germination précoce des graines de l'herbe de la pampa, donnant ainsi un avantage à cette espèce exotique (Domènech et Vilà 2008). La fonte des glaces en Arctique est une bonne illustration des mécanismes de réchauffement climatique et d'augmentation des risques d'introduction, car elle permet le passage des navires en ouvrant de nouvelles routes maritimes, donnant accès à des régions auparavant inaccessibles et la mise en contact entre régions auparavant isolées, jusqu'alors préservées des risques d'introductions d'espèces non-indigènes marines (ce sont donc 34 taxons qui ont été introduits entre 1960 et 2015) (UICN Comité français et OFB 2022).

Enfin, les espèces exotiques peuvent avoir des adaptations pour résister à des conditions environnementales extrêmes, telles que des températures élevées ou des sols pauvres, ce qui leur permet de mieux survivre et de coloniser de nouveaux habitats. Les espèces animales peuvent également se propager en utilisant les caractéristiques géographiques et climatiques de l'environnement. Par exemple, certaines espèces de poissons exotiques peuvent être transportées par des cours d'eau et se propager rapidement dans de nouveaux habitats. Les espèces animales exotiques peuvent également avoir des adaptations physiques qui leur permettent de mieux survivre dans des conditions environnementales difficiles ou changeantes, telles que des carapaces plus résistantes pour les tortues ou des capacités de migration saisonnière pour les oiseaux migrateurs. Par exemple, la tortue

(*Testudo graeca*) présente une carapace épaisse et robuste qui lui offre une protection contre les prédateurs et les conditions arides (Znari et al. 2018).

La fragmentation des habitats peut également favoriser l'expansion des espèces exotiques en créant des corridors pour la dispersion. De même, la dégradation des habitats naturels peut favoriser l'expansion des espèces exotiques en créant des conditions favorables à leur survie et à leur reproduction. Par exemple, des études ont montré que certaines espèces d'insectes exotiques envahissants, telles que la pyrale du buis en Europe, ont pu se développer et coloniser de nouvelles zones en raison de l'augmentation des températures moyennes et de la diminution des périodes de gel (Nacambo et al. 2014). Après fragmentation des habitats, on observe toujours une invasion d'espèces « exotiques ». Par exemple, Harrison et Bruna (1999) ont prouvé que les ensembles naturels de petites surfaces d'habitats sont enrichis par le « débordement » de la communauté environnante, tout en perdant quelques espèces spécialistes présentes dans les grandes étendues d'habitats primaires. Ainsi, les espèces aviaires forestières sont plus menacées sur de petits fragments en raison d'un afflux d'espèces généralistes prédatrices provenant de la matrice environnante (Fahrig et Merriam 1994).

Les facteurs chimiques sont un autre élément important dans la propagation des espèces exotiques envahissantes. La présence de nutriments ou de contaminants dans le sol ou l'eau peut favoriser la croissance ou la reproduction des espèces exotiques. Par exemple, des niveaux élevés de nitrates dans l'eau peuvent favoriser la croissance d'algues envahissantes, tandis que la présence de métaux lourds peut favoriser la croissance de plantes exotiques qui ont une tolérance élevée à ces contaminants. Les algues vertes (*Ulva lactuca*) qui peuvent proliférer rapidement en présence de niveaux élevés de nitrates dans l'eau en sont un très bon exemple (Pérez-Mayorga et al. 2011). De plus, certaines espèces exotiques peuvent avoir des adaptations biochimiques qui leur permettent de résister à des toxines ou à des herbicides. Par exemple, certaines espèces de mauvaises herbes exotiques ont développé une résistance aux herbicides couramment utilisés, ce qui leur permet de survivre et de se propager même dans des environnements traités avec ces produits chimiques. C'est d'ailleurs le cas de l'amarante de Palmer (*Amaranthus palmeri*), qui a développé une résistance au glyphosate (Powles 2010). De plus, certaines espèces de mammifères, comme les rats et les souris, peuvent avoir des adaptations biochimiques qui leur permettent de résister aux poisons utilisés pour les éradiquer, ce qui rend le contrôle de leurs populations de plus en plus difficile. Il est donc important de surveiller les niveaux de contaminants chimiques dans les écosystèmes et de prendre des mesures pour prévenir l'introduction d'espèces exotiques envahissantes qui pourraient prospérer dans des conditions environnementales qui ne sont pas favorables aux espèces indigènes.

c. Conséquences écologiques liées à l'introduction d'espèces exotiques

Les espèces introduites comme les invertébrés utilisés en lutte biologique ne présentent pas toutes des conséquences négatives au sein des écosystèmes dans lesquelles elles s'installent. Seule une partie des EEI/EEE est à l'origine d'effets indésirables, directs ou indirects, observés à différentes échelles, en affectant la composition spécifique ou le fonctionnement des écosystèmes d'accueil, voire en menaçant l'équilibre de la biodiversité à une échelle locale.

i. Compétition / Prédation

Les EEE peuvent entrer en compétition ou en prédation avec des espèces autochtones : elles prennent leur espace, leur nourriture ou peuvent être des prédateurs. Par exemple, introduite volontairement en Guadeloupe dans les années 1930 pour lutter contre les rongeurs -également introduits- qui ravageaient les plantations, la petite mangouste indienne a contribué à l'extinction, par prédation, d'un lézard et à la quasi-disparition de deux espèces de couleuvres (OFB 2022; OFB & UICN France 2021).

ii. Hybridation

L'hybridation d'une espèce exotique avec une espèce parente locale peut avoir comme conséquence la disparition de cette dernière, si la descendance hybride et l'espèce exotique sont plus fécondes que l'espèce locale originale. L'Erismature rousse (*Oxyura jamaicensis*) est un petit canard américain introduit accidentellement en Grande-Bretagne dans les années 1950 à partir d'individus échappés de captivité. Son expansion s'est faite rapidement et surtout au détriment de l'Erismature à tête blanche. Deux problèmes principaux résident avec cette introduction, le premier, et de taille, les deux espèces d'Erismature s'hybrident et les descendants sont fertiles. Le second, les mâles d'Erismature rousse sont plus agressifs et dominants dans les groupes mixtes, ce qui augmente le risque de disparition rapide de l'Erismature à tête blanche. Ce problème persiste toujours dans les zones où l'effectif de l'Erismature à tête blanche reste très faible comme en Espagne ou dans des régions françaises comme l'Ain (OFB & UICN France 2020b; Boniface 2020).

iii. Transformation des habitats et paysages

La colonisation par certaines plantes exotiques introduites transforme les habitats naturels et modifie les paysages. Leur prolifération peut également freiner l'écoulement d'une rivière ou empêcher la pénétration de la lumière, et ainsi freiner grandement toute croissance d'autres plantes indigènes. C'est le cas de la salvinie géante, fougère aquatique originaire du Brésil, qui a été introduite dans les

territoires d'outre-mer dans les années 2000 (CDR EEE 2016). Elle est notamment envahissante à Mayotte. Elle forme, en proliférant, des tapis si denses qu'ils empêchent la lumière et l'oxygène de pénétrer dans l'eau et crée des conditions défavorables pour les plantes, poissons, invertébrés et autres organismes vivant dans l'eau (OFB 2022).

d. Risques sanitaires liés aux phénomènes d'introduction

Des vecteurs arthropodes, des plantes allergisantes ou irritantes pour les voies respiratoires, des espèces animales ou végétales et les micro-organismes potentiellement pathogènes, peuvent constituer un risque sanitaire lorsqu'ils sont introduits.

Les agents infectieux introduits représentent un risque car ils arrivent au sein de populations d'hôtes naïves qui ne pourront offrir qu'une réponse immunitaire innée comme ligne de défense et n'auront pas le temps de développer une réponse immunitaire adaptative efficace contre les agents infectieux responsables de la maladie. Dans ces cas-là, parfois, le moyen d'éviter la propagation de l'épidémie, pouvant entraîner des conséquences dramatiques, est de prendre des mesures de contrôle drastiques comme ce fut le cas pour la Covid-19 et les multiples confinements tout autour du globe.
L'introduction, dans une nouvelle zone, de micro-organismes ou d'individus infectés peut avoir des conséquences sur l'écosystème environnant. En effet, prenons l'exemple du virus de la Peste Porcine Africaine (PPA) en Europe de l'Est, après son introduction en Géorgie par de la viande contaminée, le virus s'est diffusé dans les pays alentours (notamment dû à l'intervention humaine et la résistance du virus sur les supports inertes) avec des conséquences dramatiques sur la filière porcine. En effet, une des principales méthodes de contrôle consiste à abattre les cheptels infectés. Des zones de contrôle sont mises en place autour des foyers de PPA pour limiter la propagation de la maladie. Des restrictions de mouvement sont imposées pour les porcs, les produits porcins et les véhicules dans ces zones, ce qui a un impact sur le commerce et la logistique. Les coûts liés aux mesures de contrôle de la PPA sont considérables. Cela comprend les coûts de l'abattage des cheptels infectés, les dépenses pour la mise en place de zones de contrôle, les opérations de surveillance et de gestion des populations de sangliers (réservoirs sauvages du virus), ainsi que les investissements dans les infrastructures et les équipements nécessaires. Dans certains pays, des filières porcines entières ont été touchées (Pologne, Roumanie…), avec des pertes considérables pour les éleveurs et les industries connexes. De plus, l'interdiction d'exportation de porcs et de produits porcins depuis les zones touchées a des répercussions sur le commerce international et les revenus liés à l'exportation (Brown *et al.* 2021 ; Tian et von Cramon-

Taubadel 2020). Enfin, la présence de la PPA a des conséquences importantes sur la santé des suidés domestiques et sauvages.

L'introduction d'arthropodes exotiques peut aussi être à l'origine de maladies infectieuses s'ils s'avèrent être des vecteurs d'agents infectieux comme les moustiques, les tiques et les puces entre autres vecteurs pour les animaux et l'homme, ou les pucerons, thrips, cicadelles et psylles pour les végétaux. Ces vecteurs exotiques peuvent arriver d'ores et déjà infectés et ainsi retransmettre leurs agents infectieux à des hôtes locaux le plus souvent non immunisés contre les agents infectieux portés par ces vecteurs. Aux Antilles, la maladie du Huanglongbing (HLB), causée par *Candidatus Liberibacter asiaticus*, (bactérie localisée dans les vaisseaux du phloème) demeure une contrainte majeure de nature à compromettre le développement des filières agrumicoles. Cette maladie réglementée par une quarantaine est particulièrement problématique. En effet, la HLB provoque une baisse de productivité et un dépérissement des arbres. La maladie se propage de manière épidémique du fait de l'omniprésence du vecteur *Diaphorina citri*, arrivé antérieurement, dans un mouvement de dissémination sur l'arc caribéen (Ehret et al. 2016). L'introduction de nouveaux arthropodes peut également augmenter le risque de transmission d'agents infectieux existant localement, soit en augmentant le taux de transmission de ce micro-organisme, soit en élargissant la saison de transmission ou le spectre d'hôtes susceptibles ou sensibles.

e. Conséquences économiques liées à l'introduction d'espèces exotiques

Les espèces exotiques introduites et envahissantes ont des répercussions économiques considérables. Leur introduction dans un nouvel environnement peut causer d'importantes pertes agricoles en détruisant les cultures et en concurrençant les espèces indigènes, ce qui entraîne une diminution des revenus agricoles (des oiseaux granivores introduits qui se déplacent en nombre comme le capucin damier peuvent causer des pertes agricoles, empêchant toute culture du riz.). De plus, leur gestion requiert des investissements significatifs en termes de recherche, de surveillance, de prévention et de contrôle, entraînant des coûts élevés pour les gouvernements et les organisations concernées. Les espèces invasives peuvent également endommager les infrastructures, telles que les bâtiments et les routes, nécessitant ainsi des réparations coûteuses (les élodées américaines qui obstruent les écoulements d'eau ou encore les ragondins qui détruisent les berges). De plus, elles perturbent les écosystèmes naturels en altérant les habitats et en déplaçant les espèces indigènes, ce qui peut avoir un impact négatif sur les activités économiques qui dépendent de ces écosystèmes, comme le tourisme, la pêche et la foresterie. En outre, ces espèces peuvent causer une diminution de la biodiversité, ce qui

affecte les services écosystémiques essentiels et peut avoir des répercussions économiques à long terme. Enfin, certaines espèces invasives peuvent compromettre le commerce international en contaminant les produits agricoles ou en nécessitant des mesures de quarantaine coûteuses.

Les processus d'introduction et d'invasion ne se limitent pas seulement aux plantes et aux animaux, mais ils sont également observés chez de nombreux arthropodes vecteurs tels que les tiques. Ces créatures jouent un rôle crucial dans la dissémination de maladies, avec des conséquences écologiques, sanitaires et économiques significatives. Les tiques se distinguent notamment par leur capacité à rester accrochées à leurs hôtes vertébrés pendant des périodes prolongées, allant de 8 à 20 jours en fonction de leur stade de développement et du nombre d'hôtes dans leur cycle. Cette caractéristique bio-écologique leur permet d'être disséminées passivement sur de longues distances, augmentant ainsi leur potentiel d'invasion et leur capacité à coloniser de nouveaux environnements. Par conséquent, comprendre ces processus et leurs implications devient essentiel pour atténuer les risques associés à ces arthropodes vecteurs et pour mettre en place des mesures de prévention et de contrôle efficaces.

III- Les tiques : espèces introduites favorables aux invasions biologiques et bons vecteurs d'agents infectieux

a. Taxonomie

Les tiques sont classées dans l'embranchement des arthropodes (*Arthropoda*) au sein du règne animal car elles disposent d'un squelette externe (ou exosquelette) et d'appendices articulés qui sont des éléments morphologiques caractéristiques utilisés en taxonomie (Boulanger et McCoy 2017). La présence de chélicères et l'absence d'antennes les positionnent dans le sous-embranchement des *Chelicerata* et au sein de la classe des *Arachnida*, tout comme les araignées. Enfin, les tiques appartiennent à la sous-classe des Acariens et sont formées de deux parties le capitulum (qui porte les pièces buccales) et l'idiosome. Elles appartiennent à l'ordre des *Ixodida*, les plus gros acariens et les seuls hématophages stricts. Cet ordre comprend trois familles monophylétiques de tiques, dont la plus importante est la famille des *Ixodidae* (tiques dures, c'est-à-dire avec un scutum -ou carapace- sclérifié complet ou partiel) qui comprend plus de 700 espèces (Sonenshine *et al.* 2014 ; Pérez-Eid 2007), la famille des *Argasidae* (tiques molles, sans scutum) qui est composée d'environ 200 espèces (Alberto A. Guglielmone et al. 2010), et enfin *Nuttalliellidae* qui ne comprend qu'une seule espèce, *Nuttalliella namaqua* décrite en Afrique et présentant des caractéristiques communes aux tiques molles et aux tiques dures (Mans et al. 2011). A l'intérieur des deux premières familles, les espèces sont regroupées

en genres dont certains sont très connus comme le genre *Ixodes* qui comprend les seules espèces capables de transmettre en Eurasie et en Amérique du nord les spirochètes responsables de la maladie de Lyme (Marques et al., 2021).

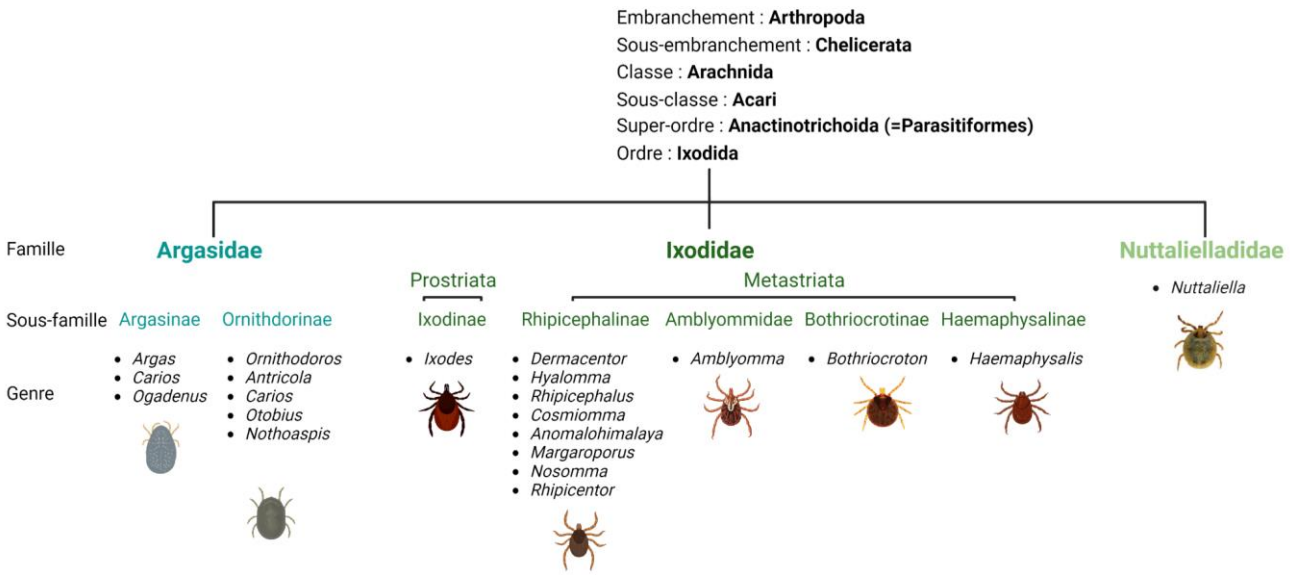


Figure 4 : Classification systématique des tiques (Ixodida). Classification taxonomique réalisée d'après Gulielmone *(2010)*.

Historiquement, la classification systématique des tiques se basait sur la caractérisation morphologique des spécimens ainsi que sur l'étude de leurs caractéristiques biologiques et écologiques et de leur répartition géographique. Par la suite, le développement des techniques de biologie moléculaire a permis d'affiner en partie les données de taxonomie grâce aux études de phylogénie, basées entre autres sur l'amplification par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) d'une partie du génome mitochondrial et des gènes nucléaires (Boulanger et McCoy 2017; Burger et al. 2014). Ainsi, la taxonomie au niveau du genre et des espèces a pu être clarifiée et un certain degré de consensus être trouvé. Au final, les tiques dures sont réparties au sein de 12 genres (les deux genres fossile *Compluriscutula* et *Cornupalpatum* non compris) : *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Amblyomma*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Anomalohimalaya*, *Bothriocroton*, *Cosmiomma*, *Margaropus*, *Nosomma* et les *Rhipicentor* (Alberto A. Guglielmone et Nava 2014; A. Estrada-Peña 2015). La classification des tiques molles quant à elle reste encore controversée, le nombre et le nom des genres variant en fonction des écoles de pensée ; la caractérisation morphologique, biologique, écologique autant que les critères génétiques restent controversés (Plantard, Pavel, et Vial 2017). Un des freins majeurs à la mise en place d'un consensus taxonomique sur les *Argasidae* est le manque de paramètres objectivés définissant clairement les termes descriptifs et les traits morphologiques

spécifiques des spécimens mais aussi parce que seules les larves présentent *a priori* les caractéristiques morphologiques spécifiques (et sont difficiles à collecter dans la nature) (Boulanger et McCoy 2017).

b. Morphologie externe

Parmi les éléments permettant la distinction des grandes familles de tiques, les tiques dures, appartenant à la famille des Ixodidae, présentent en leur surface une carapace ou plaque dorsale chitinisée sclérifiée, appelée scutum. Leurs pièces buccales, portées par le capitulum, se situent en position apicale et sont visibles que la tique soit en face dorsale ou ventrale. Les tiques molles appartenant à la famille des Argasidae se distinguent des tiques dures par l'absence de scutum ; à leur surface, une peau ou cuticule souple est présente. Le capitulum et les pièces buccales se situent cette fois-ci en face ventrale, logés dans une cavité nommée camérostome (Sonenshine et al. 2014a).

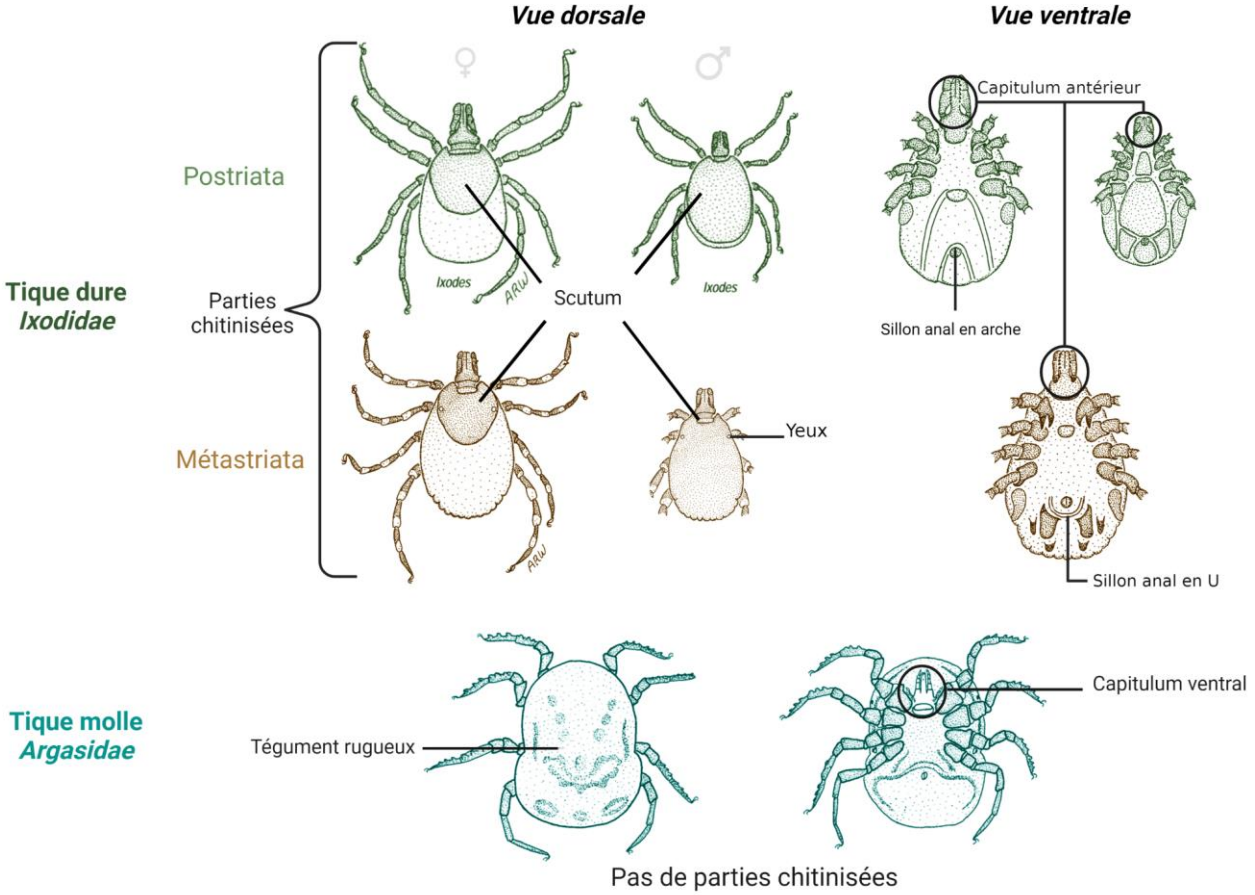


Figure 5 : Caractéristiques morphologiques des tiques. Différences principales entre les tiques molles et les tiques dures d'après *(Pérez-Eid 2007)* et adapté à partir de *(Barker et Walker 2014)*

i. Le capitulum

Le capitulum (ou gnathosome) porte sur sa base, appelée basis capituli, les pièces buccales. Le capitulum est composé d'une paire de palpes symétriques, à rôle exclusivement sensoriel et, axialement, du rostre permettant l'action d'attachement et de gorgement sur l'hôte vertébré. Le rostre comporte l'hypostome en position ventrale et les chélicères en position dorsale. Les chélicères sont formées d'une lame et de doigts griffus et permettent à la tique de découper la peau de l'hôte, tandis que l'hypostome présente plusieurs rangées de denticules tout du long et constitue l'organe d'ancrage de la tique dans le derme de la peau de l'hôte. Enfin, chez les femelles Ixodidae, au niveau de la basis capituli, on retrouve des aires poreuses qui assurent des fonctions physiologiques notamment lors de la ponte des œufs (Pérez-Eid 2007). Selon les genres, les pièces buccales peuvent être plus ou moins longues et la basis capituli de forme différente (triangulaire, rectangulaire ou hexagonale, avec des pointes ou non, avec des aires poreuses plus ou moins espacées chez les femelles…). Le nombre de denticules et de rangées de denticules sur l'hypostome peut varier d'une espèce à une autre.

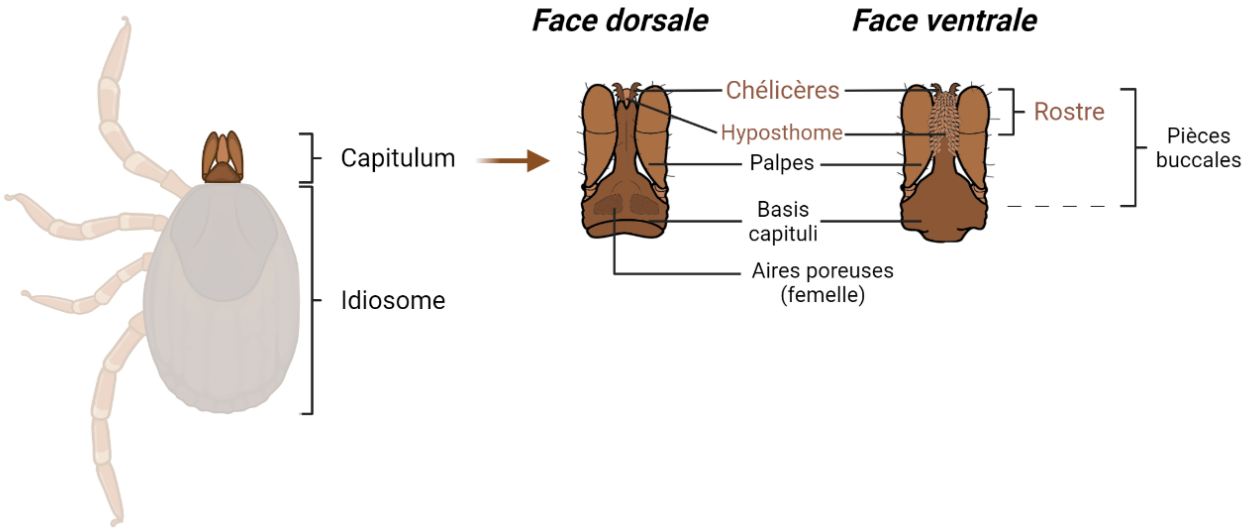


Figure 6 : Détail du capitulum des tiques dures, adapté d'après *(Boulanger et McCoy 2017; Sonenshine et al. 2014a; Pérez-Eid 2007)*.

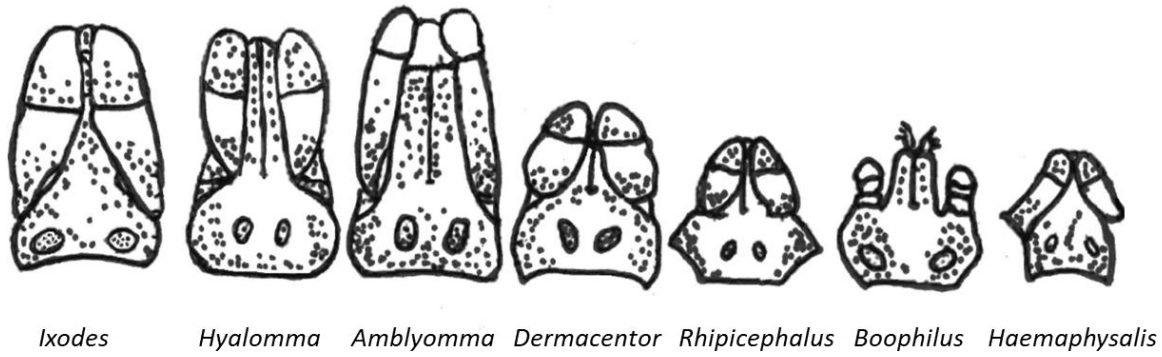


Figure 7: Les différents types de capitulum retrouvés chez les tiques dures d'après *(Pérez-Eid 2007)*

ii. L'idiosome

L'idiosome (ou corps de la tique) est constitué en face dorsale d'un tégument, sclérifié ou non. Chez les tiques dures, c'est ce tégument qui permet la distinction des mâles et des femelles. En effet, les mâles ont un tégument complet qui recouvre la totalité de la face dorsale, appelé conscutum, tandis que les femelles (mais également les larves et les nymphes) présentent un tégument partiel, appelé alloscutum, ne recouvrant que la partie antérieure du corps et permettant la dilatation de la partie postérieure lors du repas sanguin. Chez les tiques dures femelles, cette élasticité n'est cependant pas suffisante et de la cuticule est synthétisée tout au long de leur repas sanguin, afin de pouvoir contenir la totalité du sang ingéré. En face ventrale des tiques de la famille des Ixodidae, certaines zones peuvent être sclérifiées, notamment les coxae (ou hanches sur lesquelles s'insèrent les pattes), mais aussi chez les mâles, des parties de tégument autour de l'orifice anal appelées plaques (anales, adanales et subadanales) dont la forme caractéristique est très utile en identification morphologique spécifique (Pérez-Eid 2007). En revanche chez les tiques molles, le tégument est chitinisé, sans sclérification, souple et rugueux, avec quelques variations d'aspect en fonction des genres décrits (Pérez-Eid 2007).
L'idiosome est divisé en deux parties. La première, antérieure, appelée le podosome, porte les paires de pattes et le pore génital. Le nombre de paires de pattes varie selon le stade (on en trouvera trois chez les larves et quatre chez les nymphes et les adultes). C'est grâce aux extrémités des pattes où sont présentes des griffes et des ventouses que les tiques peuvent se fixer sur leurs hôtes (S. Bonnet et al. 2017). Au niveau de la première paire de pattes se trouve l'organe de Haller qui présente de nombreuses fonctions sensorielles importantes pour la localisation des proies ou encore la reconnaissance de phéromones (Sonenshine et al. 2014a). La présence sur l'idiosome d'autres organes sensoriels comme les yeux (ou ocelles), les soies tactiles, les pores (appelés ponctuations) varient en fonction des familles et des genres de tiques. Au niveau de l'opisthosome, en partie postérieure de

l'idiosome, se trouvent les plaques stigmatiques (plaques sur le côté de la tique, entre les troisième et quatrième paire de pattes, où débouchent les trachées c'est-à-dire les organes intervenant dans la respiration) ainsi que l'orifice anal en face ventrale. Le sillon anal, selon qu'il passe au-dessus ou en-dessous de l'orifice anal, est un critère permettant de reconnaitre le genre *Ixodes* des autres genres de tiques dures. Chez les mâles, en face dorsale, le bord postérieur du scutum peut être dentelé de festons dont le nombre et la coloration de certains peuvent varier d'une espèce à une autre.

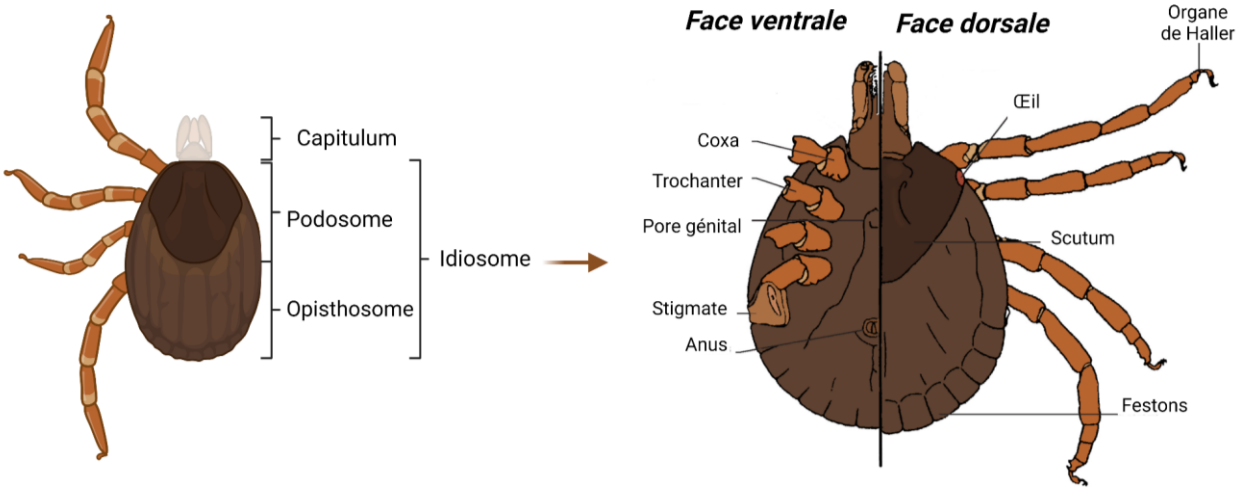


Figure 8 : Morphologie externe d'une tique dure (S. Bonnet et al. 2017 ; Pérez-Eid 2007)

c. Physiologie et anatomie

L'anatomie interne des tiques est très similaire entre les tiques molles et les tiques dures (S. Bonnet et al. 2017).

i. Le système digestif

Les tiques sont des arthropodes hématophages stricts, qui se nourrissent exclusivement du sang de leur hôte. Hormis certaines espèces de tiques dont les larves ou les mâles ne se nourrissent pas, toutes les stases de tiques prennent un repas sanguin (S. Bonnet et al. 2017). Il existe aussi une différence entre tiques dures et tiques molles, puisque ces dernières se gorgent assez rapidement sur leur hôte (30 minutes à quelques heures) alors que les tiques dures restent accrochées à leur hôte pendant 8 à 10 jours pour leur repas sanguin, voire plusieurs semaines pour les espèces dont les stades larvaires et nymphaux (voire même les trois stades) se gorgent sur le même hôte (S. Bonnet et al. 2017). Cette caractéristique est un facteur favorisant l'introduction et la dissémination passive des tiques via leur transport par leurs hôtes vertébrés.

L’appareil digestif des tiques débute par la cavité buccale, dont l’hypostome constitue le plancher et les chélicères les parois dorso-latérales. Chez les tiques, à la différence de nombreux insectes hématophages, il n’existe ni canal alimentaire, ni canal salivaire individualisé. Le sang de l’hôte et la salive de la tique, sont alternativement aspirés pour l’un et émis pour l’autre plusieurs fois au cours d’un repas sanguin. Cette cavité fait suite au pharynx qui s’ouvre sur l'œsophage qui lui-même se termine par une valvule qui a pour rôle de s’opposer au reflux du sang. Ensuite on retrouve le tube digestif qui est l’appareil le plus développé du système digestif des tiques. Il est constitué d’une partie centrale, ou estomac, et de parties latérales très ramifiées, appelées diverticules ou *caecae*. C’est à ces niveaux que se produit la digestion, en particulier la dégradation de l’hémoglobine et l’hydrolyse des protéines (puis assimilation, destruction des fragments cellulaires absorbés, extraction de l’eau du repas…). Le repas sanguin progresse par péristaltisme dans cette portion. Chez les tiques, contrairement aux moustiques par exemple, la digestion du sang s’effectue à l’intérieur des cellules épithéliales et non dans la lumière intestinale (Sojka et al. 2013). La grande quantité de sang absorbé par les tiques, jusqu’à plus de 100 fois leurs poids à jeun pour certaines espèces, les oblige à réguler l’apport de fluide en concentrant leur bol alimentaire, pour conserver les éléments essentiels et évacuer l’eau et les composés ioniques en excès. Cette transsudation se fait chez les tiques dures, via les glandes salivaires dans la plaie de l’hôte et via les glandes coxales chez les tiques molles. Ainsi, des éléments de l’hôte vertébré vont, au cours du repas, passer de l’intestin aux glandes salivaires pour être réinjectés à l’hôte. Lorsque la tique prend son repas de sang, elle peut ingérer des agents infectieux, c’est alors le processus de digestion qui permet l’intégration de l’agent infectieux au sein de l’organisme de la tique. Le processus de passage de la barrière organique qu’est le tube digestif n’est toujours pas clair. En effet, alors que le virus de la PPA peut subir une phagocytose passive dans les tiques molles puisque le virus effectue une réplication initiale dans les cellules digestives phagocytaires de l’épithélium intestinal (J. Bernard 2015), pour la bactérie *B. burgdorferi*, la plupart des spirochètes restent dans la lumière de l'intestin des tiques pendant toute la durée du processus de mue avant de migrer vers les glandes salivaires lors du gorgement suivant (Kurokawa et al. 2020). Un court intestin fait suite à l’estomac et aux *caecae*, puis se dilate en un sac rectal qui débouche dans le rectum, partie terminale du tube digestif qui s’ouvre à l’extérieur par l’anus (Pérez-Eid 2007).

L’eau produite au cours de la digestion du repas sanguin va quant à elle être excrétée via les glandes salivaires chez les tiques dures pour l’osmorégulation, et via les glandes coxales débouchant sur les pores coxaux chez les tiques molles (Boulanger et McCoy 2017). Les tiques peuvent digérer leur repas de sang durant des mois et vivre plusieurs années sur ces réserves (Sojka et al. 2013).

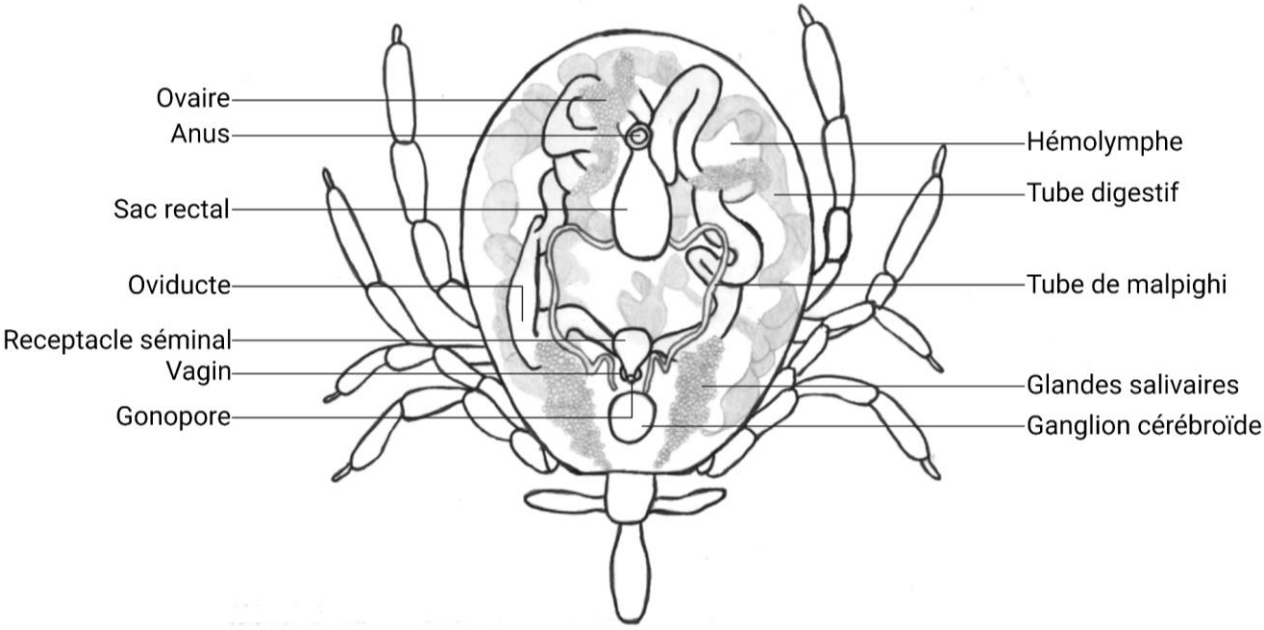


Figure 9 : Représentation schématique de l'anatomie interne d'une femelle ixodidae avec le système digestif, circulatoire, nerveux et reproducteur (Dessin : Côme Morel).

ii. Glandes salivaires

Les tiques possèdent deux glandes salivaires, elles-mêmes constituées d'acini reliés entre eux par des canules, l'ensemble formant une grappe. Au sein de ces acini, des granules de sécrétion sont retrouvées. Il existe quatre types d'acini différents (types I, II, III et IV), définis en fonction de la nature et composition (type de cellules) des granules de sécrétion et chacun ayant sa propre fonction (S. Bonnet et Boulanger 2017). Le type I est agranulaire et les 3 autres sont granulaires. Les acini de type IV sont seulement retrouvés chez les mâles et ont un rôle dans la lubrification et le transfert du spermatophore (sac contenant les spermatozoïdes) dans l'orifice génital de la femelle au cours de l'accouplement (la salive sert à lubrifier le capitulum du mâle lors de l'insertion dans la cavité vaginale de la femelle). De multiples fonctions sont attribuées à ces glandes salivaires. Elles sont impliquées dans la sécrétion de multiples composés dans la salive, molécules qui facilitent la prise du repas sanguin (molécules cytolytiques et protéolytiques, anticoagulants…), qui modulent la réaction de l'hôte (molécules analgésiques, anti-inflammatoires, immunosuppressives…) et qui par conséquent peuvent favoriser la réplication locale des agents infectieux lorsqu'ils ont été injectés dans le derme de l'hôte en diminuant la réaction immunitaire cellulaire précoce de ce dernier (Šimo et al. 2017). En effet, une étude réalisée en 2014 a montré qu'au niveau de la piqûre du derme, la salive de la tique diminue l'abondance des cellules de Langerhans (cellules de l'immunité présentant les antigènes aux lymphocytes lors d'une infection) mais augmente le recrutement des macrophages qui peuvent être les premières cibles de virus ou de bactéries, et notamment ici du virus de la PPA (J. Bernard et al. 2016). Les glandes

salivaires et la salive jouent aussi un rôle clé dans la transmission même des agents infectieux aux hôtes vertébrés, la salive étant le plus répandu des moyens de transport et d'inoculation par piqûre des agents infectieux à l'hôte vertébré. Enfin, les glandes salivaires sont aussi le lieu de la régulation de l'hydratation de la tique, ce qui permet l'évacuation de l'eau issue du repas sanguin pour le maintien de l'homéostasie.

iii. Tubes de Malpighi

Les tubes de Malpighi ont une fonction excrétoire, en collectant les produits azotés présents dans l'hémolymphe de la tique et issus du métabolisme des différents organes mais également un rôle d'osmorégulation. Ces déchets sont transformés en cristaux de guanine puis acheminés vers le sac rectal, et enfin excrétés par l'anus (S. Bonnet et al. 2017).

iv. Système respiratoire

La respiration est différente entre les larves et les autres stades. En effet, chez les larves, la respiration se fait de manière transcutanée à travers la cuticule (Boulanger et McCoy 2017). Pour les stades nymphaux et adultes, des organes présents de chaque côté de la tique, sous la quatrième paire de pattes, sont la voie d'entrée d'air par un réseau trachéolaire très ramifié et formant des arborescences au contact des différents organes de la tique : c'est ce qu'on appelle les stigmates qui se trouvent au niveau de la plaque stigmatique (ou plaque spiraculaire).

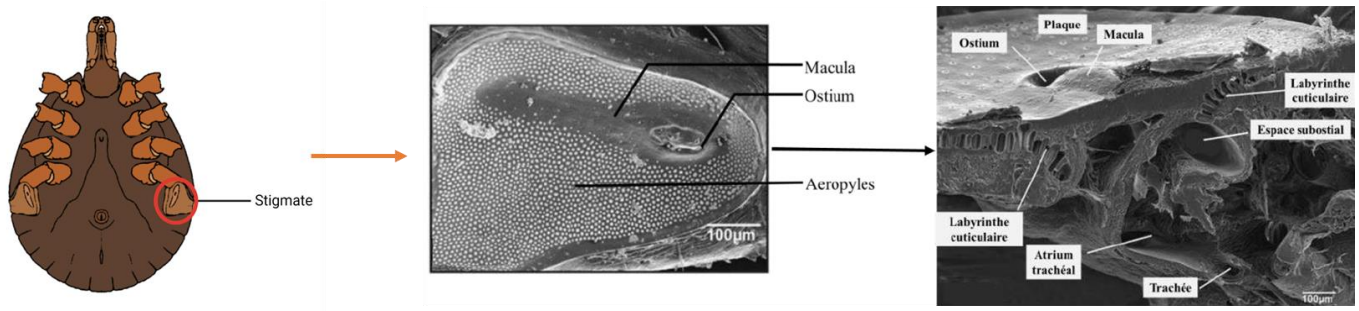


Figure 10 : Appareil respiratoire, exemple des tiques dures à partir de (Sonenshine et al. 2014 ; Barker et Walker 2014)

v. Système circulatoire

Les tiques possèdent un système circulatoire ouvert et simple. La circulation de l'hémolymphe (liquide dont la fonction est comparable au sang et à la lymphe chez les vertébrés) se fait grâce à un vaisseau dorsal bombé en forme de cœur et entouré d'un sinus qui permet de propulser et de disperser l'hémolymphe au sein de la tique (Sonenshine et al. 2014b). L'hémolymphe remplit la cavité interne

appelée hémocèle, baignant ainsi la totalité des organes internes, ainsi que les parties internes du capitulum et des pattes. L'hémolymphe, qui contient les éléments du système immunitaire, présente plusieurs fonctions dont le transport de métabolites et d'hormones, le maintien de la pression osmotique (Sonenshine et al. 2014b). Elle est constituée de plasma riche en protéines et cellules appelées hémocytes qui sont les cellules du système immunitaire des tiques capables de synthétiser des peptides antimicrobiens (Boulanger et McCoy 2017). Enfin, lorsque les agents infectieux ingurgités par la tique via son repas sanguin sont digérés et traversent la barrière intestinale, ces derniers se retrouvent dans l'hémolymphe qui les dissémine au sein de la tique et les transporte aux divers organes de transmission (Figure 14).

vi. Système nerveux

Le système nerveux central des tiques est concentré en une masse ganglionnaire, ou ganglion cérébroïde (nommé "*synganglion*" en anglais), située autour de l'œsophage, en arrière de l'ouverture génitale (Figure 10). Cette masse est constituée de divers ganglions connectés aux différents organes de la tique : les chélicères, les palpes et glandes salivaires, les yeux (pour les espèces pourvues de système optique), les pattes et les organes de Haller. Différents nerfs (stomacal, pharyngien) et cordons nerveux partent de la masse ganglionnaire pour assurer l'innervation de l'ensemble des organes de la tique. Chez les tiques, il n'y a pas de chaîne ganglionnaire postérieure comme chez la plupart des arthropodes (Pérez-Eid 2007).

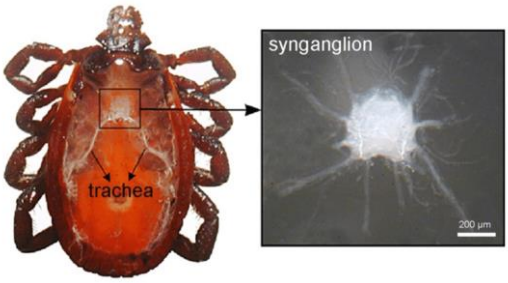


Figure 11: Photographie du synganglion de la tique *Rhipicephalus appendiculatus* adaptée de Šimo et al. *(2009)*

vii. Système reproducteur

Les tiques présentent une reproduction sexuée obligatoire (accouplement entre un mâle et une femelle), mis à part quelques rares cas de parthénogénèse (mode de reproduction monoparental induisant la production de nouveaux individus à partir d'ovules non fécondés) décrits notamment pour l'espèce *Haemaphysalis longicornis* (Chen et al. 2012). Dès sa naissance, une tique est génétiquement mâle ou femelle, bien que ce ne soit qu'au stade adulte qu'on soit capable de différencier le sexe morphologiquement. L'appareil génital de la femelle est composé d'un ovaire unique, en forme de

chapelet disposé en position arrière du corps. Deux oviductes partent de l'ovaire pour s'unir en un seul débouchant dans le vagin qui se termine par une partie tubulaire aboutissant à l'orifice génital ou gonopore en face ventrale (Figure 9). L'appareil génital du mâle est constitué d'une paire de testicules tubulaires reliée au canal déférent qui débouche sur le conduit éjaculatoire et le gonopore.

Selon l'espèce, l'accouplement s'effectue sur l'hôte pendant le repas sanguin (ou avant celui-ci). Chez les tiques dures, l'accouplement débute par l'introduction des pièces buccales du mâle dans les voies génitales de la femelle pour y déposer un spermatophore dans le vagin de cette dernière. Les spermatozoïdes vont ensuite mûrir au travers des voies génitales de la femelle (S. Bonnet et al. 2017). Chez les tiques dures, l'accouplement n'a lieu qu'une fois et la ponte des femelles, qui se déroule après leur unique gorgement, peut produire de 2 000 à 12 000 œufs selon les espèces. Chez les tiques molles, une femelle peut s'accoupler et pondre autant de fois qu'elle se gorge, les pontes sont multiples mais de taille bien plus restreinte, de 50 à 200 œufs par ponte. Pour toutes les tiques, les œufs sont pondus en une masse unique et la ponte peut durer plusieurs jours. Les oeufs sont récupérés par l'organe de Géné (situé au niveau de l'orifice génital) qui se dévagine, puis sont enrobés d'une substance protectrice émise par cet organe et les aires poreuses pour les tiques dures, afin d'éviter leur déshydratation dans le milieu extérieur (Pérez-Eid 2007).

d. Bio-écologie

i. Endo ou exophilie

Les tiques sont des ectoparasites qui, au cours de leur cycle de vie, alternent entre des phases de vie libre dans l'environnement et des phases de vie parasitaire lorsqu'elles se nourrissent du sang de leurs hôtes. C'est cette alternance qui constitue le cycle de développement de la tique, de l'œuf pondu par la femelle jusqu'au stade adulte capable de se reproduire. Chez les tiques dures, se succèdent après l'éclosion des œufs un stade larvaire, un stade nymphal et un stade adulte, mâle ou femelle, alors que les tiques molles présentent une succession de plusieurs stades nymphaux après la larve, chacun nécessitant un repas sanguin pour passer au stade suivant et aussi plusieurs stades adulte pour la femelle avec plusieurs repas (Pérez-Eid 2007). La durée des cycles de développement varie en fonction des espèces de tiques et peut s'étaler sur plusieurs mois, voire plusieurs années lorsque ces dernières réalisent des périodes d'arrêt saisonnier (diapause) dans leur développement ou leur activité de recherche d'hôtes (Boulanger et McCoy 2017). Le temps passé en phases parasitaires est généralement plus court que celui passé en phases de vie libre, et ainsi les conditions environnementales ont une forte influence sur la survie et le bon développement des tiques. C'est entre autres sur cette relation que l'on définit le concept de niche écologique, c'est-à-dire les conditions environnementales biotiques

et abiotiques propres à chaque espèce (ici, de tiques) permettant leur survie et le bon déroulement de leur cycle de vie (Hutchinson 1957). Les tiques molles ont, quant à elles, la particularité d'être strictement nidicoles voire endophiles, c'est-à-dire qu'elles colonisent des micro-habitats protégés comme des nids, des grottes, des terriers ou des anfractuosités de bâtiments, et parasitent de fait les hôtes qui y vivent (Boulanger et McCoy 2017). Certaines tiques dures sont exophiles mais présentent certains stades de développement préférant coloniser des milieux protégés, comme c'est le cas pour les immatures de *Dermacentor marginatus* se retrouvant dans des terriers de rongeurs ou l'espèce *Rhipicephalus sanguineus* qui peut se retrouver à tous les stades à parasiter les bâtiments, dont les chenils pour chiens (Dantas-Torres 2010). Toutefois, même lorsqu'une espèce de tique ou un stade est nidicole ou endophile, les conditions de son micro-habitat sont certes tamponnées mais dépendent toujours du climat extérieur (Vial 2009).

Les tiques sont connues pour leur capacité d'adaptation et leur pouvoir invasif. Tout d'abord, certaines espèces de tiques ont une large gamme d'hôtes potentiels, ce qui signifie qu'elles peuvent se nourrir de différentes espèces animales. Cela leur permet de s'installer dans de nouveaux habitats en exploitant les populations d'animaux disponibles (bien que certaine comme *Rhipicephalus microplus* qui est monotrope se nourrit que sur un seul type d'hôte et ici les bovins). Certaines espèces de tiques peuvent également se reproduire par parthénogenèse, ce qui signifie qu'elles peuvent se reproduire sans avoir besoin d'un partenaire. Cela augmente leur capacité de reproduction. Elles sont capables de s'adapter à différents climats et conditions environnementales, certaines espèces sont plus adaptées aux climats chauds et humides, tandis que d'autres préfèrent les climats plus frais. Leur tolérance à des conditions variées leur permet de coloniser de nouveaux habitats et de se répandre sur de vastes territoires.

ii. Cycle de développement

Chez les tiques, du nombre de phases parasitaires dépend généralement le nombre d'hôtes parasités.

Les tiques molles ont un cycle de vie de type polyphasique (ou polyxène) qui implique de nombreux stades parasitaires, puisqu'il existe plusieurs stades nymphaux qui se gorgent systématiquement pour passer au stade de développement suivant et que les stades adultes se nourrissent plusieurs fois au cours de leur existence.

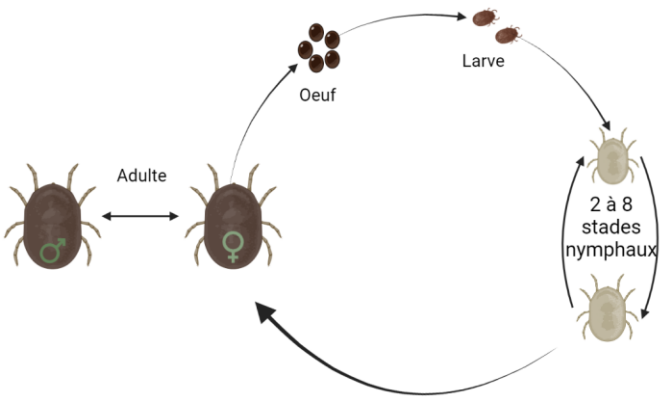


Figure 12 : Cycle de développement polyxène des tiques molles de la famille des Argasidae

Chez les tiques dures, le cycle triphasique est le cycle suivi par la majorité des genres, tels que *Amblyomma*, *Anomalohimalaya*, *Bothriocroton*, *Haemaphysalis*, *Ixodes*, et certaines espèces des genres *Rhipicephalus*, *Dermacentor* et *Hyalomma* (Sonenshine et al. 2014a). Il comporte trois stades parasitaires distincts : la larve, la nymphe et l'adulte, qui se nourrissent chacun sur un hôte différent. Après chaque repas, la tique tombe au sol, effectue sa mue et parasite un nouvel hôte. Le cycle diphasique est suivi par certaines espèces de tiques des genres *Hyalomma* et *Rhipicephalus* (Sonenshine et al. 2014a). Il comporte cette fois-ci deux stades parasitaires : les immatures et l'adulte, la larve et la nymphe se nourrissant sur le même hôte puis la nymphe tombant au sol pour réaliser sa métamorphose avant que l'adulte ne parasite un nouvel hôte. Enfin, de rares espèces de tiques comme *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ou *Hyalomma scupense* en Afrique du nord, réalisent un cycle monophasique c'est-à-dire qu'elles parasitent le même animal tout au long de leur cycle (Sonenshine et al. 2014a). Pour *R. microplus*, il est supposé que le caractère qui a favorisé son introduction et sa dissémination est lié aux mouvements des bovins sur lesquels elle est toujours attachée. Cela lui confère aussi une capacité d'invasion importante car elle est moins sensible à son environnement étant toujours protégée par son hôte. De plus, à force de subir les traitements qui sont conférés à son hôte, elle a développé une résistance aux acaricides. On considère souvent que la diminution du nombre de phases libres est un avantage sélectif pour les tiques afin d'être moins soumises aux contraintes environnementales et aux risques de ne pas trouver d'hôtes et donc de ne pas maintenir leur cycle.

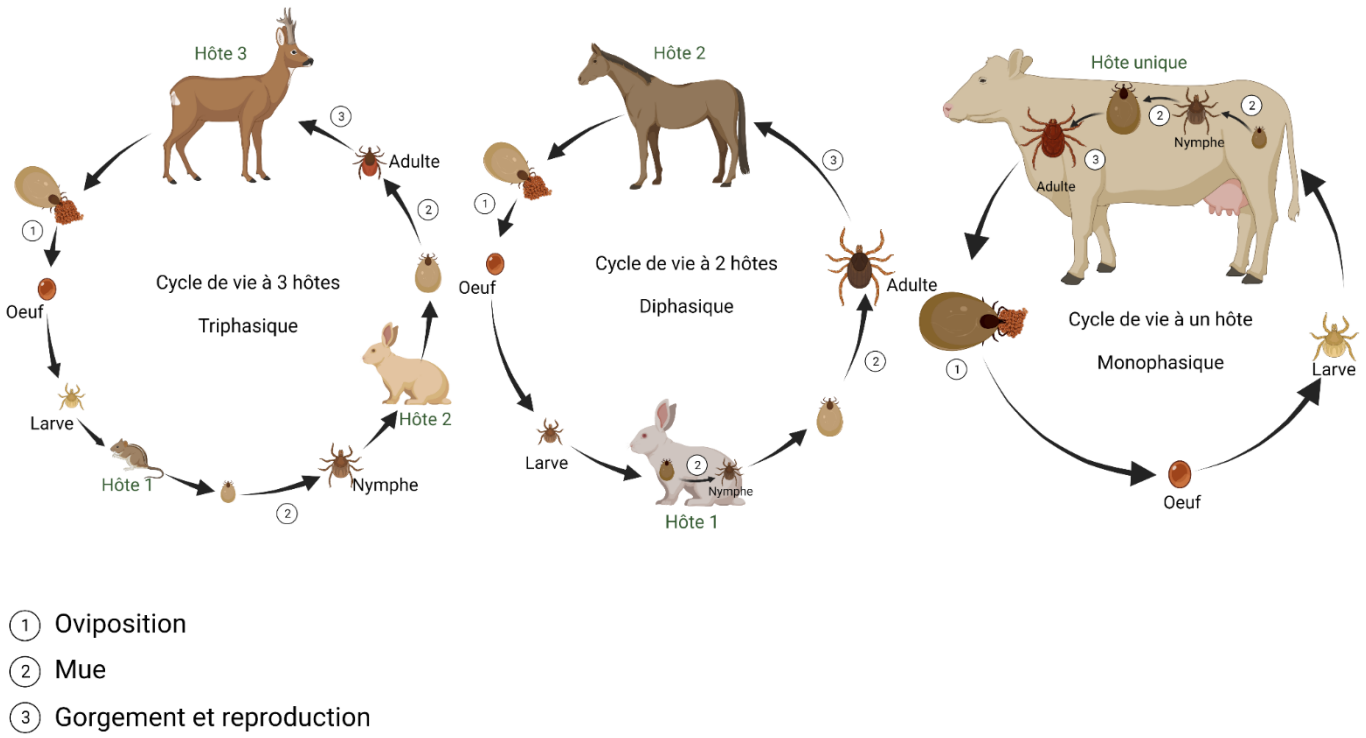


Figure 13 : Différents cycle de développement des tiques (monophasique, diphasique ou triphasique) adapté de *(Sonenshine et al. 2014a)*

iii. Tropisme ou préférence d'hôtes

On utilise le terme de "préférences trophiques" pour indiquer si une espèce de tique a une prédilection ou non pour certains hôtes vertébrés. Néanmoins, les hôtes sur lesquels les tiques se nourrissent peuvent dépendre aussi de leur disponibilité. On distingue deux types de cycles trophiques : les cycles monotropes (ou monoxènes), dans lesquels les tiques se nourrissent uniquement sur une seule espèce d'hôte, et les cycles télotropes (ou hétéroxènes), qui impliquent plusieurs espèces d'hôtes différentes selon la phase de développement de la tique. Certaines tiques ont des préférences très spécifiques, comme c'est le cas pour *Rhipicephalus sanguineus* qui ne pique que les chiens, sauf en cas de disparition de son hôte préférentiel. D'autres espèces, comme *Ixodes ricinus* ou *Amblyomma variegatum*, ont un large éventail d'hôtes potentiels, tels que les micromammifères, les chiens, les oiseaux, les grands ongulés sauvages ou le bétail. Les préférences trophiques dépendent souvent de la phase de développement de la tique, les stades immatures étant généralement plus polyvalents que les adultes mais également de la longueur des pièces buccales et de la taille des hôtes. Elles peuvent également dépendre de la méthode de chasse utilisée par la tique ou par la phase de développement.

Il convient de noter que ces préférences trophiques peuvent avoir des conséquences importantes à la fois sur la structure des populations de tiques et sur la transmission d'agents infectieux. Un large éventail d'hôtes peut entraîner le déplacement des tiques sur de longues distances, que ce soit par le biais des oiseaux migrateurs, du commerce international ou des transhumances d'ongulés domestiques. Cela favorise les phénomènes d'introduction et de dissémination des tiques.

e. Transmission d'agents infectieux

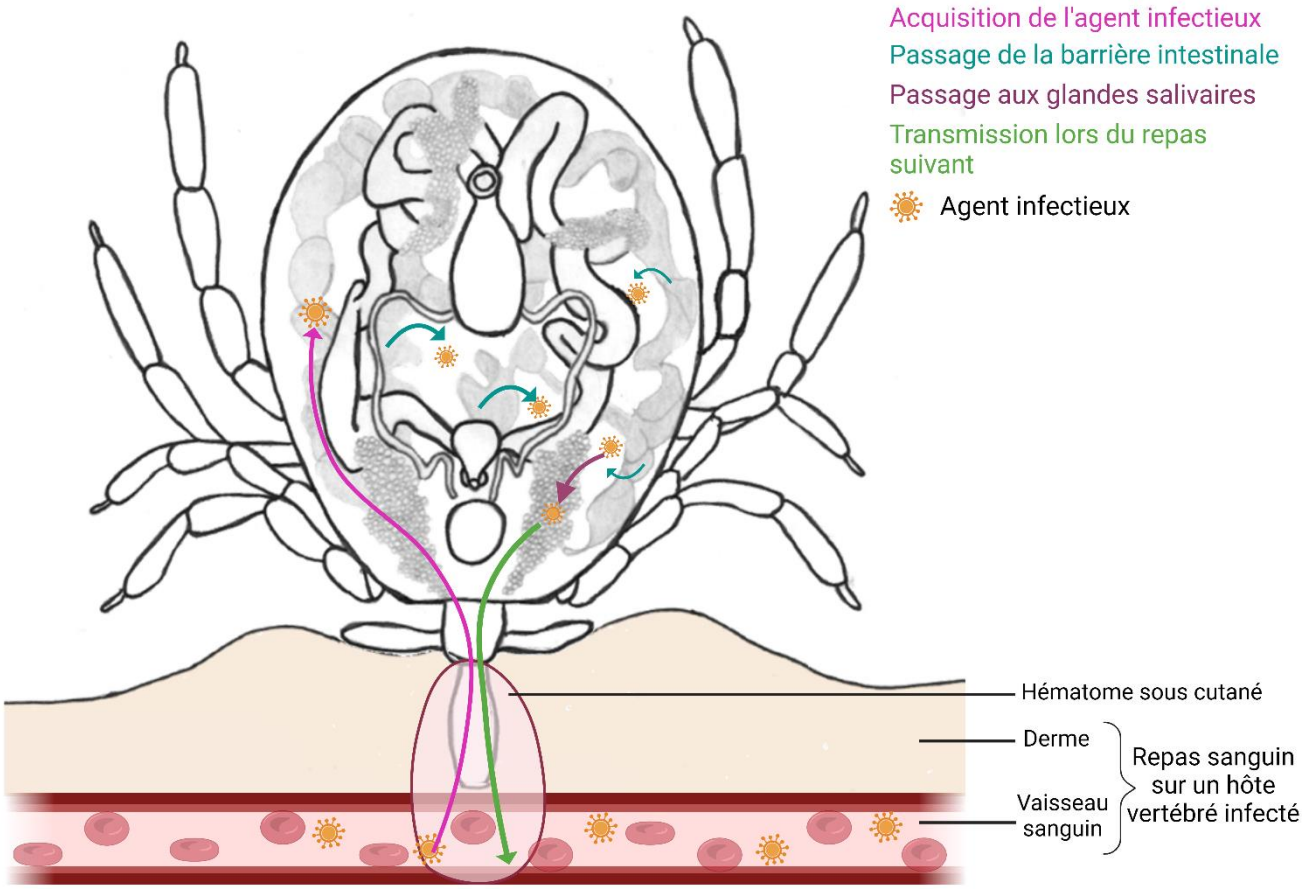


Figure 14 : Mécanisme général de l'acquisition et de la transmission des agents infectieux par la tique, adaptée à partir de *(Bonnet et Boulanger 2017)*. Voir Figure 9 pour légendes anatomiques.

Les tiques sont les vecteurs les plus importants d'agents infectieux aux animaux, et sont les deuxièmes, après les moustiques, pour la santé humaine au niveau mondial (de la Fuente *et al.* 2008 ; Piesman et Eisen 2008). Dans le monde, elles sont responsables de la transmission de nombreux agents, qui peuvent aussi bien être des bactéries, des parasites ou des virus (Figure 14). Chez certaines tiques dures comme *Ixodes ricinus* qui transmet les spirochètes responsables de la maladie de Lyme, ce sont majoritairement les nymphes qui sont incriminées dans la transmission à l'Homme, d'une part parce

qu'il n'existe pas de transmission transovarienne pour ces agents infectieux de la tique femelle à ses descendants permettant d'avoir des larves à jeun infectées, mais aussi parce que la petite taille des nymphes fait qu'elles passent plus souvent inaperçues que les stades adultes même si elles ont en théorie la même appétence pour l'Homme (Boulanger 2018). Pour d'autres agents infectieux comme le virus FHCC, ce sont uniquement les stades adultes qui constituent un risque pour la transmission à l'Homme car les stades immatures ne parasitent jamais l'Homme mais seulement de petits vertébrés comme les oiseaux et les lagomorphes. On note toutefois que les larves jouent un rôle dans la transmission aux animaux puisqu'elles peuvent se trouver déjà infectées via la transmission transovarienne (Bente et al. 2013). De manière générale, chaque repas sanguin de la tique est l'occasion d'échanger des micro-organismes avec son hôte, c'est-à-dire de s'infecter, de transmettre des agents infectieux, ou les deux à la fois. La transmission de la tique vers l'hôte vertébré et inversement est nommée transmission horizontale. La persistance d'un agent infectieux dans une tique passant d'un stade de développement à un autre est appelée transmission transstadiale (d'un stade au suivant) mais ne constitue pas un phénomène de transmission en tant que tel. Chez les tiques dures qui ne réalisent qu'un repas sanguin par stade, cette transmission est obligatoire pour que la tique soit considérée comme vectrice de l'agent infectieux.

Il existe en outre des modes de transmission d'agents infectieux de tiques à tiques, qui permettent de maintenir la circulation de l'agent sans l'intervention d'hôtes vertébrés si ce n'est pour le gorgement des tiques. La transmission transovarienne ou transmission verticale permet aux femelles de certaines espèces de tiques de transmettre un micro-organisme à sa descendance en infectant les tissus reproducteurs et les œufs (Moore et al. 2018). C'est le cas par exemple de certaines souches du virus de la PPA chez certaines tiques molles ornithodores (Rennie, Wilkinson, et Mellor 2001). Dans un milieu, lorsqu'une espèce de tique est capable de transmettre transgénérationnellement un agent infectieux et que le ou les hôte(s) nécessaire(s) au maintien et à la réplication de l'agent infectieux sont présents pour assurer un cycle continu, la tique devient un réservoir de l'agent infectieux en plus d'en être un vecteur (Boulanger et McCoy 2017). Lors de l'accouplement d'un mâle et d'une femelle, la transmission sexuelle de certains agents infectieux est possible du mâle vers la femelle par l'introduction du spermatophore infecté dans les voies génitales de la femelle; c'est le cas par exemple de *Borrelia burgdorferi* chez *I. persulcatus* (Alekseev et Dubinina 1996). Enfin, certains agents infectieux peuvent également être transmis d'une tique infectée à une tique saine par « cofeeding », lorsque les tiques se nourrissent sur un même animal non infecté, dans un voisinage très proche (quelques centimètres), par simple diffusion intradermique de l'agent infectieux (création d'un foyer

infectieux partagé lors du gorgement). Ce phénomène a essentiellement été décrit pour le virus de l'encéphalite à tiques (Nonaka, Ebel, et Wearing 2010) et pour les *Borrelia* spp. responsables de la maladie de Lyme (Voordouw 2015).

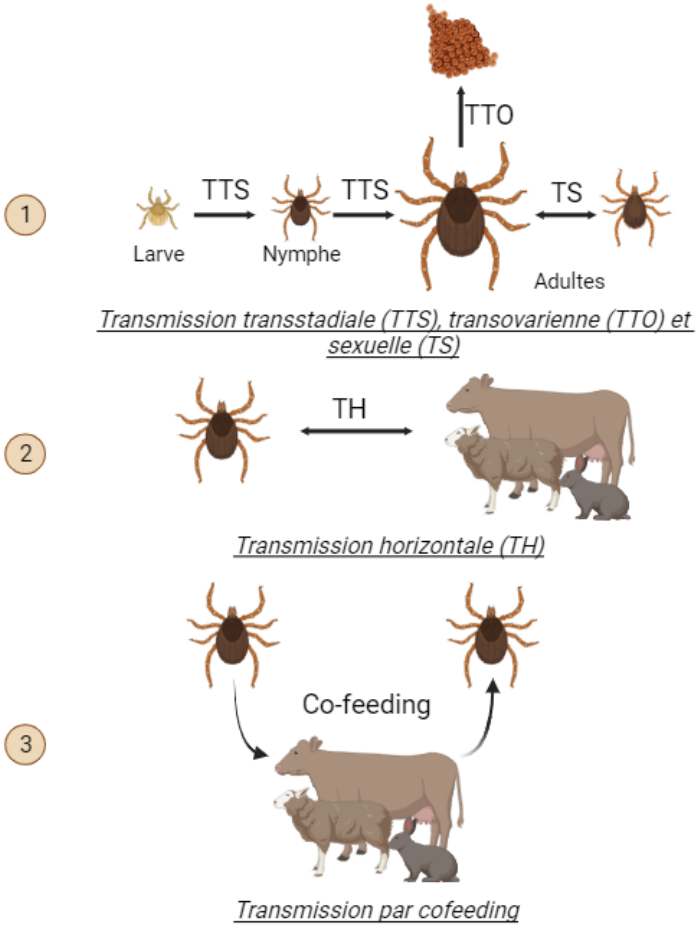


Figure 15 : Modes de transmission du virus de la Fièvre Hémorragique de Crimée-Congo.

f. Cas particulier de la tique *Hyalomma marginatum*, récemment installée en France

Hyalomma marginatum est une tique dure, facilement reconnaissable grâce à son long rostre, la présence d'yeux en boutons de bottine et ses pattes rayées d'anneaux blanchâtres aux articulations, caractéristiques de nombreux représentants du genre *Hyalomma*. Chez les mâles, le scutum est très lisse avec de fines ponctuations visibles en zone postérieure. Les tiques adultes à jeun ont une longueur d'environ 5 mm. Cependant, une femelle gorgée peut mesurer près de 2 cm et peser de 1 à 1,5 grammes. Pour différencier morphologiquement *H. marginatum* des autres espèces de tiques du genre *Hyalomma*, il est nécessaire d'effectuer un examen à la loupe binoculaire en s'aidant de descriptions

spécifiques et clefs d'identification (Apanaskevich et Horak 2008; Walker et al. 2003; Pérez-Eid 2007).

Hyalomma marginatum est une tique exophile à tous les stades de développement. Elle est ditrope, c'est-à-dire que larve et nymphe se gorgent sur le même animal, ce qui diminue les phases libres soumises aux aléas environnementaux. Elle est dixène, les immatures se gorgeant plutôt sur de petits vertébrés et les adultes sur de gros ongulés et occasionnellement l'homme. Après l'éclosion des œufs, les larves se nourrissent et muent sur un premier hôte, sans retomber au sol. Après leur métamorphose en nymphes, celles-ci se raccrochent au même animal et se nourrissent, avant de se décrocher pour muer au sol. Larves et nymphes se nourrissent de préférence sur des oiseaux, des lagomorphes (lièvres et lapins), des insectivores (hérissons notamment) et rarement des rongeurs (Morel 1959; Onder Ergonul et Whitehouse 2007). Sur ces hôtes, les larves se rassemblent autour de la tête, en particulier au niveau des oreilles, et les nymphes migrent vers le visage, le cou et le contour des yeux (ECDC 2017) (Figure 16). Au total, les deux gorgements des immatures durent deux à trois semaines. Ensuite, les nymphes gorgées tombent de ce premier hôte et muent au sol en adultes, après une période de repos qui dure au minimum 3 semaines.

Les adultes cherchent alors un deuxième hôte. Cet hôte est généralement un ongulé de grande taille, le plus souvent domestique. *H. marginatum* se nourrit fréquemment sur chevaux, bovins, petits ruminants, et dans les pays nord africains, on peut la retrouver sur des chameaux. La faune sauvage, comme les sangliers et peut-être les cervidés, peut aussi être infestée par les stades adultes (ECDC 2017; Stachurski et Vial 2018).

Figure 16 : Site de fixation de *Hyalomma marginatum* sur ses hôtes

Les adultes de *H. marginatum* ne sont pas des tiques qui chassent à l'affut comme la tique *I. ricinus* ; ils chassent au sol pour chercher leur hôte, se cachant dans les débris végétaux (ECDC 2017).

Lorsqu'ils détectent la présence d'un hôte potentiel (vibrations du sol et émanation de dioxyde de carbone), ils se dirigent activement vers l'animal repéré (Hoogstraal 1979; Romanenko 2005). Les adultes de *H. marginatum* parasitant principalement des ongulés domestiques peuvent ainsi être retrouvés au niveau des sabots des animaux lorsqu'ils sont au pâturage et ne rejoignent qu'ultérieurement les sites d'accroche de prédilection (par exemple le pis, le scrotum, la région inguinale et le périnée sous la queue). Les stades adultes se nourrissent pendant une à deux semaines et se reproduisent sur l'hôte. Un mâle peut s'accoupler avec plusieurs femelles et ce pendant plusieurs semaines. Les femelles gorgées se détachent ensuite de l'hôte, pondent jusqu'à 7 000 œufs sur le sol et meurent. Les larves éclosent 20 à 40 jours après la ponte. En général, il y a au maximum une génération de tiques par an.

En ce qui concerne la saisonnalité de *H. marginatum*, les stades immatures (larves et nymphes) sont actifs de juin à octobre avec des pics d'activité en juillet et en août (ECDC 2017). Ils sont a priori actifs lorsque les températures moyennes journalières dépassent les 14°C (Morel 1959). Après leur repas sanguin, les nymphes se détachent en général pendant l'été et muent en adultes avant l'hiver. Ce sont soit les adultes à jeun qui passent l'hiver (en diapause comportementale, c'est-à-dire en arrêtant leur recherche d'hôtes), soit les femelles gorgées prêtes à pondre (en diapause de développement, et qui reprendront leur oviposition au printemps suivant) (Stachurski, comm. pers.). Les adultes recommenceraient à être actifs au printemps, à partir du mois de mars lorsque les températures moyennes mensuelles atteignent 10,5°C et ils seraient à leur pic d'activité de recherche d'hôte lorsque la température moyenne journalière est de 22–27°C et que l'humidité est de 75–100% (entre avril et juin) (Valcárcel et al. 2020a). Lorsque la température de l'air augmente au-dessus de 30°C et que la température du sol est supérieure à 45°C, donc en plein été, les tiques préfèrent alors se cacher ou même s'enfouir dans le sol. Les stades adultes semblent par contre très bien supporter les températures négatives puisque *H. marginatum* est installée sur le plateau d'Anatolie en Turquie où les températures hivernales sont bien inférieures à 0°C, et des populations adultes ont été retrouvées à des températures pouvant aller jusqu'à -20 ° C en Russie.

Dans l'état actuel des connaissances, les populations de *H. marginatum* ne semblent pouvoir se maintenir que lorsque la température cumulée annuelle (somme des températures moyennes journalières) se situe entre 3 000 et 4 000°C et que le déficit de pression de vapeur (différence entre la quantité de vapeur d'eau qui peut être contenue dans de l'air à 100 % de saturation pour une température donnée et la quantité de vapeur d'eau qui est contenue réellement dans l'air) est inférieur à une moyenne de 15 hPa (ECDC). Ces contraintes pourraient en partie expliquer la répartition

géographique de *H. marginatum*. Les tiques *H. marginatum* préfèrent en effet le climat méditerranéen, caractérisé par un taux d'humidité faible à modéré et une longue saison sèche et chaude pendant les mois d'été (Valcárcel et al. 2020a). Sous des conditions climatiques qui lui sont favorables, la tique colonise préférentiellement des milieux ouverts naturels, c'est-à-dire des pâtures, des steppes, des savanes arbustives sèches, ou encore la garrigue ou le maquis méditerranéen, alors qu'elle ne se trouve généralement pas dans les forêts continentales mixtes ou de feuillus ni dans les zones humides deltaïques comme en Camargue (Bah et al. 2022). La limite nord de *H. marginatum* semble être fixée par la durée de la saison chaude (Agustín Estrada-Peña 2023). Ainsi, *H. marginatum* est distribuée en Afrique du Nord, dans les pays méditerranéens du Moyen-Orient, en Turquie, dans les Balkans et en Asie centrale (Figure 17).

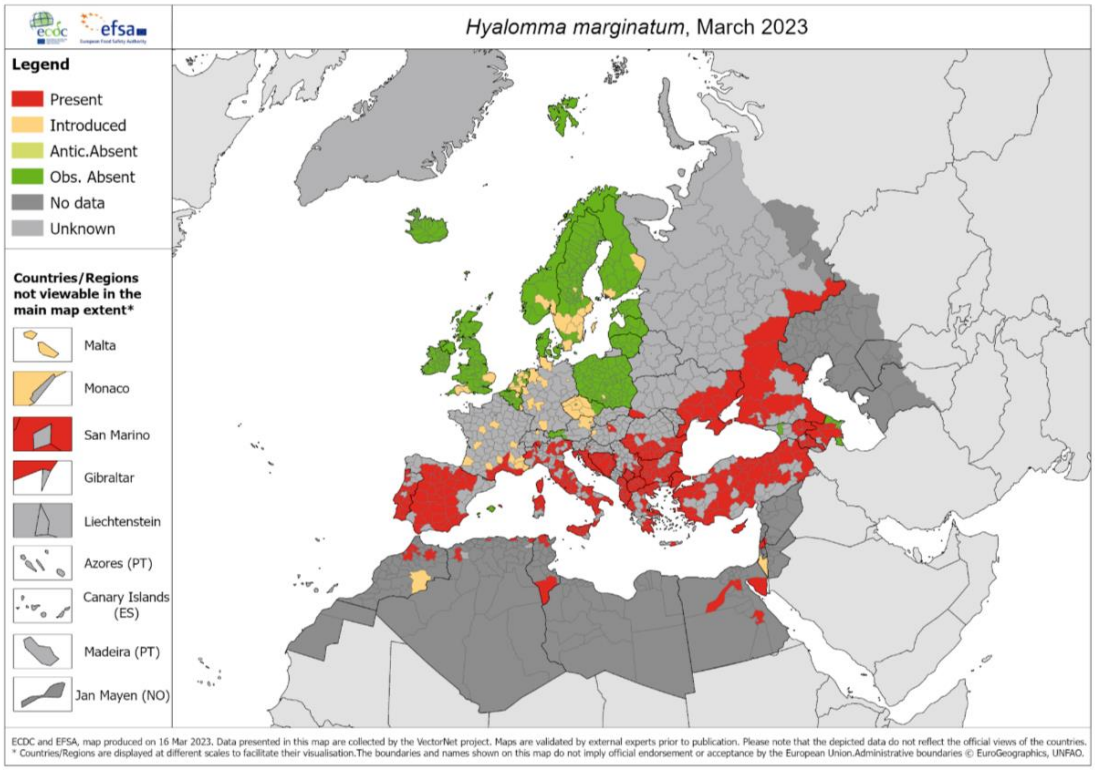


Figure 17 : Représentation, centrée sur l'Europe, de la distribution de la tique *Hyalomma marginatum*. Il s'agit d'une représentation partielle, où une partie du monde n'est pas représentée malgré la présence de la tique dans certaines régions comme l'Asie centrale (ECDC).

En Europe, plusieurs signalements sporadiques ont également été rapportés sur des animaux (importés ou non), des hommes et des oiseaux migrateurs en Allemagne, en Hongrie, en Russie, en Finlande, aux Pays-Bas, et au Royaume-Uni (Duscher *et al.* 2018 ; Jameson *et al.* 2012 ; Kampen *et al.* 2007). Toutes ces dernières observations ne représentent pas des populations établies (ECDC). Les introductions sont multiples et ont toujours existé, soit par le mouvement naturel d'animaux comme les oiseaux migrateurs, la nymphe qui se détache, mue en adulte qui est capable de trouver un hôte

(d'où les présences recensées sur chevaux) mais qui n'est pas capable d'entraîner l'installation d'une population pérenne, soit par l'importation d'animaux terrestres (comme les chevaux et les bovins dans le sud de la France avec l'Espagne). Mais ce n'est pas parce que la tique est introduite qu'elle s'installe. Ce n'est que lorsqu'elle trouve des conditions environnementales favorables à sa survie et à son développement qu'elle peut s'installer. Par exemple, en France, des rapports sporadiques étaient rapportés jusque dans les années 1980 sans description d'une population viable sur le territoire (Morel 1959). Mais, à partir des années 2010, nous avons pu montrer l'existence de premières populations viables et abondantes dans le sud de la France continentale (Laurence Vial et al. 2016; Stachurski et Vial 2018). De plus, dans l'étude de Bah *et al.* (2022), les auteurs ont montré que le climat du sud de la France est devenu suffisamment méditerranéen pour son installation. Avec les prédictions futures, montrant l'évolution du climat, il est possible que le climat méditerranéen remonte vers le nord et touche également la côte atlantique à l'ouest, suggérant que ces zones seraient, dans 50 ans, favorables à l'installation de *H. marginatum*.

Hyalomma marginatum est connue pour être l'un des vecteurs majeurs du virus de la Fièvre Hémorragique de Crimée-Congo (VFHCC) en Europe et dans le bassin méditerranéen. Comme indiqué dans la seconde partie de l'introduction sur les espèces introduites, l'arrivée d'une nouvelle espèce peut avoir des conséquences sanitaires comme l'introduction de nouveaux agents infectieux. L'installation récente de *H. marginatum* en France augmente forcément le risque d'introduction et de transmission locale de VFHCC.

IV- Fièvre Hémorragique de Crimée-Congo

La FHCC est causée par un virus pathogène de classe de risque biologique 4, de l'ordre des *Bunyavirales*, de la famille des *Nairoviridae*, et du genre *Orthonairovirus*. C'est au 12ème siècle, dans l'actuel Tadjikistan, qu'une maladie désormais considérée comme FHCC a été décrite par un médecin pour la première fois. La description faisait état d'une maladie hémorragique avec présence de sang dans les urines, au niveau des gencives, dans les vomissements et la cavité abdominale, ayant été causée par un pou ou une tique (Hoogstraal 1979). En parallèle, la FHCC était connue depuis des siècles sous au moins trois noms différents par les peuples autochtones du sud de l'Ouzbékistan : khungribta (prise de sang), khunymuny (saignement de nez) ou karakhalak (mort noire) (Hoogstraal 1979; Chumakov 1974). Cette Fièvre Hémorragique de Crimée (FHC), a ensuite attiré l'attention de la médecine moderne et a été décrite et nommée pour la première fois en 1944-1945, lorsqu'environ 200 militaires soviétiques ont été infectés lors d'une épidémie en Crimée pendant la guerre (Chumakov 1945). Des travaux ont montré que ce virus de la FHC était antigéniquement impossible à distinguer du virus Congo (Casals 1969; Chumakov, Smirnova, et Tkachenko 1969), un autre virus de fièvre hémorragique isolé à l'origine chez des patients du Congo et de l'Ouganda (Simpson *et al.* 1967 ; Woodall, Williams, et Simpson 1967). Cette découverte a conduit à la nouvelle appellation commune pour ces deux virus : le virus de la Fièvre Hémorragique de Crimée-Congo (VFHCC, (Hoogstraal 1979). Au sein des Nairoviridae, tous les virus sont maintenus chez des arthropodes ou transmis par des tiques à des mammifères, des oiseaux ou des chauves-souris. Le Nairovirus le plus important en termes de santé publique est le VFHCC. Il est transmis par des tiques du genre *Hyalomma* en Asie, en Afrique, et en Europe. Le Nairovirus présentant le plus fort impact vétérinaire est le virus de la maladie du mouton de Nairobi, qui est transmis par des tiques des genres *Rhipicephalus* et *Haemaphysalis*, et provoque une gastro-entérite hémorragique mortelle chez les petits ruminants en Afrique et en Inde.

a. Description du VFHCC

Comme tous les virus appartenant à la famille des Nairoviridae, le VFHCC est un virus enveloppé. La particule virale est composée de trois segments d'ARN organisés en ribonucléoprotéines (RNPs) entouré d'une enveloppe lipidique d'origine cellulaire et contenant les différentes protéines de surface. Le VFHCC mesure entre 80 et 120 nm de diamètre. Son génome comporte 3 segments d'ARN simple brin (ARNsb) de sens négatif totalisant 17,1–22,8 kb (S : 1,7–2,1 kb ; M : 4,4–6,3 kb ; L : 11,2–14,4 kb). La séquence du génome de VFHCC est hautement variable, avec des différences allant jusqu'à 20 % entre les isolats viraux. Les différences dans la séquence du génome peuvent influencer la virulence

et la pathogénicité du virus ainsi que l'efficacité de la détection et de la prévention (Garrison *et al.* 2019). Par exemple, les souches AP92 et apparentées à AP92 circulant en Grèce et en Turquie sont associées à un faible niveau de virulence et de mortalité malgré les preuves d'une séropositivité estimée à 6 % et 5,2 %, respectivement, dans la population humaine de ces régions (Midilli *et al.* 2009 ; Papa *et al.* 2014 ; Salehi-Vaziri *et al.* 2016). En revanche, les souches circulant en Chine ont causé un taux de mortalité élevé d'environ 80 % (Yen et al. 1985).

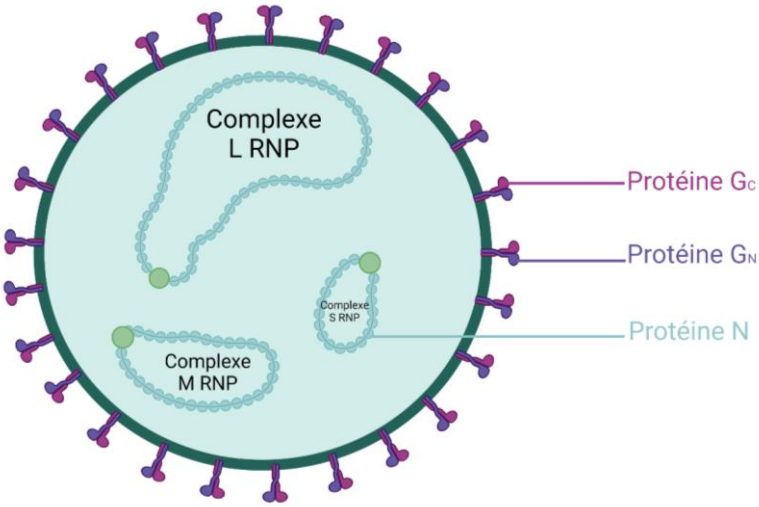


Figure 18 : Structure du virus de la Fièvre Hémorragique de Crimée-Congo. La particule virale est sphérique et mesure entre 80 et 120 nm de diamètre. Son enveloppe lipidique est parsemée de pointes constituées des glycoprotéines Gn et Gc. Le virion contient trois segments de génome en ARN simple brin (short, medium et large), encapsidés par la nucléoprotéine (N), ainsi que l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp).

Son enveloppe lipidique est parsemée de pointes ou spicules constituées des glycoprotéines Gn et Gc, qui sont responsables de la liaison du virion aux récepteurs cellulaires. Des anticorps neutralisants dirigés contre les Gc sont produits au cours de l'infection. Les particules virales contiennent trois segments de génome nommés du plus petit au plus grand : S (Short), M (Medium) et L (Large), et codent respectivement pour la synthèse de la nucléoprotéine (N) de la nucléocapside (qui joue un rôle crucial dans l'établissement de l'infection virale), des deux glycoprotéines d'enveloppe (Gn et Gc : qui codent pour les parties N- et C- terminales du polypeptide constituant les spicules de l'enveloppe externe) et de l'ARN polymérase ARN dépendante (également appelée polymérase L ou RdRp) (Onder Ergonul et Whitehouse 2007) afin d'initier la transcription et la réplication du génome dans la cellule hôte. Au sein de la particule virale, la ribonucléoprotéine est formée par le génome encapsidé par la nucléoprotéine N et associé à la polymérase L. Les glycoprotéines virales de surface, quant à elles,

vont permettre la liaison du virion à la cellule hôte grâce à la reconnaissance des récepteurs de surface présents sur cette dernière (DC-SIGN, (Albornoz *et al.* 2016 ; Suda *et al.* 2016)).

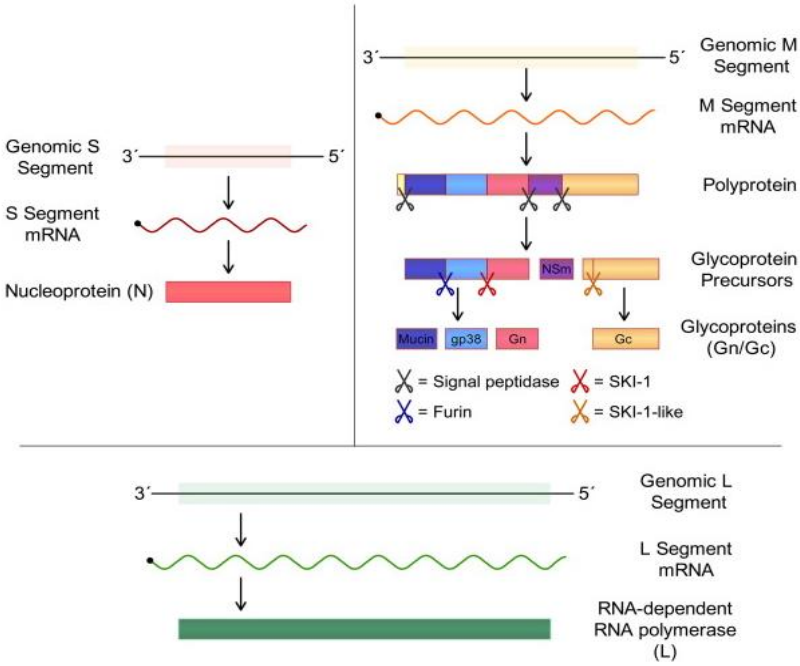


Figure 19 : Séquences des 3 segments génomiques du virus de la Fièvre Hémorragique de Crimée-Congo

Rôle du segment S

Le segment S code une protéine appelée N (nucléoprotéine) qui joue un rôle essentiel dans l'assemblage et la protection de l'ARN viral. La protéine N joue un rôle essentiel dans le cycle de vie du VFHCC, en protégeant l'intégrité du génome lors de la réplication virale. En plus de son rôle structurel, la protéine N est également impliquée dans la réplication du virus : elle participe à la formation de complexes de réplication virale et favorise la synthèse de l'ARN viral. De plus, la protéine N est impliquée dans la régulation de l'expression génique du virus, ce qui contribue au contrôle du cycle de vie viral (Zivcec et al. 2016).

Rôle du segment M

Le segment M code une polyprotéine appelée précurseur de glycoprotéines (GPC) permettant entre autres la formation de glycoprotéines d'enveloppe (Gn et Gc). Cette protéine joue un rôle clé dans l'entrée du virus dans les cellules hôtes et dans la formation de la membrane virale. Au cours de la formation du virion, les glycoprotéines d'enveloppe s'hétérodimérisent et constituent des structures en forme de spicules à la surface du VFHCC. Ces spicules sont essentielles pour la fixation du virus aux récepteurs spécifiques des cellules hôtes et pour la fusion de la membrane virale avec la membrane

cellulaire lors de l'entrée du virus. Les glycoprotéines Gn et Gc sont également impliquées dans la pathogénicité du VFHCC en induisant une réponse immunitaire chez l'hôte. La protéine Gc est un marqueur antigénique majeur et certains anticorps dirigés contre Gc peuvent être neutralisants (et conférer un certain degré de protection) (Zivcec et al. 2016).

Rôle du segment L

Le segment L est le plus grand segment du génome du VFHCC. Il code une protéine connue sous le nom de protéine polymérase L. La protéine polymérase L est une enzyme essentielle pour la réplication et la transcription de l'ARN viral. Elle est responsable de la synthèse de l'ARN complémentaire (ARNc) à partir de l'ARN viral à simple brin. Cette étape est cruciale pour la réplication du virus et la production de nouvelles particules virales. La protéine polymérase L est également impliquée dans la transcription de l'ARN viral en ARN messager (ARNm). L'ARNm est ensuite traduit en protéines virales, y compris les protéines de la nucléocapside (N) et de la glycoprotéine pré-membrane (Gn-Gc), qui sont essentielles pour le cycle de vie du virus. En plus de son rôle dans la réplication et la transcription de l'ARN viral, la protéine polymérase L est impliquée dans la régulation de l'expression génique du virus. Elle est également cruciale pour la stabilité et la structure de l'ARN viral.

i. Cycle de réplication intracellulaire

L'ensemble du cycle de réplication du virus se déroule dans le cytoplasme de la cellule infectée. Il n'y a aucune étape nucléaire (Bente et al. 2013). Lorsque le virion se trouve à proximité de la cellule, il va se lier, grâce à ses glycoprotéines de surface, aux récepteurs de surface de la cellule (Figure 20, étape A), puis être internalisé via un processus d'endocytose clathrine-dépendant (Figure 20, étape B). Le pH faible de l'endosome (compartiments membranaires que l'on retrouve à l'intérieur des cellules eucaryotes) permet un changement de conformation des glycoprotéines d'enveloppe entraînant ainsi une fusion entre l'enveloppe virale et la membrane endosomiale, et de fait, la libération des nucléocapsides dans le cytoplasme (Figure 20, étape C). Après dissociation des RNPs, l'ARN-polymérase ARN dépendante (RdRp) permet la transcription des segments, de sens négatif, du génome viral pour produire, des brins de polarité positive d'ARN messager (ARNm) et d'ARN complémentaire (ARNc) (Figure 20, étape D). L'ARNm des différents segments vont ensuite être traduits en l'ensemble des protéines virales décrites précédemment (Figure 20, étape E), tandis que l'ARNc est utilisé comme matrice pour la production d'ARN viral de polarité négative (ARNv). L'ARNv et les protéines alors formées s'associent pour constituer de nouvelles RNPs. Concernant les glycoprotéines, leur traduction se produit dans le réticulum endoplasmique (Figure 20, étape F), avec l'expression des

précurseurs des glycoprotéines (PreGn et PreGc). Au cours du processus de maturation post-traductionnelle, elles sont transportées vers l'appareil de Golgi (Figure 20, étape G) où elles subissent des modifications de leur conformation, jusqu'à leur maturation (Figure 20, étape H). Les RNPs et protéines de surface dans l'enveloppe du Golgi vont se regrouper pour former les nouvelles particules virales (Figure 20, étape I). Elles sont alors transportées vers la membrane plasmique puis libérées dans le milieu extérieur par exocytose (Figure 20, étape J).

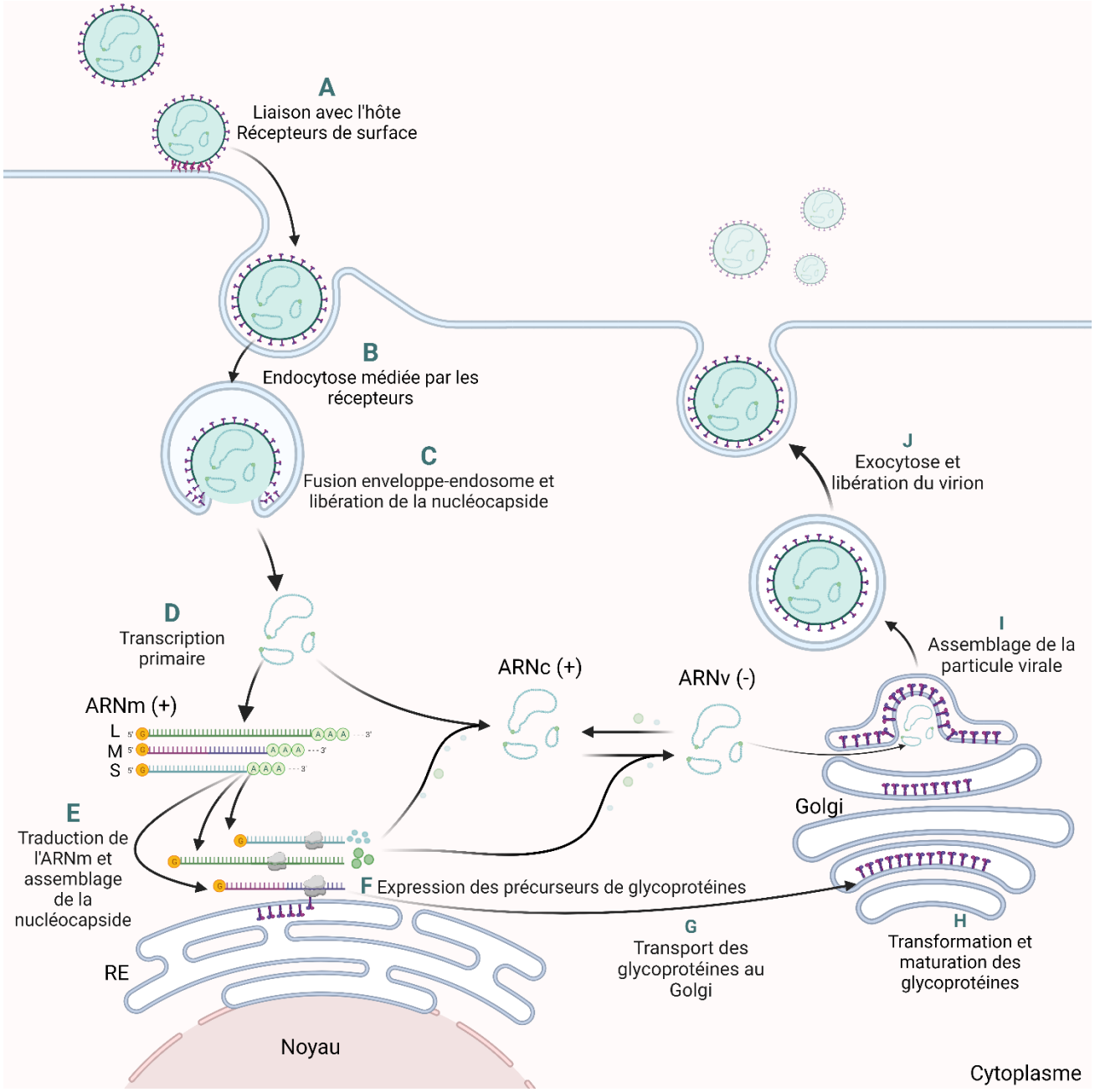


Figure 20 : Cycle de réplication intracellulaire du VFHCC adapté d'après Bente et al. *(2013)* ; Garrison et al. *(2020)*

ii. Conditions de survie du virus

Le VFHCC est relativement stable dans l'environnement extérieur et peut survivre plusieurs jours sur des surfaces inertes à température ambiante. Le virus est sensible à la plupart des désinfectants couramment utilisés, tels que l'eau de javel diluée, l'éthanol à 70%, et les détergents. Il est de plus relativement sensible à la chaleur et peut être inactivé à des températures supérieures à 60°C. En revanche, il peut survivre à des températures froides et rester infectieux pendant plusieurs mois à des températures de congélation (Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 1995).

b. Transmission du VFHCC

Le VFHCC se transmet à l'homme soit par la piqûre de tiques infectées, soit par contact avec des fluides biologiques ou des tissus d'animaux infectés. La transmission interhumaine peut survenir à la suite d'un contact direct avec du sang, des sécrétions, des organes ou des liquides biologiques de personnes infectées (symptomatiques ou non) (WHO 2022; Hawman et Feldmann 2023). Des infections nosocomiales peuvent aussi se produire à cause d'une mauvaise stérilisation du matériel médical, de la réutilisation des aiguilles et de la contamination des fournitures médicales (OMS 2014). Les animaux quant à eux ne peuvent se contaminer que par la piqûre de tiques infectées ; il n'existe pas de rapports faisant état de transmission par contact ou de transmission transplacentaire par la mère à sa progéniture (Nabeth et al. 2004). L'homme est le seul hôte sensible au VFHCC présentant des symptômes graves alors que les animaux ne présentent généralement aucun ou peu de signes cliniques dûs à leur infection à VFHCC (Hoogstraal 1979). De nombreuses espèces animales sont susceptibles au VFHCC, sont virémiques pendant une dizaine de jours, puis développent des anticorps se maintenant pendant plusieurs mois, voire plusieurs années, mais a priori avec une action limitée *in vivo* contre une réinfection malgré la présence d'anticorps neutralisants, puisque des tiques saines peuvent s'infecter sur des animaux ré-exposés au virus (M. L. Wilson et al. 1991). Certaines espèces animales (e.g. lagomorphes, bovins, moutons, et possiblement les chèvres et les cerfs) répliquent suffisamment le virus pour réinfecter des tiques lorsque ces dernières se gorgent sur elles, alors que d'autres comme les chevaux par exemple sont insuffisamment virémiques pour en être capables (Ruiz, Zumbrun, et Nalca 2013). La majorité des oiseaux est considérée comme réfractaire au VFHCC et ne développe donc pas de réponse immunitaire, si ce n'est le calao à bec rouge, l'autruche et la pintade qui développent une virémie et des anticorps contre le virus (Sekercioğlu 2013; Swanepoel *et al.*, 1998; Zeller *et al.*, 1994).

Ces infections animales participent au premier mode de transmission du VFHCC, nommée transmission horizontale, d'un hôte virémique vers une tique saine et d'une tique infectée vers un hôte

naïf susceptible. Après avoir été ingéré par une tique lors du repas sanguin de cette dernière sur un animal virémique transitoire, le VFHCC se réplique dans la paroi intestinale de la tique et passe cette barrière organique pour gagner l'hémolymphe de la tique. Le virus est détecté chez la tique dans les premières heures post-inoculation (p.i.) et sa réplication observée dès la 36e h p.i. Le titre viral atteint son maximum en 3 à 5 jours puis il décroît lentement avant de se stabiliser pendant plusieurs mois d'observation (Gonzalez et al. 1991). La tique est considérée comme le seul réservoir de VFHCC car elle est capable de répliquer et maintenir le virus pendant plusieurs mois contrairement aux hôtes qui ont une virémie courte de l'ordre de 7 à 10 jours (Spengler et al. 2016). Grâce à l'hémolymphe, le virus se propage ensuite dans de nombreux tissus et organes. Les titres viraux les plus élevés dans la tique sont observés dans les glandes salivaires et les organes reproducteurs, qui constituent tous deux les principaux organes de transmission du VFHCC, horizontale et verticale respectivement (Dickson et Turell 1992; Papa et al. 2017). Lors de leur prochain repas de sang, les tiques dont les glandes salivaires sont infectées pourront alors excréter le VFHCC dans leur salive et infecter un nouvel hôte vertébré.

Le VFHCC peut aussi se transmettre entre tiques sans l'intermédiaire d'un hôte virémique, ce qui veut dire que même si les communautés d'hôtes vertébrés présents dans l'environnement ne sont pas favorables à la réplication virale le maintien du virus par les tiques uniquement est théoriquement possible. Il est décrit que le VFHCC est maintenu par transmission transstadiale, transovarienne et sexuelle (Gonzalez et al. 1992). Certaines espèces de tiques semblent être plus efficaces que d'autres pour la transmission du VFHCC. Par exemple, des études expérimentales ont montré que les tiques du genre *Hyalomma*, notamment *H. marginatum* et *H. rufipes*, ont une compétence vectorielle élevée pour le VFHCC ce qui n'est pas le cas d'*Ixodes ricinus*. Il est important de noter que même si cela n'a pas nécessairement été testé, on pourrait supposer que l'on obtiendrait également des résultats différents avec une même espèce de tique mais avec des souches différentes du virus. Ainsi, la compétence vectorielle pour le VFHCC peut varier considérablement en fonction des espèces de tiques et des souches virales impliquées. La transmission transstadiale n'est en fait pas un vrai mode de transmission mais plutôt un maintien du VFHCC au cours du cycle de développement de la tique. Une femelle pouvant produire plusieurs milliers d'œufs, la transmission transovarienne peut s'avérer suffisante pour maintenir une infection par VFHCC au sein d'une population de tiques. Cela a été observé pour le VFHCC chez *Hyalomma truncatum*, dans 50% des lots d'œufs testés (Gonzalez et al. 1992). Le rôle de la transmission transovarienne dans différentes espèces de *Hyalomma* reste incertain et doit être étudié dans un environnement de laboratoire contrôlé.

Gonzales *et al.* (1992) ont démontré la transmission sexuelle du VFHCC entre des tiques *Hyalomma truncatum* en copulation (des mâles vers les femelles). Cependant, la taille de l'échantillon était insuffisante pour estimer de manière fiable le taux de transmission. La transmission sexuelle représente un moyen par lequel l'infection de la tique et la transmission du VFHCC aux œufs peuvent augmenter (Sorvillo et al. 2020). Enfin, un troisième mode de transmission de tiques à tiques décrit pour le VFHCC est le cofeeding (Gordon *et al.* 1993). Pendant l'alimentation, les tiques produisent des phéromones qui attirent d'autres tiques vers le même site de repas, facilitant ainsi la transmission de tique à tique. Ce processus est accéléré par la présence de la salive de la tique (Jones et al. 1987). La probabilité de la transmission par cofeeding augmente avec l'ampleur de l'infestation de tiques. Une petite proportion de tiques (0,1 à 1,9 %) a été montrée, dans une étude en laboratoire, capable d'acquérir le VFHCC lorsqu'elles se nourrissaient en cofeeding sur des cobayes non virémiques (Gordon *et al.* 1993).

c. La FHCC chez l'homme

La seule espèce chez laquelle le VFHCC provoque des symptômes est l'homme. De nombreuses infections humaines entraînent uniquement un syndrôme fébrile modéré non spécifique, voire aucun symptôme. Toutefois, certains patients développent une maladie hémorragique sévère dont la clinique est divisée en 4 phases (Hoogstraal 1979) : l'incubation, la phase pré-hémorragique, la phase hémorragique et la convalescence. L'incubation dure entre 1 et 3 jours (maximum 9 jours) lorsque l'infection est causée par une piqûre de tique. Elle dure entre 5 et 6 jours (maximum 13 jours) lorsque l'infection est due à un contact avec du sang ou des tissus infectés (Shayan et al. 2015). Des composés de la salive des tiques semblent avoir un effet immunomodulateur qui accélère la dissémination virale par réduction du nombre des cellules immunitaires (Jones *et al.* 1992 ; Kocáková *et al.* 1999 ; Nuttall et Labuda 2003). La phase pré-hémorragique de la FHCC est caractérisée par de la fièvre et de nombreux symptômes non spécifiques comme des douleurs musculaires et une faiblesse générale, et dure généralement 3 ou 4 jours (Ergönül 2006). Vient alors la phase hémorragique, le premier signe le plus fréquemment décrit est l'apparition de pétéchies cutanées qui évoluent vers de larges ecchymoses cutanées (Hawman et Feldmann 2023). Des saignements des voies gastro-intestinales et urinaires sont également observés (Swanepoel et al. 1989). La mort peut survenir du 5eme au 14eme jour après le début des symptômes, à la suite d'une hémorragie, d'une défaillance multiviscérale (foie, reins, poumons) ou d'un état de choc (Tahenni 2021). Le taux de létalité, c'est-à-dire la proportion de morts au sein des patients malades, est de 10 à 40 % (OMS 2014). Il existe des souches qui entraîneront plus ou moins de symptômes graves chez les patients. Ainsi, dans certains cas, le VFHCC peut passer inaperçu en étant considéré comme une maladie bénigne. Chez les patients qui survivent, le

rétablissement complet peut prendre jusqu'à un an (Ergönül 2006) et ils semblent être protégés contre une réinfection (Hawman et al. 2019).

Le tropisme et la pathogénicité du VFHCC chez l'homme ne sont pas encore totalement connus. Une réplication aurait tout d'abord lieu dans les tissus au niveau du site d'infection, suivie d'une réplication virale intense dans les macrophages qui peuvent participer à sa dissémination dans la lymphe et dans le sang. Il atteint les nœuds lymphatiques et certains organes comme le foie qui est un des principaux sites de la réplication du virus. Les cellules infectées libèrent alors des cytokines, des chimiokines et d'autres médiateurs pro-inflammatoires. Ce phénomène aboutit à des défauts de coagulation, une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) et une diminution importante de la pression sanguine qui est à l'origine d'un choc et d'une défaillance multi-organique (Doganci 2007; Ergonul *et al.* 2006 ; Ergonul 2008 ; Karti *et al.* 2004 ; Papa *et al.* 2006 ; Fisgin *et al.* 2008). Parallèlement, au niveau immunitaire, il se formerait des complexes immuns circulants avec activation du système du complément (groupe d'environ 50 protéines connues du sérum, faisant partie de l'immunité innée). Les dommages de l'endothélium et la CIVD seraient causés de manière indirecte par les nombreuses cytokines libérées plutôt que par l'effet direct du virus sur les cellules (Doganci 2007; Tasdelen Fisgin et al. 2008). L'endothélium qui est endommagé provoque une agrégation plaquettaire et une dégranulation cellulaire avec activation de la cascade intrinsèque de la coagulation. La CIVD est à l'origine de dommages dans d'autres tissus. Ce phénomène causerait la destruction des capillaires sanguins à l'origine des hémorragies cutanées ainsi que des insuffisances pulmonaires et rénales. La dégradation du foie serait quant à elle à l'origine de la libération de facteurs procoagulants dans le sang qui aggraverait la CIVD. La dégradation de ce dernier limiterait aussi l'élimination des produits de dégradation de la fibrine, ce qui empêche la synthèse de nouveaux facteurs de coagulation pour remplacer ceux qui ont été consommés.

Figure 21 : Observation d'une large ecchymose sur le bras d'un patient atteint de FHCC (Ergonul et al. (2008)

d. Epidémiologie de la FHCC : maladie émergente en Europe

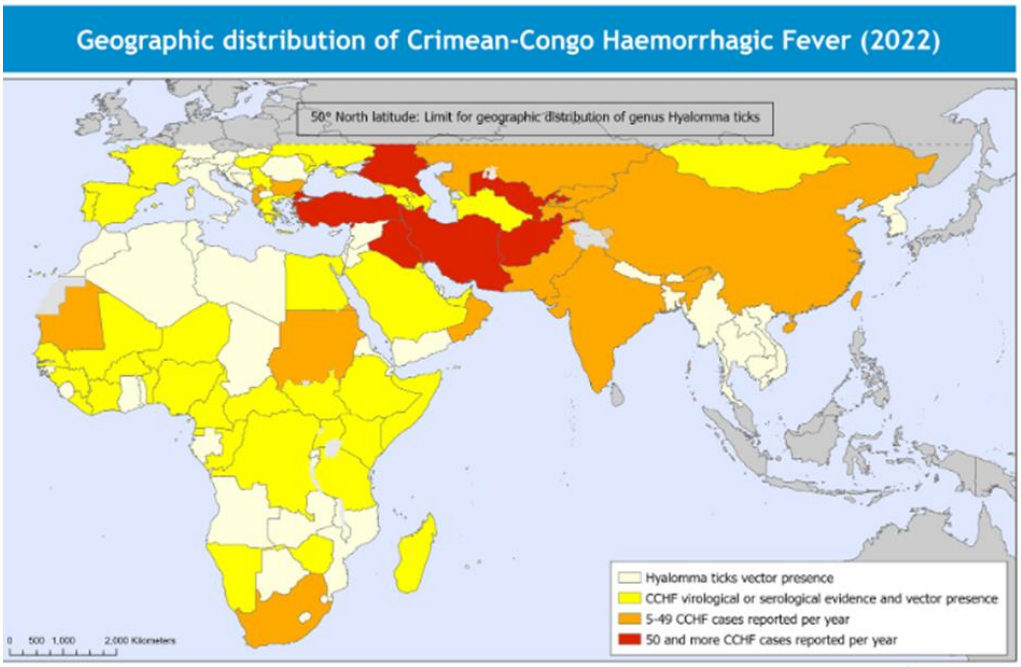


Figure 22 : Répartition des cas et de la présence du VFHCC dans le monde (WHO 2022).

Depuis sa première identification en Crimée en 1944, le VFHCC a été identifié dans de nombreuses régions du globe, de l'ouest de la Chine en passant par l'Asie du Sud, le Moyen-Orient, la Bulgarie et les Balkans (Figure 22). Cela suit la répartition des tiques du genre *Hyalomma*, en effet, d'après cette carte, aucun cas autochtone de FHCC n'est survenu à ce jour au-delà du parallèle de latitude 50°Nord, limite actuelle de distribution des tiques du genre *Hyalomma*. La présence du virus s'étend également dans la majeure partie de l'Afrique (Figure 22). Le virus semble émergent en Europe de l'Ouest, notamment en Espagne où des cas autochtones ont été diagnostiqués depuis 2016 (Lorenzo Juanes et

al. 2023). Dans les pays où la maladie n'a encore jamais été rapportée, l'étude de la circulation virale est principalement basée sur des enquêtes sérologiques chez les animaux ou l'homme, ou des PCR chez les tiques (Bente et al. 2013). La FHCC est la maladie transmise par les tiques qui a la répartition géographique la plus vaste (OMS 2014).

Selon les régions du monde, les pathosystèmes "tiques-hôtes-virus" ainsi que les patrons épidémiologiques ne sont pas les mêmes, rendant la compréhension de la transmission du VFHCC difficile. Sont donnés ci-dessous quelques grands exemples :

i. Exemple de la Turquie au Moyen-Orient : situation épidémique depuis 2002

En Turquie, les premiers cas humains sont apparus en 2002. Bien que *H. marginatum* soit le vecteur principal du VFHCC, il semblerait que d'autres espèces soient compétentes comme *H. aegyptium* et *H. excavatum*. En effet, ceci est confirmé par des études qui ont montré entre 3,5% et 51,5% des tiques (ou pools de tiques) de *H. marginatum* positives (Akyildiz *et al.* 2021 ; Tekin *et al.* 2012 ; Yesilbag *et al.* 2013) mais également 1,7% des pools de *H. excavatum* (Orkun et al. 2017) ou encore 30% des tiques *H. aegyptium* positives (Široký et al. 2014). *H. aegyptium* peut, a priori, dans certaines zones, piquer l'homme et elle a déjà été trouvée positive au VFHCC, comme ses hôtes préférentiels, les tortues (Široký et al. 2014). Il y aurait un cycle cryptique ou secondaire en plus, avec un pont entre les deux cycles via les hôtes des immatures de *H. marginatum* et *H. aegyptium* qui sont, entre autres, les lagomorphes.

L'introduction du virus en Turquie a pu survenir via la migration d'oiseaux infectés. Leblebicioglu *et al.* (2014) ont collecté des tiques sur des oiseaux au sein d'une zone humide constituant une étape pour des oiseaux migrateurs. Ils ont notamment identifié une nymphe du genre *Hyalomma* testée positive par PCR au VFHCC, sur une rousserolle turdoïde (*Acrocephalus arundinaceus*). Une autre possibilité serait l'introduction via des mouvements illégaux d'animaux, notamment via l'Iran, bien que la souche identifiée en Turquie (Europe 1) soit similaire aux souches européennes et russes (Orkun *et al.* 2017 ; Zehender *et al.* 2013). L'émergence de cas de FHCC à partir de 2002 et l'augmentation du nombre de cas jusqu'en 2008 puis une diminution légère jusqu'en 2015 peuvent être dus à plusieurs facteurs, notamment d'ordre climatique ou liés à un changement d'utilisation des sols (Leblebicioglu et al. 2016). Depuis son implantation, plus de 10 000 cas ont été diagnostiqués dans le pays. Les cas étaient répandus dans de nombreuses provinces du sud de la région de la mer Noire, du centre et de l'est de l'Anatolie, les zones rurales représentant 69,4 % des cas. Les infections sont répandues dans les zones rurales consacrées à l'élevage et associées à des piqûres de tiques ou à un contact direct avec du sang, des liquides organiques ou des tissus d'animaux infectés (Leblebicioglu et al. 2016). Par ailleurs, il existe de fortes variations saisonnières des cas de FHCC, qui surviennent majoritairement aux mois de

mai, juin et juillet (Aker *et al.* 2015 ; Duran *et al.* 2013 ; Sisman 2013). Cette dynamique saisonnière est à relier d'une part à la dynamique des tiques vectrices (actives de juin à août, d'après Beyhan, Mungan, et Babur (2016), d'autre part à une plus forte exposition aux piqûres de tiques lors des travaux agricoles au printemps et en début d'été.

ii. Exemple du Sénégal en Afrique de l'ouest : situation épi-enzootique historique

Dans les régions sahéliennes d'Afrique de l'Ouest, entre autres au Sénégal où la FHCC a été grandement étudiée, la tique *H. truncatum* (pouvant facilement piquer l'homme) a été considérée comme le principal vecteur du VFHCC à l'homme (Camicas *et al.* 1994 ; Chapman *et al.* 1991). Toutefois, bien que présentant une très bonne compétence vectorielle pour le VFHCC, incluant tous les modes de transmission (Gonzalez et al. 1991; 1992), *H. truncatum* présente 17% de transmission transovarienne (d'une femelle infectée vers sa descendance) (M. L. Wilson et al. 1991), et moins de 1% de transmission par cofeeding (Logan et al. 1989), ce qui fait que la meilleure opportunité pour cette tique d'être infectée au stade adulte reste sa contamination au stade immature en se nourrissant sur vertébrés virémiques, en l'occurrence les lagomorphes. Cependant, ces petits vertébrés s'avèrent être rares dans cette région du Sahel et ne peuvent de ce fait permettre une infection fréquente des tiques. C'est là que certaines tiques "auxiliaires" semblent pouvoir favoriser localement la transmission du virus et sa persistance à long terme (Camicas et al. 1994). C'est le cas par exemple de *H. rufipes*, présente aux mêmes latitudes que *H. truncatum*, qui infeste largement aux stades immatures le calao à bec rouge, un oiseau très abondant dans cette zone géographique et un des seuls capables d'amplifier le VFHCC et donc de réinfecter des tiques et entretenir le cycle naturel enzootique de transmission entre vertébrés et tiques (Zeller, Cornet, et Camicas 1994). Une seconde tique "auxiliaire" serait *Rhipicephalus evertsi evertsi* qui présente une compétence vectorielle bien moindre que *H. truncatum* pour VFHCC mais parasite à tous les stades de développement des ongulés domestiques largement abondants dans la zone et répliquant suffisamment bien le VFHCC pour être source de tiques infectées au sein du cycle naturel enzootique. A d'autres latitudes plus basses, un autre vecteur *Amblyomma variegatum* semble prendre le relais de *H. truncatum*, ce qui au final aboutit à un système de transmission du VFHCC particulièrement complexe au Sénégal, à 4 vecteurs et autant d'hôtes préférentiels associés (Camicas et al. 1994). Depuis les années 1970, des cas humains ou de circulation virale ont été rapportés. Il est important de noter que ces déclarations doivent être sous-estimées avec les cas humains non hémorragiques et les cas déclarés dans les campagnes. Ainsi, certaines années, aucune déclaration n'a été effectuée mais le virus a continué à circuler ce qui explique les fortes séroprévalences sur toutes les zones sèches sahéliennes et sub-sahariennes proches de la Mauritanie.

iii. *Exemple de l'Espagne en Europe de l'ouest : émergence de cas ponctuels depuis 2016*

En 2016, deux cas humains ont été détectés en Espagne et depuis des cas sont recensés chaque année (Espunyes *et al.* 2021 ; Anabel Negredo *et al.* 2017). Dans ce pays, les espèces *Hyalomma lusitanicum* et *H. marginatum* sont présentes, plus particulièrement sur la faune sauvage dont les cervidés et les ongulés domestiques, respectivement. Negredo *et al.* (2019) ont estimé des prévalences respectives de 3,99 % et 0,42 % chez des individus *H. lusitanicum* et *H. marginatum* collectées entre 2011 et 2015 sur des ongulés sauvages et domestiques dans le sud-ouest. Il semblerait que ce soit la tique *H. lusitanicum* qui soit à l'origine de la transmission de ce virus en Espagne. L'étude de Moraga Fernandez *et al.* (2021), a montré que du virus de FHCC a été détecté chez 20% des tiques *H. lusitanicum* prélevées sur des hôtes sauvages (notamment le sanglier). Au stade adulte, cette tique parasite essentiellement des cervidés et notamment des cerfs, dont les séro prévalences pour le virus sont élevées par rapport aux bovins (70% vs 16%). Il semble alors que la faune domestique soit moins impactée que la faune sauvage. Peu de cas humains sont rapportés chaque année (entre 1 et 3), et seraient dus à des piqûres de *H. lusitanicum* qui semble plus anthropophile que *H. marginatum*. De plus, la saisonnalité des cas coïncide plus avec la période d'activité de cette tique (à la fin de l'été). En 2016, la souche du virus était de type III (Africa 3). En 2018, le virus identifié par Negredo *et al.* (2021) paraît être issu d'un réassortiment, le segment du gène S appartenant au type IV (Africa 4) tandis que le génotype identifié par Arteaga *et al.* (2020) était de type V (Europe 1).

iv. *Situation de la France : cas particulier de la Corse et du risque d'émergence*

À ce jour, aucun cas humain de FHCC autochtone n'a été rapporté en France. Le territoire est donc considéré comme indemne de cette maladie. Cependant, il n'y a eu aucune enquête sérologique menée en France chez l'humain. Le premier cas importé de FHCC a été documenté en France en novembre 2004, chez une patiente qui effectuait régulièrement des séjours au Sénégal où elle se serait infectée (Tarantola et al. 2006). Quelques jours plus tard, une autre patiente a présenté un tableau similaire. Elle est décédée au Sénégal avant son rapatriement. En Corse, une enquête sérologique a été réalisée entre 2014 et 2016 et a montré la présence d'anticorps contre le VFHCC chez des bovins, des ovins et des caprins (Grech-Angelini, Lancelot, et al. 2020). Aussi, depuis 2017, chaque printemps, des collectes massives de tiques ont lieu sur animaux dans les différents départements de la zone méditerranéenne. ; ce qui a permis la collecte de plus de 8000 tiques dont plus de 2300 *H. marginatum* en Corse, toutes négatives en RT-PCR en temps réel Pan-Nairovirus (Lambert et Lanciotti 2009) et en RT-PCR en temps-réel spécifique de VFHCC (Cicculli et al. 2022 ; Wölfel et al., 2007). Les sérologies positives confirmées en séroneutralisation suggèrent qu'un VFHCC circule en France. Cependant,

l'absence de tiques infectées et de cas humain de FHCC interrogent sur cette circulation. Différentes hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ces résultats. Elles concernent la présence d'un VFHCC-*like* inconnu ou la composition des communautés d'hôtes ou la présence d'un autre vecteur local.

e. Méthodes diagnostiques

La FHCC est classée au niveau 4 de risque biologique par le Centre pour le contrôle des maladies (CDC) et l'OMS. De ce fait, les tests diagnostiques sont effectués uniquement dans les laboratoires habilités à travailler sur des échantillons à forte teneur en bio-contaminants (Dreshaj et al. 2016). A ce titre en France, en cas de suspicion de FHCC, le clinicien doit prendre contact avec le Centre National de Référence des Fièvres Hémorragiques Virales, faisant partie de l'Institut Pasteur. Les échantillons sont ensuite conservés dans un tube (pour le sang, plasma et sérum) ou dans du formol (pour les biopsies). A cet échantillon est jointe une fiche de renseignements, pour tracer l'échantillon, et l'ensemble est acheminé au laboratoire de sécurité biologique de niveau 4 (BSL-4) via la réglementation IATA (International Air Transport Association) ou ADR (Accord européen relatif au transport international des marchandises dangereuses par route) selon le mode de transport utilisé (Flusin et al. 2010). Un diagnostic précoce est nécessaire, autant pour le patient et la prise en charge qui en découle, que pour l'entourage et les soignants, afin d'éviter un risque de transmission inter-humaine par le patient virémique (Whitehouse 2004). La prise en charge complète d'un patient malade nécessite une confirmation du diagnostic par des examens virologiques et sérologiques, associés obligatoirement à des mesures d'isolement strict, d'information et d'éducation des collègues et du personnel soignant, et de protection des professionnels de santé.

Le diagnostic de la FHCC repose sur plusieurs critères (Öncü 2013) :

- L'interrogatoire du patient et la recherche de signes cliniques ;
- Le diagnostic différentiel vis-à-vis d'autres maladies ;
- Le diagnostic biologique de certitude par la mise en évidence du virus et/ou la détection d'une réaction immunitaire spécifique contre ce virus, c'est-à-dire la détection d'anticorps.

Pour ce dernier point, plusieurs méthodes diagnostiques existent.

i. Culture cellulaire

La culture cellulaire implique la croissance de cellules en laboratoire dans des conditions optimales pour leur survie et leur multiplication. Dans le cas du FHCC, des lignées cellulaires spécifiques, telles que les cellules Vero ou les cellules BHK-21, sont utilisées car elles sont sensibles à l'infection par le

virus (Bolon 2018). Pour effectuer la culture cellulaire du VFHCC, les cellules sont ensemencées dans des boîtes de culture et incubées jusqu'à ce que celles-ci atteignent une confluence appropriée. Ensuite, le VFHCC, provenant soit d'un échantillon clinique soit d'une souche de référence, est ajouté aux cellules. Celui-ci pénètre dans les cellules hôtes, se réplique et provoque une infection. Au fil du temps, la présence du virus dans les cellules est évaluée en utilisant des techniques de détection telles que l'observation de la cytopathie virale (CPE) ou des méthodes de diagnostic spécifiques comme la PCR ou l'immunofluorescence.

ii. Réaction de Polymérase en Chaîne (PCR)

La méthode de choix pour détecter le virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (FHCC) est la PCR à transcriptase inverse (RT-PCR). Étant donné que le VFHCC est un virus à ARN, la RT-PCR permet de détecter et d'amplifier spécifiquement l'ARN viral à partir d'échantillons biologiques. Cette technique combine deux étapes essentielles : la rétrotranscription de l'ARN en ADN complémentaire (ADNc) et l'amplification de ce dernier par PCR. Elle est souvent utilisée en premier recours dans le diagnostic de la maladie. Ce test permet de détecter le matériel génétique viral sans nécessité de cultiver le virus, et il peut être utilisé pour détecter le virus jusqu'au 16ème jour de l'infection chez l'homme. La PCR en temps réel ou PCR quantitative (qPCR) a été développée pour améliorer la sensibilité de la détection et permettre une estimation du titre viral, c'est-à-dire le nombre de copies du génome viral présentes dans l'échantillon (Poitras et Houde 2002). Les PCR en temps réel réduisent également le risque de contamination lors de la manipulation. Cependant, il est important de noter que la fenêtre temporelle pour détecter la présence du VFHCC est brève en raison de la virémie de courte durée chez les humains et les animaux, qui est d'environ 10 jours. Malgré cette limitation, les PCR en temps réel sont particulièrement utiles pour la détection virale dans les tiques, considérées comme les seuls réservoirs du VFHCC. En effet, certaines tiques peuvent maintenir le virus pendant plusieurs mois, voire plusieurs années.

iii. ELISA

La méthode ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) est une technique immunoenzymatique, classique pour le diagnostic sérologique de nombreuses maladies. Elle est largement utilisée pour détecter les anticorps suite à une séroconversion après une virémie causée par le VFHCC. Cette technique repose sur la visualisation de la réaction antigène-anticorps grâce à une réaction enzymatique colorimétrique. L'enzyme, préalablement couplée à l'anticorps, catalyse une réaction chimique qui transforme son substrat en un composé coloré. L'ELISA est une méthode facile à utiliser, peu coûteuse, qui selon le test ELISA utilisé, permet de détecter les immunoglobulines M (IgM), les

immunoglobulines G (IgG) ou les deux, qui se fixent aux antigènes spécifiques utilisés. Les IgM sont des marqueurs précoces de la maladie, avec un pic de concentration autour de la troisième semaine suivant l'infection, et elles disparaissent généralement au cours du quatrième mois. Les IgG, quant à elles, restent détectables pendant au moins 5 ans chez les animaux (Shepherd, Swanepoel, et Leman 1989). L'ELISA est particulièrement utilisée dans les enquêtes épidémiologiques, car il constitue un meilleur indicateur de la circulation du VFHCC que la détection moléculaire du virus, étant donné que la virémie est de courte durée chez les humains et les animaux. Il est important de noter que l'ELISA ne permet pas de conclure sur la capacité d'un hôte à répliquer plus ou moins efficacement le VFHCC, mais elle informe sur la rencontre de cet hôte avec le virus au cours des derniers mois, voire des dernières années. Cette méthode joue un rôle essentiel dans le dépistage des anticorps et la surveillance de la prévalence de la FHCC dans les populations humaines et animales. Plus récemment, de nouvelles techniques ont été développées. L'une d'entre elles consiste en l'utilisation de la méthode ELISA sandwich à double antigène, pour permettre la détection indépendamment de l'espèce animale productrice d'anticorps spécifiques du VFHCC (Sas et al. 2018). La méthode ELISA sandwich à double antigène implique plusieurs étapes. Tout d'abord, des anticorps spécifiques contre l'antigène d'intérêt sont immobilisés sur une surface solide, généralement une plaque de microtitration. Ensuite, l'échantillon contenant potentiellement l'antigène est ajouté à la plaque et incubé. Si l'antigène est présent, il se lie aux anticorps de capture immobilisés, formant ainsi un complexe antigène-anticorps. Après un lavage pour éliminer les substances non liées, un deuxième anticorps, appelé "anticorps de détection", est ajouté. Cet anticorps est spécifique à une autre région de l'antigène que celle reconnue par l'anticorps de capture. L'anticorps de détection est conjugué à une enzyme, comme la peroxydase de raifort (HRP) ou la phosphatase alcaline, ce qui permet de détecter sa présence. Après une nouvelle étape d'incubation et un nouveau lavage, un substrat est ajouté, et est converti par l'enzyme conjuguée en un produit détectable. Ce produit peut être une couleur ou une fluorescence, selon le substrat utilisé. La présence de ce signal est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre ou d'un équipement approprié, et sa quantité est directement proportionnelle à la quantité d'antigènes présents dans l'échantillon testé.

iv. Séroneutralisation

La technique de séroneutralisation est une méthode utilisée pour détecter et quantifier les anticorps neutralisants spécifiques du VFHCC dans le sérum d'animaux ou d'humains. Les anticorps neutralisants sont des anticorps capables de bloquer l'activité infectieuse du virus en se liant à lui et en l'empêchant de pénétrer dans les cellules hôtes. La séroneutralisation est une méthode précise et spécifique qui permet d'évaluer le niveau d'immunité acquise contre le VFHCC. Dans cette technique, des échantillons de sérum sont dilués et mélangés avec une quantité connue du VFHCC. Ce mélange

est ensuite incubé pour permettre aux anticorps présents dans le sérum de se lier au virus. Après l'incubation, le mélange est ajouté à des cellules sensibles au virus en culture. Si les anticorps neutralisants sont présents dans le sérum, ils empêcheront l'infection des cellules par le virus. La présence d'infection virale est détectée en observant la cytopathie virale, c'est-à-dire les changements morphologiques caractéristiques qui se produisent dans les cellules infectées. La séroneutralisation permet de mesurer le titre d'anticorps neutralisants présents dans le sérum, c'est-à-dire leur concentration effective. Ce titre est exprimé en dilution et représente le plus haut niveau de dilution du sérum capable de neutraliser complètement l'infection virale. Cette méthode permet d'évaluer l'immunité acquise par les individus et de déterminer s'ils ont été exposés au VFHCC.

v. Immunofluorescence indirect (IFA)

L'immunofluorescence indirecte (IFA) est une méthode couramment utilisée pour détecter les anticorps spécifiques du VFHCC dans des échantillons biologiques. Cette technique repose sur le principe de marquer spécifiquement les anticorps avec une sonde fluorescente, ce qui permet de visualiser leur présence en utilisant la fluorescence. Des cellules infectées par le VFHCC sont préparées et fixées sur une lame de microscope. Les échantillons de sérum sont ensuite appliqués sur la lame après perméabilisation des cellules, permettant aux anticorps spécifiques du virus présents dans le sérum de se lier aux antigènes viraux présents sur les cellules infectées. Après un lavage pour éliminer les anticorps non liés, un anticorps secondaire marqué avec un fluorochrome est appliqué sur la lame. Cet anticorps secondaire reconnaît les anticorps spécifiques de la FHCC déjà liés aux antigènes viraux. Si des anticorps anti-FHCC sont présents dans le sérum, ils se lient à l'anticorps secondaire marqué, ce qui entraîne la formation d'un complexe anticorps-anticorps secondaire-fluorochrome. La présence du complexe d'anticorps-anticorps secondaire-fluorochrome est visualisée au microscope à fluorescence. Lorsque la lame est exposée à une lumière de longueur d'onde appropriée, le fluorochrome émet une fluorescence, ce qui permet de détecter et de localiser les anticorps spécifiques du VFHCC présents dans le sérum des patients. La présence de fluorescence dans les cellules indique la présence d'anticorps anti-FHCC. Elle est souvent utilisée comme méthode de confirmation ou de dépistage dans le diagnostic des infections à la FHCC, en complément d'autres méthodes telles que la PCR.

Contexte, question de recherche et objectifs de la thèse

Comme présenté dans le chapitre d'introduction, l'installation récente de la tique *H. marginatum* dans le sud de la France, pose question sur les risques sanitaires associés à cette tique, entre autres, le risque de transmission de VFHCC. Le cœur du travail de ma thèse était de caractériser et spatialiser les risques sanitaires liés à la présence de la tique *H. marginatum*. Cette tique est xérophile et thermophile, inféodée aux climats chauds et secs de type méditerranéen, dont la distribution s'étend actuellement vers des territoires plus au nord sous l'effet des changements climatiques. En France, elle semble s'être installée depuis au moins 10 ans dans au moins 7 départements du pourtour méditerranéen (hors Corse), avec une aire de répartition évoluant encore sous l'effet combiné des mouvements d'animaux et des nouvelles conditions climatiques et paysagères, favorables, de certaines zones. *Hyalomma marginatum* étant un vecteur avéré ou supposé pour différents agents infectieux, exotiques ou endémiques en France, son installation pose la question du risque de transmission de ces agents par cette tique à l'homme et/ou à l'animal. Outre le VFHCC qui constitue une priorité sanitaire en Europe, *H. marginatum* est aussi connue pour être le vecteur d'autres agents pathogènes tels que *Rickettsia aeschlimannii* responsable de fièvre boutonneuse chez l'homme. De ce fait, bien que ma thèse se soit fortement focalisée sur la FHCC, une approche plus globale sur l'ensemble des agents infectieux potentiellement vectorisés par *H. marginatum* a été menée. Ainsi les questions de recherche que nous nous sommes posées étaient : Est-ce que le virus circule en France métropolitaine ? Quel est le cycle épidémiologique de VFHCC en France ? Quels sont les facteurs explicatifs d'une séropositivité au VFHCC chez les bovins et la faune sauvage ? Quels sont les autres micro-organismes, notamment pathogènes, portés par cette tique ?

Le premier objectif spécifique de ma thèse a été de formaliser ce que pourrait être le cycle épidémiologique du VFHCC en France, en prenant en compte tous les acteurs potentiellement présents, vecteur(s) dont la tique *H. marginatum* et hôtes vertébrés, afin de prédire le niveau de transmission du VFHCC au sein du cycle naturel enzootique, si ce dernier existe, ou qu'il se met en place suite à une introduction virale. Je me suis aussi demandé quels facteurs pouvaient changer ce niveau de transmission et créer un terrain favorable à une possible émergence de FHCC chez l'homme en France. L'hypothèse sous-jacente était que, comme pour toutes les maladies vectorielles, la transmission dépend des espèces de vecteurs (présence, abondance, compétence vectorielle et préférences trophiques et écologiques) mais également des communautés d'hôtes (diversité, composition, densités et aptitudes spécifiques à répliquer le virus, déplacements à plus ou moins longue distance). Pour ce

faire, j'ai réalisé une revue systématique de la littérature concernant FHCC et l'ai appliquée au contexte français pour ce qui concerne les espèces de tiques et d'hôtes vertébrés.

Le second objectif spécifique de ma thèse était de savoir si le VFHCC circule d'ores et déjà en France métropolitaine et, si oui, où ce dernier circule préférentiellement. Deux cas de figure sont à prendre en compte : le cas de la Corse où une première étude sérologique menée sur bovins et petits ruminants en 2014-2016 semblait suggérer la circulation de VFHCC, sans savoir si cette situation perdure actuellement, et le cas de la France continentale où aucune donnée n'était disponible. Dans l'hypothèse où de nombreuses espèces animales soient capables d'être infectées par VFHCC et de développer durablement des anticorps spécifiques au virus, la détection d'anticorps chez une espèce largement répartie sur le territoire et fréquemment infestée par *H. marginatum* pourrait être un bon indicateur précoce de circulation. Par ailleurs, la détection de ces anticorps chez différents hôtes vertébrés peut renseigner quant à leur exposition respective aux tiques infectées et donc leur rôle dans le cycle épidémiologique de VFHCC en France. Pour ce faire, j'ai réalisé des enquêtes sérologiques sur sérums bovins issus de la prophylaxie annuelle et disponibles dans les laboratoires départementaux d'analyse, en Corse et sur le continent, ainsi que sur ongulés sauvages (sangliers, cerfs, chevreuils, mouflons) à l'aide des sérothèques des fédérations départementales de chasse.

Le troisième objectif spécifique de ma thèse, directement lié au second, était d'identifier certains facteurs pouvant expliquer la séropositivité, et donc le niveau de transmission du VFHCC, chez les bovins et la faune sauvage française, dans le cas où une circulation était suggérée par la présence d'anticorps. Mon hypothèse portait sur certains facteurs comme les conditions environnementales favorisant la présence ou l'abondance de vecteurs, des aptitudes individuelles des animaux à être exposés au virus, ou encore des pratiques humaines pouvant influer sur l'exposition des animaux à la tique ou sur la plus ou moins bonne transmission virale. Pour ce faire, j'ai corrélé mes résultats de sérologie à différentes informations relatives aux animaux prélevés et à leur environnement, obtenues à partir de différentes bases de données. En amont, une enquête préliminaire a été réalisée dans quelques élevages bovins corses, afin de juger de l'intérêt à pallier le manque d'informations concernant certaines pratiques d'élevage telles que les traitements antiparasitaires, le libre parcours en estive ou l'association avec d'autres espèces animales.

Enfin, mon dernier objectif spécifique portait sur l'identification du cortège de micro-organismes portés par *H. marginatum* (agents infectieux dont le VFHCC et/ou symbiotes), afin de prédire son rôle

potentiel dans la transmission des agents infectieux en France. Partant de l'hypothèse que la tique exotique *H. marginatum*, lorsqu'elle est introduite, arrive avec son lot d'agents infectieux et peut également contracter des agents infectieux locaux, cela m'a permis de cibler certains agents infectieux susceptibles d'être transmis par *H. marginatum* ou des agents transmis par d'autres tiques et circulant d'ores et déjà dans la zone d'étude. Pour leur détection, j'ai choisi deux méthodes permettant un screening large : la technique Fluidigm et la protéomique pouvant détecter, respectivement, de l'ADN ou les séquences peptidiques des agents infectieux sélectionnés.

Chapitre 1 : Cycle supposé de transmission du VFHCC en France

Ce premier chapitre porte sur la détermination du cycle supposé de transmission enzootique de VFHCC en France, si ce virus est introduit ou s'il s'avère déjà circuler localement, et des facteurs biotiques et abiotiques pouvant jouer sur son niveau de transmission.

Comme pour toute maladie infectieuse à transmission vectorielle, la transmission de l'agent infectieux dépend de la capacité vectorielle des espèces de vecteurs, incluant entre autres la compétence vectorielle, l'abondance et survie des vecteurs, leur fréquence de piqûres, leurs préférences trophiques, mais également de la nature et la composition des communautés d'hôtes. En effet, comme cela est présenté par Keesing et Ostfeld dans l'effet dilution (Keesing, Holt, et Ostfeld 2006), en cas d'agent infectieux transmis par un vecteur arthropode avec un large panel d'hôtes, la diversité des espèces hôtes avec un mélange de "bons" et de "mauvais" réservoirs ou encore l'accessibilité pour le vecteur à seulement de "mauvais" réservoirs pourrait réduire le niveau de la prévalence d'infection chez le vecteur et ainsi le risque de transmission de l'agent infectieux et de la maladie associée, y compris dans le cas des zoonoses comme la maladie de Lyme et la tique vectrice de borrélies, *Ixodes ricinus*. Les hôtes animaux des tiques vectrices peuvent avoir trois rôles différents. Le premier concerne l'amplification des populations de tiques, certains hôtes étant très fréquemment parasités par les tiques du fait des préférences trophiques de ces dernières, ou peut-être de leur simple disponibilité dans l'environnement si ces tiques sont reconnues comme généralistes. Le second rôle des hôtes est leur capacité à plus ou moins bien répliquer le VFHCC. En effet, certains hôtes vont développer une virémie suffisamment forte à la suite de l'infection à VFHCC et seront alors capables d'infecter de nouvelles tiques vectrices. Si ces derniers sont en outre fréquemment piqués par les tiques vectrices, comme ce peut être le cas des vaches, on prédit alors une augmentation de la prévalence d'infection des vecteurs. A l'inverse, si une espèce hôte comme le cheval par exemple, qui n'est pas en mesure de bien répliquer le virus, mais qui est fréquemment parasitée par les tiques vectrices, elle contribuera à accroître les populations de vecteurs sans pour autant aisément les infecter ; on prédit alors une faible prévalence d'infection des vecteurs, même si le nombre absolu de vecteurs et donc de vecteurs infectés tend à augmenter. Enfin, certains hôtes peuvent présenter une des deux aptitudes, voire combiner les deux, mais aussi avoir la capacité de transporter à plus ou moins longue distance des tiques vectrices, et ainsi participer à la diffusion du VFHCC si ces dernières s'avèrent infectées. On comprend alors pourquoi la présence de différentes espèces d'hôtes dans un écosystème et leur abondance relative peuvent avoir un effet sur la transmission du VFHCC, en fonction du caractère généraliste ou spécialiste du(des) vecteur(s). En pré-requis, afin d'identifier les préférences d'hôtes des tiques du genre *Hyalomma*, et plus particulièrement *H. marginatum*, j'ai été associée à un travail de revue systématique de la littérature et de méta-analyse renseignant sur les associations

préférentielles tiques-hôtes rapportées en Europe, dont la France. Les résultats de ce travail sont en cours de valorisation dans un article intitulé “Systematic review and meta-analysis of *Hyalomma marginatum*’s vertebrate hosts in Europe” (**article 1**) dont je suis co-auteur et présenté ci-dessous.

Ensuite, pour évaluer le possible cycle de transmission du VFHCC en France, deux scénarios extrêmes étaient envisageables, avec toute une gamme de situations épidémiologiques intermédiaires. Dans le premier scénario, la transmission serait efficace, avec la présence d'espèces de tiques compétentes pour le VFHCC et parasitant majoritairement des hôtes répliquant bien le virus. Dans cette situation, ces hôtes pourraient à la fois contribuer à l’amplification des populations de tiques et infecter de nombreuses tiques "saines" pendant leur phase de virémie, puis ces tiques pourraient transmettre le virus de manière verticale et horizontale, permettant ainsi la circulation du virus au sein des populations de tiques établies dans la zone concernée. Dans le deuxième cas, et sous l’hypothèse que suffisamment d’hôtes soient disponibles dans l’environnement pour la poursuite du cycle de développement des espèces de tiques vectrices, ces dernières parasiteraient, majoritairement ou du moins à certains stades de développement, des hôtes répliquant peu voire pas du tout le VFHCC. Le virus serait alors dilué au sein des populations de tiques car une grande majorité n’aurait pas l’opportunité de s’infecter, réduisant ainsi la transmission du VFHCC entre les tiques et les animaux, et par conséquent à l'homme. Afin de déterminer dans quel contexte se situe la France, une revue bibliographique a été réalisée afin d'obtenir des informations quant aux tiques présentes en France, leur compétence vectorielle avérée ou suspectée pour le VFHCC, leur abondance sur le territoire et en particulier dans le sud de la France à plus grand risque d’introduction ou de circulation déjà existante, ainsi que leurs préférences trophiques. Il était également important de renseigner le rôle des hôtes animaux (vis-à-vis de l’amplification du virus) qui leur sont associés, ainsi que d’avoir des données quant à leur densité sur le territoire, afin de prioriser les interactions hôtes-vecteurs-virus et construire le cycle hypothétique de transmission du VFHCC dans le pays. Enfin, notre recherche bibliographique a aussi concerné les facteurs influençant les niveaux de transmission du VFHCC entre les animaux et les tiques, afin de répertorier ceux qui pouvaient s’appliquer au contexte français et qu’il fallait donc surveiller pour être en mesure de prédire une possible émergence de FHCC en France. Cette revue a été réalisée en suivant au plus près les lignes directrices PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and meta-analysis) (Page et al. 2021). Pour ce faire, des recherches bibliographiques ont été effectuées dans les bases de données suivantes : Pubmed, Scopus, ScienceDirect. Ce sont 1 035 publications qui ont été sélectionnées (37 revues générales et 998 articles) dont 323 qui traitaient d’épidémiologie, 89 du rôle des tiques et 13 du rôle des hôtes vertébrés, et qui ont été conservées pour l’analyse. Cette deuxième revue a abouti à la publication d'un second article

présenté ci-dessous intitulé "**Systematic Review on Crimean–Congo Hemorrhagic Fever Enzootic Cycle and Factors Favoring Virus Transmission: Special Focus on France, an Apparently Free-Disease Area in Europe**" (article 2), et dont je suis le premier auteur, dans Frontiers in Veterinary Science en juillet 2022.

Article 1 :

Systematic review and meta-analysis of *Hyalomma marginatum* vertebrate hosts in the EU

Bah, MT. [1,2]; Vial, L. [1,2]; Busani, L. [1,2]; Souq, L. [1,2]; Grosbois, V. [1,2]; Bernard, C.[1,2,3]; and Jori, F[1,2].

1 CIRAD, UMR ASTRE, Montpellier, France,

2 ASTRE, Univ Montpellier, CIRAD, INRAE, Montpellier, France,

3 French Establishment for Fighting Zoonoses (ELIZ), Malzéville, France

Citation: Bah, MT.; Vial, L.; Busani, L.; Souq, L.; Grosbois, V.; Bernard, C.; and Jori, F. (In prep) Systematic review and meta-analysis of *Hyalomma marginatum* vertebrate hosts in the EU

Abstract

Host choice is a determining component of tick population and pathogen transmission dynamics. In Europe, ticks of the genus *Hyalomma*, which are implicated in the transmission of several pathogens such as the Crimean Congo Haemorrhagic fever, have been found more often in areas previously lacking this ticks species. Therefore, we performed a systematic review of the tick-host relationship of *Hyalomma spp* in Europe with a focus on *Hyalomma marginatum* with a meta-analysis and meta-regression to describe its host preference pattern using three outcome values. Our qualitative analysis highlighted the increases in tick-host interaction report in the last decades mostly in South-eastern and Central Europe. *H. marginatum* was also the species that hold the most host-tick relationship citation and for which the largest number of host species were reported. Even though some preferential interaction could be found for Horses in the adult stage and Emberizidae and Strigidae for the immature stages, Host species or families weren't involved in much of the overall variation between tick-host interaction outcomes suggesting the involvement of other components. As such, our results suggest that *H. marginatum* is a generalist tick whose distribution depends primarily on environmental conditions such as climate and habitat. The current limitation of such approaches and ways to improve them are further discussed.

Introduction

Ticks are after mosquitoes, the second most important family of arthropod vectors involved in the transmission of vector-borne disease to humans. In Europe, the incidence of zoonotic tick-borne diseases such as anaplasmosis, Lyme borreliosis, Crimean-Congo Haemorrhagic Fever (CCHF) and rickettsiosis is increasing due to climate change, among other factors (Gray *et al.*, 2009).

Ticks (*Ixodidae*) are ectoparasites that require several hematophagous meals to complete their life cycle; thus, they alternate free-living non-parasitic and parasitic stages during their development. The non-parasitic stages include eggs, molting stages after blood-feeding, active or passive host searching stages after molting, and ovipositing females, are the most sensitive stages to environmental conditions. The transition from one development stage to the next one, except the emergence of larvae from eggs, requires blood feeding and therefore, the completion of a parasitic stage on a vertebrate host.

The range of host species on which a tick can feed varies depending on the development stage (e.g. usually immatures versus adults) and the tick species. Most ticks require to feed on three-hosts species (*i.e.* larvae, nymphs and adults feeding on different animals) to complete their development but in some tick species the development cycle is completed on two (i.e ditropic) or even on a single (i.e monotropic) animal host. Some ticks are specialist while others are much more generalist. Historically, anatomical descriptions of ticks mouthparts and coxae suggested that ticks had adapted to restricted groups of host species with which they had co-evolved, leading to the hypothesis that ticks were specialist parasites (Hoogstraal and Aeschlimann 1982). However, it was later argued that the constraints generated by environmental conditions on free-living stages are more critical to the fitness of tick populations than the constraints generated by host suitability and availability on parasitic stages because ticks would be able to feed on a broad enough range of vertebrate host species (Klompen *et al.* 1996). This statement was later supported by studies showing that host community abundance and specific composition contributed weakly to explaining the geographical distribution of tick species

(Cumming 2002; Estrada-Peña *et al.* 2020; Nava and Guglielmone 2013). The most straightforward approach to assess whether a tick species is a specialist is to consider the number of host species it can feed on (Lymbery 1989). Other criteria such as the prevalence of infested hosts, the intensity of infestation or the phylogenetic distance between parasite hosts can also be considered (Poulin and Mouillot 2003; Rohde 1980).

The specificity or genericity in the host choice is important as it has a direct impact on pathogen transmission and the possibilities of disease spillover. Indeed, a generalist tick that could feed on a large diversity of hosts and whose geographic distribution is barely limited by host availability, can contribute to the emergence of diseases through interspecific pathogens' transmission or geographic expansion (Mccoy, Léger, and Dietrich 2013; Dietrich *et al.* 2014). In addition, the density of generalist ticks is likely to increase as the number of species in the host community and/or the overall abundance of hosts increases. Because specialist ticks rely on a restricted number of host species and have a more limited potential in terms of geographic expansion, they are less likely to be involved in emergence events resulting from interspecific pathogen transmission or from colonization of new areas (Mccoy, Léger, and Dietrich 2013; Dietrich *et al.* 2014). However, because of their high adaptation to specific host species, their populations can locally thrive and contribute to the spread of their specific pathogens for which their vector competency is high (Richard S. Ostfeld and Keesing 2000a).

In epidemiological systems involving a generalist vector, a vector-borne pathogen and multiple host species, the pathogen amplification transmission and maintenance potential may vary among the host species community. In such systems, high species diversity can create a dilution effect resulting from the transmission of the pathogen to a wide range of hosts with low amplification, transmission and maintenance potential (Richard S. Ostfeld and Keesing 2000b; Schmidt and Ostfeld 2001). However, even if some hosts are poorly competent for the pathogen, they can still be good amplifiers of the tick and therefore contribute to boosting the tick population and thus, the potential number of infectious individuals. The dilution effect should barely occur in systems where the tick vector is a specialist species (Occhibove *et al.*, 2022).

Tick species belonging to the genus *Hyalomma* are implicated in the transmission of several important pathogens such as the Crimean Congo Haemorrhagic Fever virus (CCHF). Immatures *Hyalomma* ticks feed mainly on species belonging to the *Rodentia* and *Lagomorpha* order or to the *Aves* class while the adults feed mostly on species belonging to the *Bovidae* family (Spengler and Estrada-Peña, 2018). However, the range and number of hosts involved in the *Hyalomma* genus life cycle varies greatly between species. For example, *Hyalomma aegyptium* is a three hosts tick that feeds mainly on *Testudo* tortoises (Široký *et al.*, 2006) albeit human and other vertebrates can act as occasional hosts. *Hyalomma dromedarii* is a two hosts tick (occasionally one or three) mainly found on camels. *Hyalomma scupense* is a one or two hosts species that feed preferentially on domestic ungulates, especially horses and cattle, regardless of the stage (Apanaskevich, 2004; (Apanaskevich *et al.*, 2013). Conversely, *Hyalomma rufipes* and *Hyalomma marginatum* tend to be more generalist (Estrada-Peña *et al.*, 2018). The latter is one of the main vectors of the CCHF virus, currently considered as an emerging disease currently in Europe.

H. marginatum is a ditropic tick. The larvae and nymphs feed on the same host, which is usually a small vertebrate such as a lagomorph, a bird, a hedgehog or a rodent, whereas the adults usually feed

on a large ungulate such as a horse, a cattle, a sheep, a goat, a deer, a wild boar or occasionally a human (Apanaskevich 2004). Considering its wide hosts' range and its wide geographical distribution, *H. marginatum* could be considered as a generalist tick. However, host preferences have been reported at least for the adult stage (Grech-Angelini *et al.* 2016).

Furthermore, considering the hypothesis of "global generalist and local specialist" recently developed by MCcoy, Léger, and Dietrich (2013), ticks would locally develop preferences and adaptations to the most largely available host species leading to variations in the host species preference patterns across the tick distribution range. Under this hypothesis, an assessment of host preference at a wide scale would lead to falsely consider a tick species as generalist. Conversely, observation at the scale of the tick species distribution range of higher tick densities on certain host species, could result from the confounding effect of climate and habitat conditions rather than from genuine tick host preferences, and could thus lead to false conclusions regarding its classification as a generalist or specialist vector.

In this study, we conducted a systematic review of tick-host interactions of the *Hyalomma* species present in Europe in order to synthesize the community of interacting organism with the *Hyalomma* genus in Europe. Subsequently, we implemented a meta-analysis specifically on *H. marginatum* in order to describe the host species range of this vector, assess its host preference pattern and address whether it can be considered as a generalist or as a specialist tick species. Finally, based on those results, we discussed the potential influence on the most described host species on the tick life cycle and on the circulation of its vector borne pathogens such as CCHF.

Materials and methods

We followed a systematic review approach, with the goal to extract all evidence of *Hyalomma* species tick-host interaction in Europe available in the literature in the last years. The systematic review was conducted following as closely as possible PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and meta-analysis) guidelines (Page *et al.*, 2021). To achieve that goal, literature searches were carried out in the following databases: BIOSIS, CAB, Embase, MEDLINE, PubMed, Scopus and Web of Science. Publications were selected through specific keywords for Title (K1), abstract (K2) and within the core text (K3). The first list of keywords consisted of an enumeration of all *Hyalomma* species that can be found in Europe (Estrada-Peña *et al.*, 2018) which were combined into query K1. The second list of keywords consisted of a list of species common names, families or clades that could act as potential hosts of *Hyalomma* ticks and were integrated into query K2. The third list of keywords consisted of an enumeration of all the countries within Europe which formed query K3 (Table 1).

Table 1: Queries used for the title (K1), abstract (K2) and body (K3) in the systematic literature review.

K1	K2	K3
Hyalomma OR marginatum OR aegyptium OR anatolicum OR rufipes OR scupense	animals OR ruminants OR ungulates OR vertebrates OR Cervidae OR birds OR livestock OR cattle OR hares OR rabbits OR reptiles OR hedgehogs OR lagomorphs OR deer OR horses OR sheep OR goat OR Turdidae OR boar	Albania OR Andorra OR Armenia OR Austria OR Azerbaijan OR Belarus OR Belgium OR 'Bosnia and Herzegovina' OR Bulgaria OR Croatia OR Cyprus OR Czechia OR Denmark OR Estonia OR Finland OR France OR Georgia OR Germany OR Greece OR Hungary OR Iceland OR Ireland OR Italy OR Latvia OR Lithuania OR Luxembourg OR Malta OR Monaco OR Montenegro OR Netherlands OR 'North Macedonia' OR Norway OR Poland OR Portugal OR 'Republic of Moldova' OR Romania OR 'Russian Federation' OR Russia OR 'San Marino' OR Serbia OR Slovakia OR Slovenia OR Spain OR Sweden OR Switzerland OR Turkey OR Ukraine OR 'United Kingdom' OR Wales OR Scotland OR 'Northern Ireland' OR England

In addition to the keywords, inclusion and exclusion criteria were defined. Indeed, only original data collected in natural conditions on the trophic relationships of ticks of the genus *Hyalomma,* (i.e. a tick detected on a host), were included. As such, strict modeling studies, reviews and laboratory experiments were excluded. Moreover, we reduced our screening to publications which were in English or French. No exclusion criteria were done according to the time of publication as it is supposed that host preferences should be constant across time, but we restricted the geographical area of the study to Europe. The choice of European countries was based on the list set up by the World Health Organisation's Regional Office for Europe, which includes Europe in the broadest sense. Even though The Central Asian countries (Kazakhstan, Kyrgyzstan, Tajikistan, Turkmenistan, and Uzbekistan) were included in the list, we chose to remove them from our study scope as they were too geographically too distant from it. Finally, publications whose access was restricted (publications that were too old and present only in the archives, or whose full texts were not accessible) could not be included in our study. We aimed to select publications in which natural observed tick-host observation was reported. In this regard, publications which required the collection of ticks from different hosts for the study of a virus for example were included.

Duplicates between databases were removed in Zotero (Roy Rosenzweig Center for History and New Media, 2022) and selected publications were imported into Rayyan. Rayyan is a free web tool (Ouzzani *et al.*, 2016) designed to help a team of researchers working on systematic reviews, scoping reviews and other knowledge synthesis projects, by speeding up the process of selecting studies through easy screening of titles and abstracts.

After careful evaluation by one reviewer according to our inclusion criteria in Rayyan, a full-text review was conducted on selected articles to extract pertinent data. A first database was developed including the following qualitative data: title, authors, date of publication, country of study and if available regions or sub-regions in which the sampling took place, year and months of sampling, host

species and *Hyalomma* tick species involved, life stages of the sampled ticks as well as the invasive status of the collected ticks (imported or resident). From such shortlisted and searchable articles that included specific data on *H. marginatum*, we aimed to extract the following additional quantitative variables for each sampled host species: number of examined hosts, number of hosts infested by *H. marginatum*, number of *H. marginatum* ticks collected, and number of ticks collected in total. This data-extraction step was validated by two other reviewers, to reduce the potential for miscount and misclassification of studies.

In addition to the available information within the article, we extracted a measure of the most dominant landscape in which the sampling was conducted as well as the suitability of this habitat for the occurrence of *H. marginatum*. In order to do so, we relied on two raster maps, respectively: LANMAP 3 and the *H. marginatum* Suitability Map in Europe from Estrada-Peña (2016).

LANMAP is a European landscape classification using digital data with four hierarchical levels including climate, altitude, geological material and land cover as determinant factors (Mücher *et al.*, 2010). It provides 350 landscape types, at the most detailed level, with 14000 mapping units with a minimum mapping unit of 11 km2. For the meta-analysis, we used a level of detail sufficient for distinction between climates.

The suitability for *H. marginatum* was obtained from the map produced by Estrada-Peña and Wint (2016), who used MODIS satellite data of daytime land surface temperature and the Normalized difference vegetation index at a 1km spatial resolution as predictive covariates for tick's occurrence in a statistical regression model. We extracted values from the latter two rasters at the lowest geographical scale reported in each publication. Specifically, we computed the mean value of the suitability of *H. marginatum* within the region/subregion or country sampled and we extracted the most dominant landscape within the sampling zone being the region/subregion or the country.

A Meta-analysis was then carried out on data extracted specifically for *H. marginatum*. The quantitative outcome, also called effect size, from various separate studies was pooled together in a statistical model to provide an estimate of the combined effect size and error. The effect sizes from several studies are expressed on the same scale, and each effect size corresponds to a particular outcome. Moreover, effect sizes are weighted in such a way that precise estimates (those with lower sampling error) have a higher influence on the pooled effect size than inaccurate ones. We investigated three outcomes: 1. Proportion of hosts infested by *H. marginatum* among hosts examined for ticks, as a proxy of the infestation rate; 2. Proportion of *H. marginatum* ticks among the total number of ticks collected on the hosts, as a proxy for measuring the competitiveness of this tick species; 3. Mean number of *H. marginatum* ticks collected per host, as a proxy of the parasitic load.

We used a random-effects model to partially pool the effect size, given the diversity of contexts involved in the original studies. Indeed, even after accounting for sampling error, an additional source of variation between studies was expected (Senior *et al.*, 2016). This variation was referred to as heterogeneity. Some studies in our meta-analysis contributed more than one observed effect size as they could report multiple tick-host interactions. Thus, heterogeneity was measured between interaction records instead of studies. The heterogeneity variance τ^2 was calculated using the restricted maximum likelihood estimator for continuous effect sizes and the maximum likelihood estimator for

proportions (Viechtbauer 2005). Among the various measures of heterogeneity that can be quantified based on τ^2, we used the I^2 statistic. This parameter can be conceptualized as the proportion of variation in effect sizes that cannot be assigned to sampling error (Higgins and Thompson 2002). These benchmarks, define small, medium, and high I^2 as 25%, 50%, and 75%, respectively (Higgins *et al.* 2003) and facilitate comparison of heterogeneity between meta-analysis.

Hosts, climate and environmental suitability were used as factors to explain the heterogeneity among effect sizes. Thus, subgroup meta-analysis and meta-regression were conducted. We chose to gather some hosts by family instead of species (e.g. *Caprinae* for sheep and goat, *Cervidae* to include red deer, roe deer and fallow deer, and any bird families that could be captured) in order to have a meaningful number of observations per category. We conducted subgroups meta-analysis for the categorical variables (hosts and climate), and meta-regressions for the continuous variable (Suitability). In a subgroup meta-analysis, it is hypothesized that effect sizes from different studies do not stem from the same general population but are rather divided in subgroups, each of which has a unique distinct overall effect. These subgroup effects are estimated, and a null-hypothesis significance test is performed assuming the absence of differences between subgroups. Cochran's Q statistic (Cochran 1954) is employed to measure the differences between the estimated effect sizes and compared to its theoretical $\chi 2$ sampling distribution under the null hypothesis. Effect-size estimates of subgroups based on fewer than 5 studies must be interpreted with caution due to the inaccuracy in the estimation of τ^2 (Borenstein *et al.*, 2021). In order to minimize bias in τ^2 estimation, subgroups were assumed to share a common estimate of the among-studies heterogeneity.

In a meta-regression, the outcome (response variable) is predicted according to the values of explanatory variables, similar to multiple regression. The outcome is the effect size, and the explanatory variables are common characteristics between studies that can have an impact on the effect size. In other terms, the meta-regression investigates whether specific explanatory variables explain some of the variability of effect size among studies.

We conducted this analysis on the adult and immature stages separately, as their hosts are different. For statistical analyses, we used the R statistical software version 4.0.2 (R Core Team, 2022) with the packages *meta* (Schwarzer 2022) and *metafor* (Viechtbauer 2022).

Results

Bibliometric outputs

The initial query of the seven target data bases yielded 1448 records, which reduced to 435 articles after removing duplicates. Among these, 319 references were selected for full reading during the first phase of selection by title and abstract, using Rayyan. A total of 100 references could not be exploited, either because the full text was unavailable or because they were written in a language other than French or English. The remaining 219 articles were read, and three of them were finally discarded because they were considered irrelevant. The remaining 219 publications were included in the qualitative analysis, 190 of them that providing sufficient details to be included in the quantitative analysis (Figure 1).

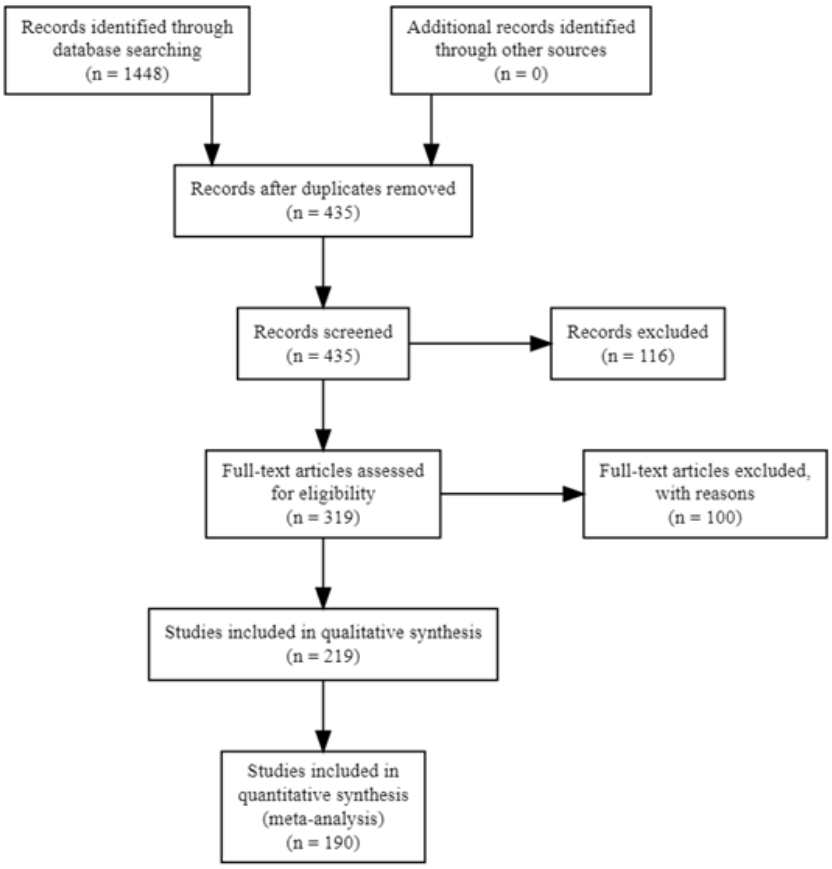


Figure 1 PRISMA flow chart representing the selection of studies included in the systematic review on the dispersal and maintenance of ticks of the genus Hyalomma in Europe by wild and domestic animals.

Among the 219 publications, the oldest ones dated from 1969, and only thirteen were published between 1969 and 1999. Otherwise, most of the selected articles (137) were published between 2011 and 2021 (Fig 2).

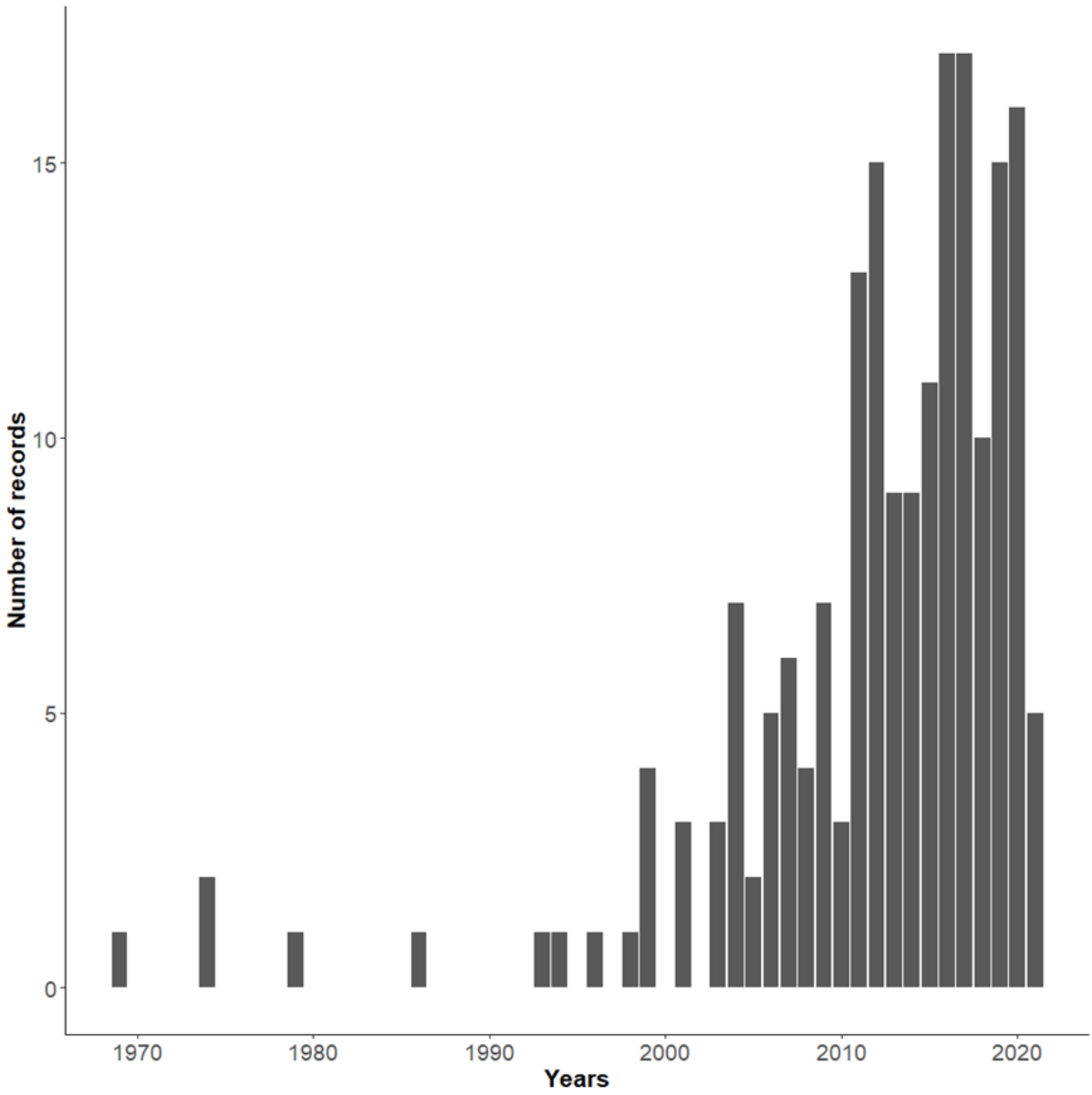


Figure 2 Number of publications selected for quantitative analysis per year included in the systematic review on the dispersal and maintenance of ticks of the genus Hyalomma in Europe by wild and domestic animals.

The selected publications covered a range of 29 countries. Among them, Turkey was the most sampled, followed by Italy and Spain, each country representing 16% of the selected publications, respectively (Fig 3).

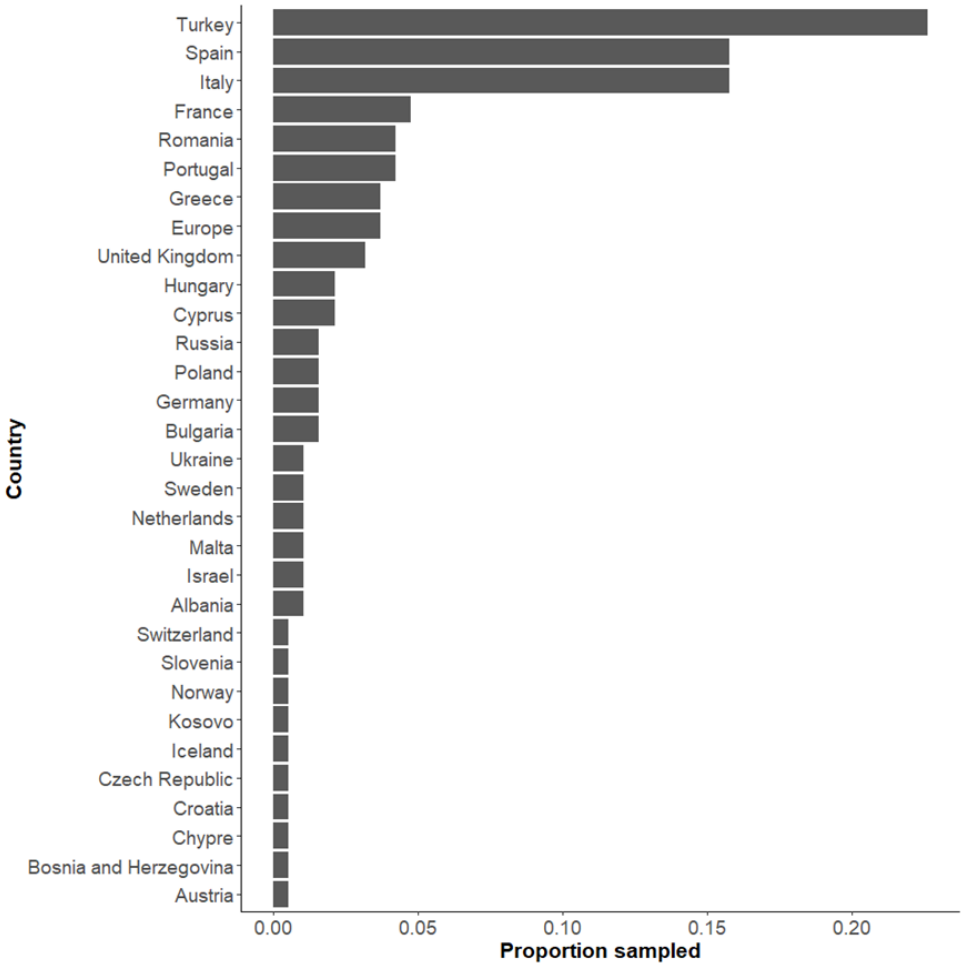


Figure 3 Number of publications selected for quantitative analysis by country.

Qualitative analysis on the different Hyalomma tick species

Out of the 190 remaining publications, 85 (45%) were reports of tick records on domestic hosts, 70 (37%) on wilds hosts and 24 (12%) on both wild and domestic animal populations. Nine of them (5%), concerned free hunting stages and 2 (1%) were human case reports (Figure 4).

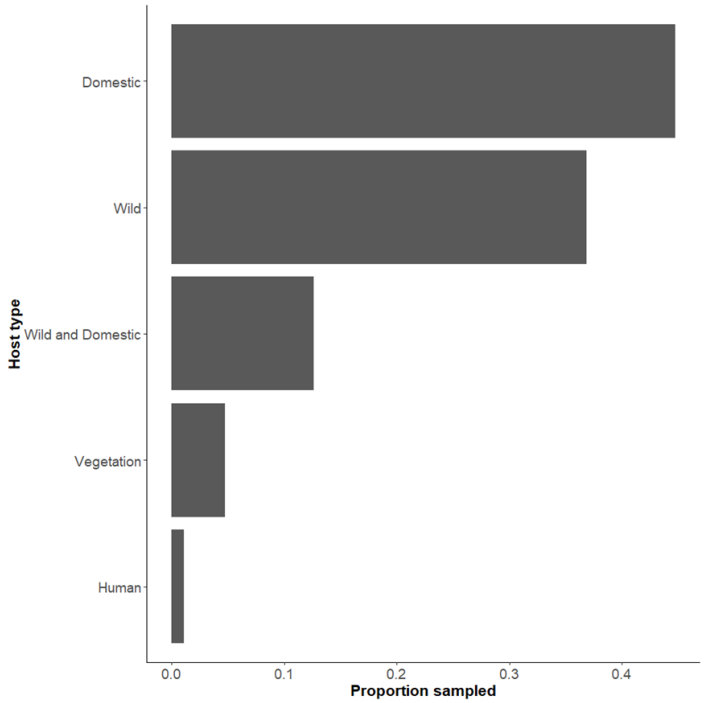


Figure 4 Sampling effort for each host type.

Table 2: Number of host species infestation distinct records for each *Hyalomma* species. Each citation represents one report of a tick species infesting one host species reported in a publication.

Species	Number of citations	Percentage (%)
Hyalomma marginatum	142	41
Hyalomma excavatum	34	10
Hyalomma lusitanicum	32	9
Hyalomma rufipes	29	8
Hyalomma scupense	27	8
Hyalomma aegyptium	27	8
Hyalomma unspecified	22	6
Hyalomma anatolicum	18	5
Hyalomma dromedarii	3	1
Hyalomma asiaticum	2	1
Hyalomma impeltatum	2	1
Hyalomma truncatum	2	1
Hyalomma turanicum	2	1

Twelve species belonging to the genus *Hyalomma* were reported in Europe. The most often reported species was *H. marginatum*, with 142 citations (42%) (Table 2).

The number of citations and the number of reported host species were positively correlated. As such, *H. marginatum* is also the *Hyalomma* species with the most reported host species in our study (Figure

5). The second *Hyalomma* species with the most reported host species was *H. rufipes* even though its number of citations was relatively low (27). For the remaining commonly reported *Hyalomma* species (5 in total), the number of host species was below twenty, possibly due to their fewer number of citations.

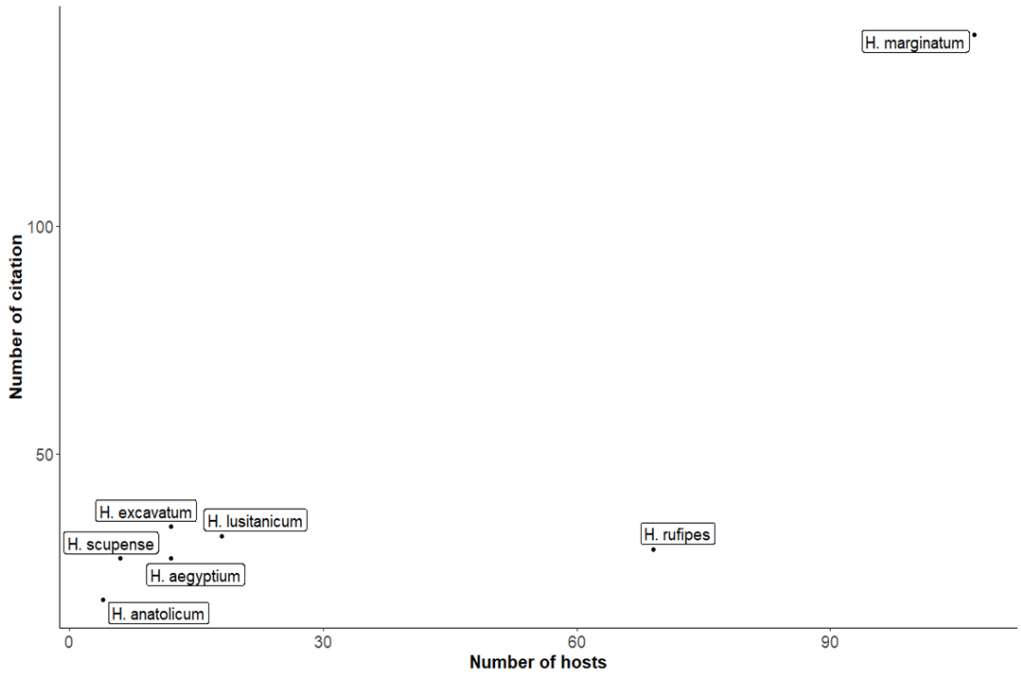


Figure 5 Number of distinct reported host species in relation to number of publications reporting on parasitised host species for the main reported Hyalomma species.

Quantitative analysis on H. marginatum

Table 3 presents a summary of the effect sizes for the three predefined outcomes (infestation rate, competitiveness, and parasitic load) of the meta-analysis, estimated from the 75 relevant publications presenting quantitative data on the interactions between vertebrate hosts and *H. marginatum*. The number of reported interaction records differs greatly by development stage and outcome. On average, there are many more records for immature stages than for adult stages. The infestation rate is less reported than the two other outcomes for both stages. The estimates of effect size are quite similar across developmental stages, except for the mean competitiveness, which was considerably higher in immature stages than in adult stages. This means that *H. marginatum* is a predominant tick species on hosts during immature stages of its life cycle whereas it is less commonly found on vertebrate animals during its adult stages. Regardless of the effect size, confidence intervals are large and the heterogeneity between tick host interaction) is substantial (Table 3), which suggests the existence of several factors including host preferences or sampling bias, that deserve further investigation.

Table 3: Summary of the effect-size estimates with their 95% confidence interval and the estimated heterogeneity (I^2) for the three target outcomes by developmental stage. The infestation rate is measured by the proportion of hosts infested by *H. marginatum* among hosts examined for ticks; the competitiveness by the proportion of *H. marginatum* in relation to the

total number of ticks collected on the hosts; and the parasitic load by the average number of *H. marginatum* collected per host. Results are broken down by stage, as *H. marginatum* is predicted to feed on very different hosts in immature and adult stages, as all ditropic ticks.

Development stage	Effect size	Number of interaction records	Estimated effect size	95% Confidence Interval	Between interaction records heterogeneity (I^2 in %)
Adult	Infestation rate*	14	0.106	0.003;0.296	90.7
	competitiveness**	39	0.080	0.038;0.016	99.6
	Parasitic load***	36	1.625	0.59;2.661	99.8
Immature	Infestation rate*	45	0.091	0.057;0.141	80.5
	competitiveness**	78	0.781	0.583;0.901	84.2
	Parasitic load***	63	0.064	0.045;0.083	78.3

* proportion of animals ** proportion of ticks *** mean number of ticks per animal

Effect of the host

Adult stage

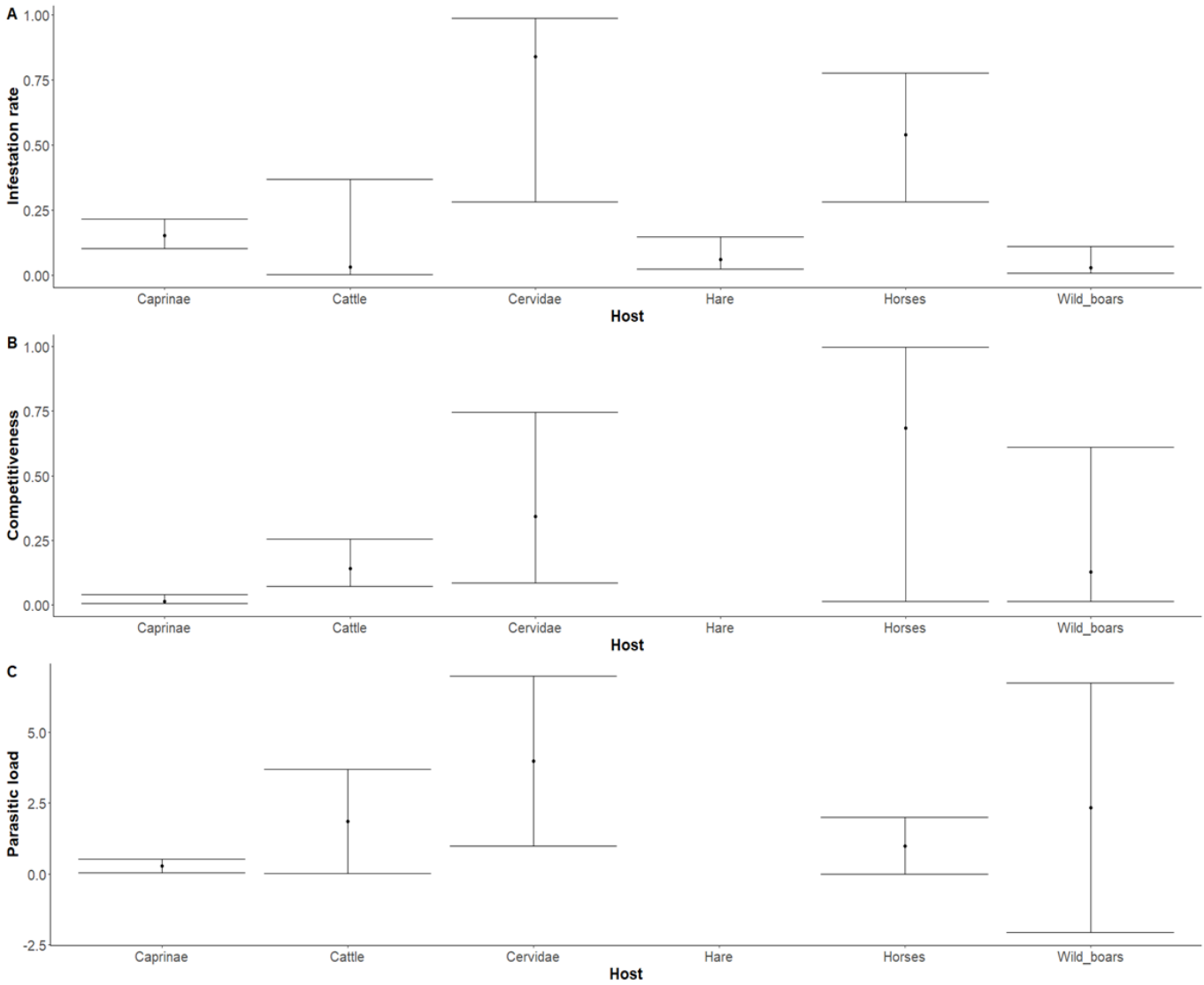


Figure 6 Effect of host species on (A) infestation rate (B) competitiveness (C) parasitic load for adult stage. Effect sizes are represented with their 95% confidence intervals.

Except for *Caprinae*, we observed a relatively high imprecision in the estimated pooled effect size across tick-host interaction for each species regardless of the effect size (Figure 6). Competitiveness of *H. marginatum* across hosts was significantly different (Q = 19.71, p-value = 0.006). A smaller proportion of *H. marginatum* in relation to other tick species was observed for *Caprinae* in comparison to other groups. No significant difference was found when comparing subgroup differences for infestation rate and parasitic load (Respectively Q = 9.76, p-value = 0.0825; Q = 3.33, p-value = 0.5044). Nevertheless horses, *Cervidae* and cattle had higher estimations in parasitic loads, while *Cervidae* and horses had higher estimations for infestation rate in comparison to other hosts species.

Residual heterogeneity I^2 after accounting for host effect was 88.1%, 99.4%, 99.7% for infestation rate, competitiveness and parasitic load, respectively.

Immature stages

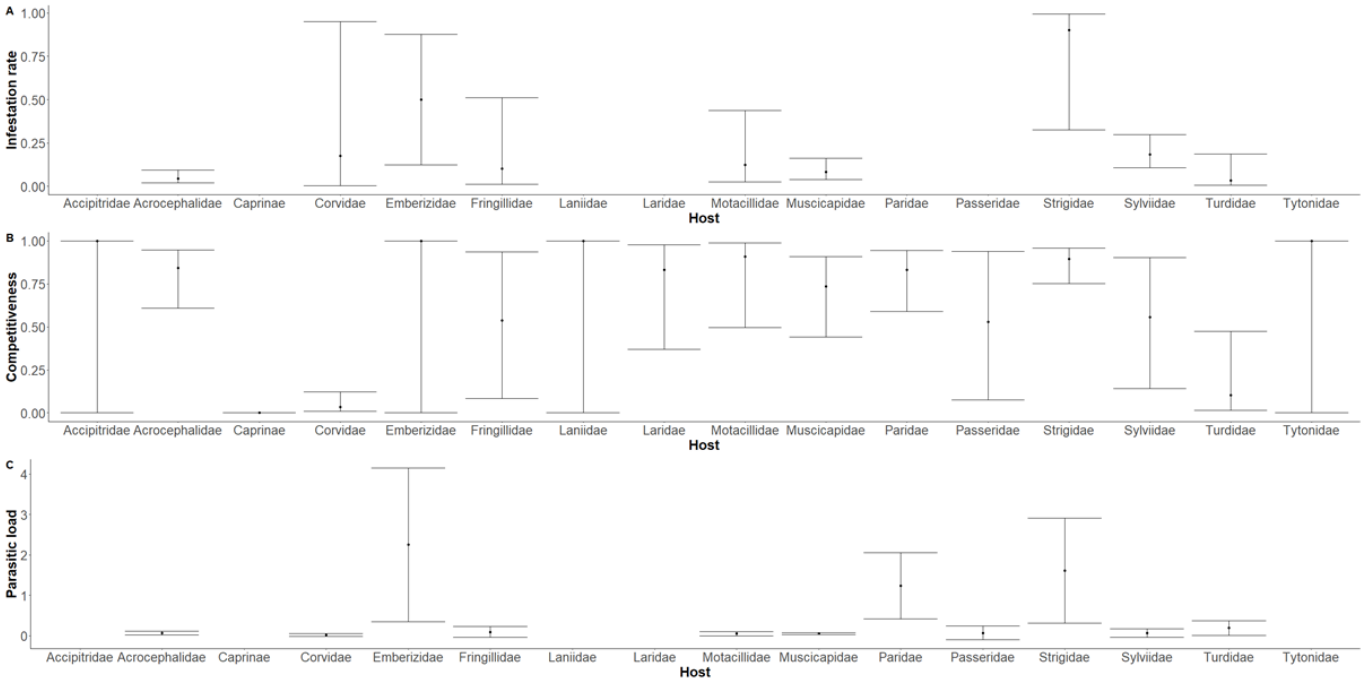


Figure 7 Effect of host species on (A) infestation rate (B) competitiveness (C) parasitic load for immature stages. Effect sizes are represented with their 95% confidence intervals.

Similarly, to the meta analysis for adult stages, we observed imprecise pooled effect size for most of the subgroups regardless of the chosen effect size (Figure 7).

Significant differences were found between host families for Competitiveness and parasitic load (Respectively, Q = 48.56, p-value <0.0001; Q = 35.20, p-value <0.0001).

High parasitic load estimates were found in the *Emberizidae*, *Strigidae*, *Paridae* families. High competitiveness estimates were found for most of the families except for the *Caprinae*, *Corvidae* and *Turdidae*.

No significant difference was found in the test for subgroup differences for infestation rate (Respectively Q = 11.81, p-value = 0.1598). High infestation rates were estimated for *Strigidae* and *Emberizidae* but their 95% confidence interval is wide.

Residual heterogeneity I^2 after accounting for host effect was 78.4%, 100%, 76.2% for infestation rate, competitiveness and parasitic load respectively.

Effect of landscape

Adult stage

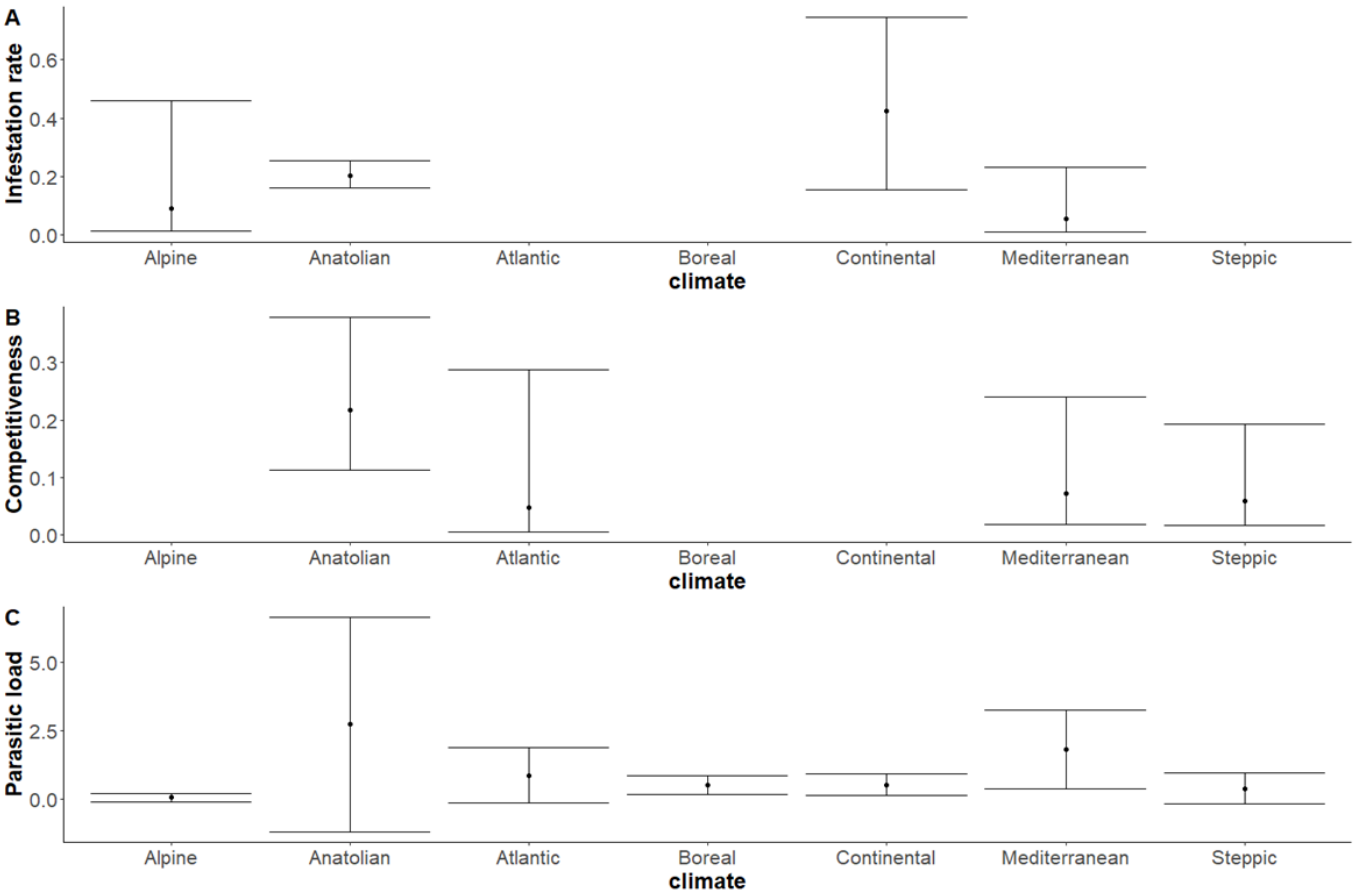


Figure 8 Effect of Climate type on (A) infestation rate (B) competitiveness (C) parasitic load for adult stages. Effect sizes are represented with their 95% confidence intervals.

We observed a wide 95% confidence interval in pooled value for each effect size (Figure 8). No significant difference was found between climates regardless of the calculated effect size (Q = 2.16, p-value = 0.5392; Q = 2.17, p-value = 0.5388; Q = 1.66, p-value = 0.9483 for infestation rate, competitiveness and parasitic load respectively). The highest estimation was found in Mediterranean and Anatolian climates, except for infestation rate which was higher in Anatolian and continental climates.

After accounting for climate, residual heterogeneity I^2 was 89.6%, 99.6%, 99.8% for infestation rate, competitiveness and parasitic load respectively.

Immature stages

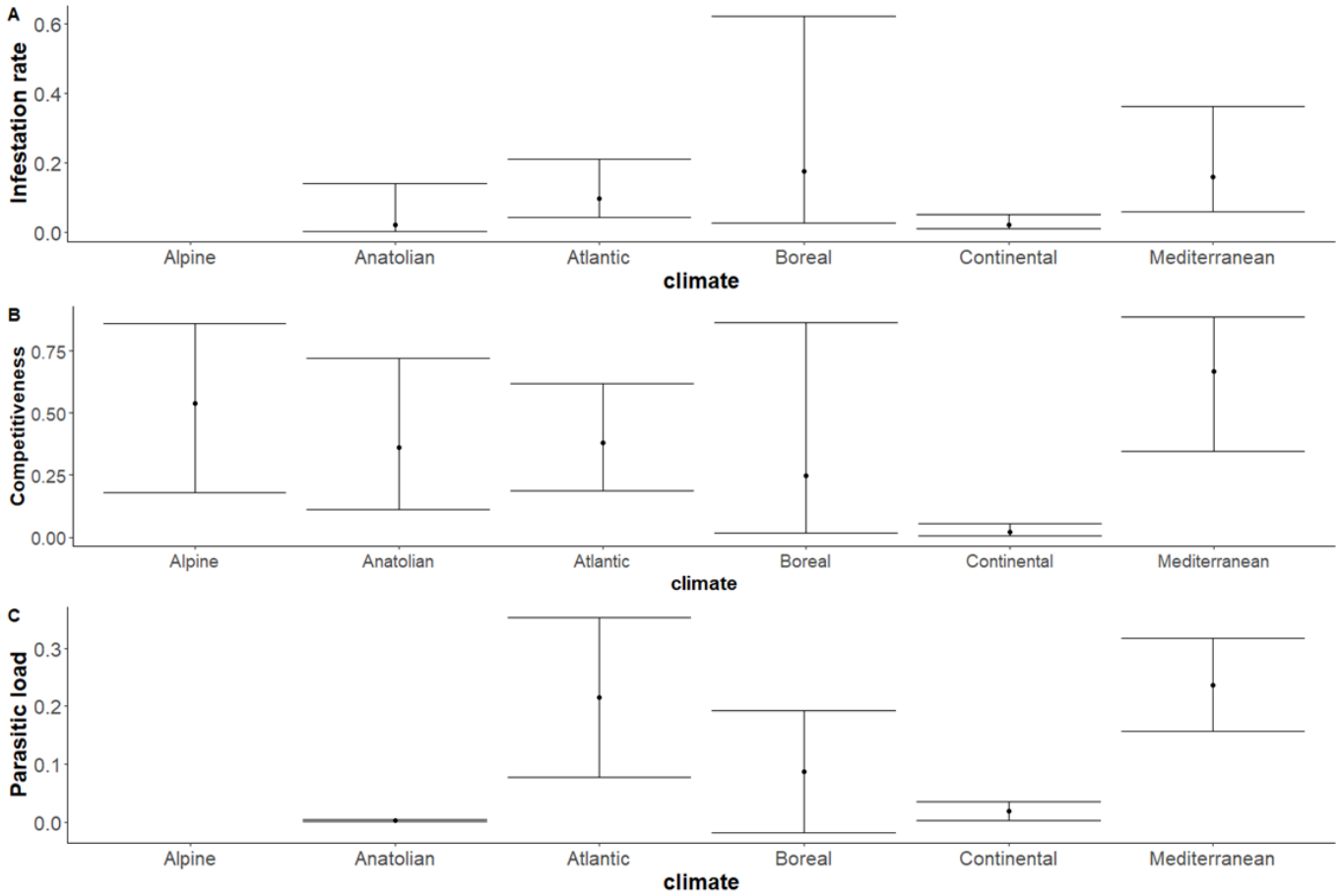


Figure 9 Effect of Climate type on (A) infestation rate (B) competitiveness (C) parasitic load for immature stages. Effect sizes are represented with their 95% confidence intervals. We observe a wide 95% confidence interval in pooled value for each effect size (Figure 9).

Significant differences were found between climates for infestation rate and parasitic load (Q = 11.90, p-value = 0.0181; Q = 53.85, p-value < 0.001 respectively). The highest parasitic load was found in Mediterranean and Atlantic climates, while the highest infestation rate was found in Mediterranean climate. After accounting for climate, residual heterogeneity I^2 was 71.4%, 89.8%, 71.0% for infestation rate, competitiveness and parasitic load, respectively.

Effect of habitat suitability

Adult stage

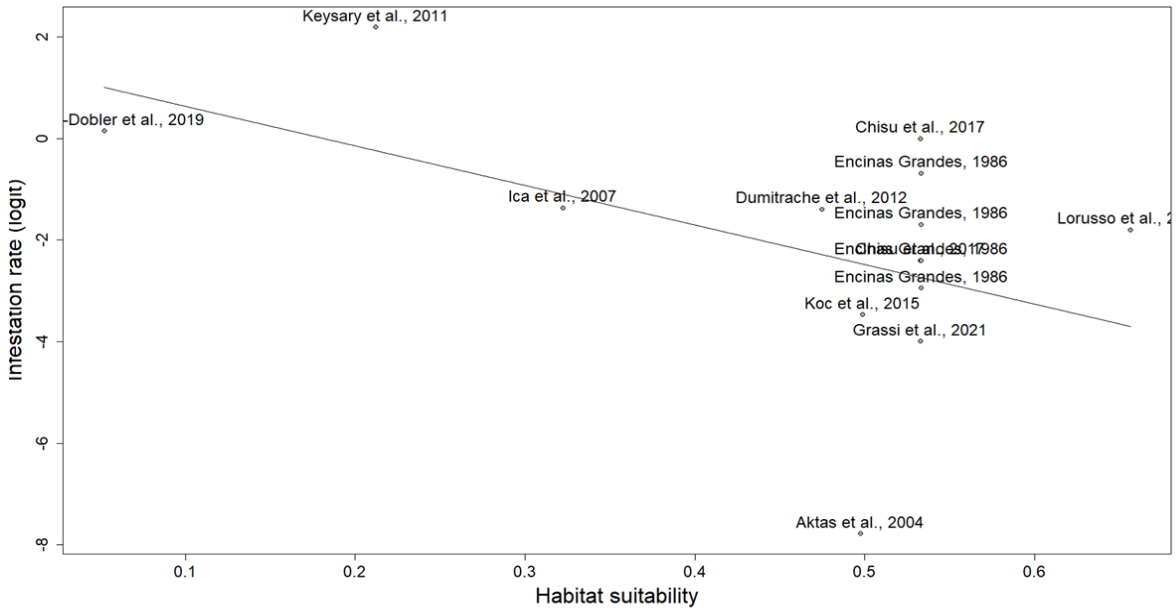


Figure 10 Infestation rate in relation to habitat suitability in the adult stage.

The residual heterogeneity I^2 after accounting for suitability was 94.8%, 99.90, 100% for infestation rate, competitiveness and parasitic load respectively. The suitability of the habitat showed a negative association with adult's tick infestation rate (Figure 10) (QM = 4.4590, p-value = 0.0347). No effect of suitability was found for competitiveness and parasitic load (Supplementary 13; Supplementary 14) (Respectively, QM = 0.6070, p-value = 0.4359; QM = 0.5186, p-value = 0.4714).

Immature stages

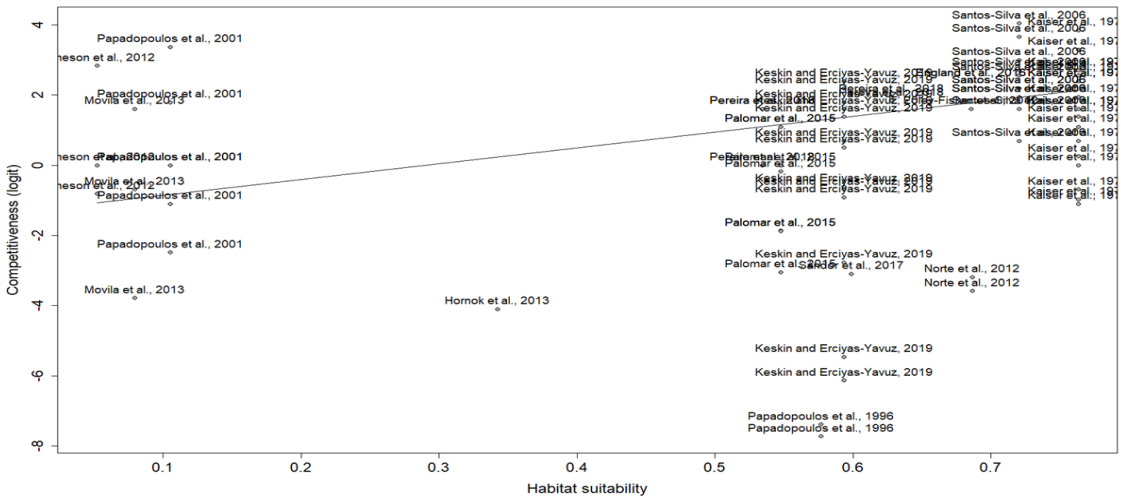


Figure 11 Competitiveness in relation to habitat suitability in the immature stage.

The residual heterogeneity I^2 after accounting for suitability was 84.14%, 94.40% and 99.58 % for infestation rate, competitiveness and parasitic load respectively. No significant relationship was found for infestation rate and parasitic load (Supplementary 15; Supplementary S16) (Respectively, QM = 0.9870, p-value = 0.3205; QM = 0.7473, p-value = 0.3873). Habitat suitability had a positive association with immatures competitiveness (Figure 11) (QM = 5.38, p-value = 0.0204).

Discussion

A better understanding of the interactions between ticks and their hosts is essential for establishing methods of control of tick populations and the spread of a tick-borne disease. This study used meta-analysis and meta-regressions to explore and analyze tick-host interactions within the genus *Hyalomma* with a focus on *H. marginatum*. Most of the references retrieved from scientific databases had been published between 2004 and 2021, reflecting the increasing burden of ticks and tick-borne diseases in Europe due to climate change and modifications of land use. Moreover, most of the publications referred to regions where CCHF, and subsequently its vector occurs frequently such as Turkey, Mediterranean Islands, the Balkans and Central Europe.

H. marginatum is the most widely cited tick among the twelve *Hyalomma* species identified from the literature as potential European tick vectors. This high citation record can be explained by the fact that it is the main vector of CCHF virus in many countries where the disease is endemic such as Turkey (Bente *et al.* 2013). Moreover, *H. marginatum* is also the tick species for which the largest number of host species is reported. Nevertheless, it cannot be concluded that *H. marginatum* is the most generalist tick of its genus. Indeed, a correlation was observed between the number of citations (i.e. sampling effort) and the number of host species reported. This correlation has also been observed by other authors in the context of compiling data from the published literature to assess the link between specificity and sampling effort (Klompen *et al.*, 1996). Noticeably in this correlation, *H. rufipes* appears as an outlier, with a number of citations nearly 5 times lower than for *H. marginatum* but with 2/3 of the number of hosts, suggesting its generalist character.

As expected, a strong heterogeneity among pooled effect sizes was found in the meta-analysis for all outcomes. Furthermore, as observed in previous systematic reviews, fewer infested species have been reported for adult stages than for immature stages (Nava and Guglielmone, 2013). This supports the hypothesis that immature stages are more generalist than adult stages due to the need of the latter to gorge on morphologically larger size hosts.

For tick adult stages, a significant effect of the host species on the proportion of *H. marginatum* among the ticks infesting a host (i.e. competiveness) was detected. The effects of the host species on the proportion of examined hosts infested by *H. marginatum* (i.e. the infestation rate) and on the average number of *H. marginatum* infesting the examined hosts (i.e. the parasitic load) were not significant. This can be explained by the limited number of exploitable records retrieved from the literature for these parasitism effect sizes resulting in wide 95% confidence intervals for their mean estimations in each host species. Nevertheless, higher estimates of these effect sizes were obtained for horses and *Cervidae* than for *Caprinae*, wild boars, hares and, to a lesser extent, cattle. The estimations obtained

for *Cervidae* must be considered with caution because the number of publications reporting values of effect sizes was low. In addition, in one of the publications, *H. marginatum* could be confused with *H. lusitanicum* and misclassified. Aside from the estimations for *Cervidae*, the results obtained are consistent with one study where horses were more often and severely infected than cattle, wild boars and domestic *Caprinae* from the same area in Corsica (Grech-Angelini *et al.* 2016).

Concerning immature tick stages, significant variation among host families was detected for the infection rate and the parasite load with high mean estimations in the cases of *Strigidae* and *Emberizidae* for both effect sizes and high mean estimation for parasite load only in the case of *Paridae*. The *Emberizidae* is a small family of passerine birds which feed frequently on the ground, thus favoring contact with *H. marginatum*. On the other hand, high estimates of parasitism effect sizes were not expected for *Strigidae* and *Paridae* as species belonging to these families do not typically spend a large part of their time on the ground. However, the estimations obtained for these two families were not particularly robust as the number of effect size records and their corresponding sample sizes were both low.

Besides record numbers and sample size issues, considering family level when investigating variations in parasitism effect sizes may generate a certain within-group heterogeneity as species belonging to the same zoological family may differ in their ecology and consequently in their availability and/or suitability as hosts for *H. marginatum*. Indeed, a strong intra-family heterogeneity translated into a large 95% confidence interval around the estimate, has been observed with large differences in infestation rate or parasite load depending on the species. For example, reported infestation rates values in the *Muscicapidae* family, ranged between 0.001 and 1.00. This high heterogeneity can be partially attributed to interspecific differences within the family. Indeed, *Muscicapidae* encompasses a large diversity of very different species: *Oenanthe finschii*, for instance, is a ground feeding small migratory insectivorous bird found in dry open habitats in Mediterranean climates on both, breeding and wintering areas. On the other hand, *Ficedula parva*, an eastern European breeder wintering in Asia found in old deciduous or mixed woodland up to 1200 m above sea level, is often standing on the tops of large trees and only occasionally, it comes down to the ground to hunt. The mean of reported infestation rate is 0.79 and 0.003 for *Oenanthe finschii* and *Ficedula parva*, respectively. This high difference could be expected considering the availability of these different species as hosts for *H. marginatum* given their habitat and their behavior. Indeed, under the hypothesis that immature stages of *H. marginatum* are generalist parasites of small vertebrates, we would expect parasitism effect sizes to vary among potential host species, mainly as a result of their availability as hosts, which is influenced by their behavior and habitat.

A consistent finding in the meta-analysis presented here is the large heterogeneity in the effect sizes of parasitism that remain after accounting for host species or host family effects. This suggests that other variables are more important in explaining variation in *H. marginatum* infestation rate, competitiveness and parasitic load. In this regard, a substantial amount of heterogeneity was explained by the climate variable for immature stages with highest estimations obtained for the Mediterranean climate, supporting the results from previous studies on the drivers of the geographical distribution of *H. marginatum* (Bah et al 2022). Likewise, a positive relationship was found between immature *H. marginatum* tick competitiveness on hosts and environment suitability as derived from a statistical model of *H. marginatum* distribution fitted to *H. marginatum* presence-only data. These results support

the hypothesis that climatic factor is more critical to the completion of *H. marginatum* immature stages than the composition of the potential host community (Cumming 2002; Estrada-Peña *et al.* 2020; Nava and Guglielmone 2013).

In contrast, in the analyses presented here, neither climate nor environmental suitability contributed to explaining heterogeneity in parasitism effect sizes for the adult stage except for the infestation rate that surprisingly showed a weak negative correlation with the environmental suitability index.

The failure to detect significant relationships between parasitism effect sizes and environmental factors could arise from the fact that the different sampling sites integrated into our analysis, were geographically located with poor precision. Therefore, we would recommend that future studies reporting infestation levels for any tick species provide precise geographical location, the dates of the surveys, the number of examined animals, the number of infested animals, and the number of ticks collected.

Another important limitation of our study in identifying the relative influence of host species and environmental conditions, is the limited number of records on the effect size of parasitism retrieved from the literature for most of the potential host species or families. For any one of the later, this implies that the range of environmental conditions under which the effect size of parasitism has been recorded is restricted. We hypothesize that the large heterogeneity in effect size values detected in most of the host species, is related to environmental variability. In addition, we suspect this heterogeneity can have several consequences: the first one is that within-species or family-mean estimates of effect size are not very robust (they are imprecise and could be biased) (Borenstein *et al.*, 2021). The second consequence is the potential confounding effects of environmental conditions and host species or family.

In order to better describe the tick-host relationship of *H. marginatum* using a meta-analysis approach, more records of parasitism effect size would be required for each potential host species or family. Moreover, in order to avoid confounding effects, such records should ideally originate from areas with contrasted environmental conditions. In this context, surveys where ticks were recorded on several host species in the same area (ideally all the potential host species found in the area) at the same time of year are particularly useful for investigating the empirical variation of infestation levels among different hosts species. This type of study could contribute to build meta-analysis, in cases where the considered effect size reflects the pair-wise differences between host species in parasitism measures (e.g. odd-ratios of infestation rates). Using this type of approach would be much more efficient for addressing variation in infestation measures among host species than controlling for the potential confounding effect of the environment, since each record considered in the meta-analysis would reflect a difference in an infestation measure obtained from at least two different host species under the exact same environmental conditions.

Finally, we would like to highlight the importance of assessing the host community present locally in order to determine the risk of pathogens transmission. In this regard, our study suggests that *H. marginatum* is a generalist tick whose distribution depends primarily on environmental conditions such as climate and habitat. Its trophic relationships will therefore primarily be determined by the hosts that become available in its immediate environment. Therefore, the circulation of the pathogen will depend

on the number of hosts available and whether they are good replicators of the virus or amplifiers of the tick population (Bernard *et al*. 2022; Occhibove *et al*. 2022).

Bibliography

Apanaskevich, D. A., 2004: [Host-parasite relationships of the genus Hyalomma Koch, 1844 (Acari, Ixodidae) and their connection with microevolutionary process]. *Parazitologiia* **38**, 515–523.

Apanaskevich, Dmitry A, J. Oliver, D. Sonenshine, and R. Roe, 2013: Life cycles and natural history of ticks. *Biology of ticks* **1**, 59–73.

Bah, M.T., V. Grosbois, F. Stachurski, F. Muñoz, M. Duhayon, I. Rakotoarivony, A. Appelgren, C. Calloix, L. Noguera, T. Mouillaud, C. Andary, R. Lancelot, K. Huber, C. Garros, A. Leblond, and L. Vial, 2022: The Crimean-Congo haemorrhagic fever tick vector Hyalomma marginatum in the south of France: Modelling its distribution and determination of factors influencing its establishment in a newly invaded area. *Transboundary and Emerging Diseases* **69**, e2351–e2365, DOI: *10.1111/tbed.14578*.

Bente, D.A., N.L. Forrester, D.M. Watts, A.J. McAuley, C.A. Whitehouse, and M. Bray, 2013: Crimean-Congo hemorrhagic fever: History, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral Research* **100**, 159–189, DOI: *10.1016/j.antiviral.2013.07.006*.

Bernard, C., P. Holzmuller, M.T. Bah, M. Bastien, B. Combes, F. Jori, V. Grosbois, and L. Vial, 2022: Systematic Review on Crimean–Congo Hemorrhagic Fever Enzootic Cycle and Factors Favoring Virus Transmission: Special Focus on France, an Apparently Free-Disease Area in Europe. *Frontiers in Veterinary Science* **9**.

Borenstein, M., L.V. Hedges, J.P. Higgins, and H.R. Rothstein, 2021: Introduction to Meta-Analysis. John Wiley & Sons.

Bown, K.J., X. Lambin, G.R. Telford, N.H. Ogden, S. Telfer, Z. Woldehiwet, and R.J. Birtles, 2008: Relative Importance of Ixodes ricinus and Ixodes trianguliceps as Vectors for Anaplasma phagocytophilum and Babesia microti in Field Vole (Microtus agrestis) Populations. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 7118–7125, DOI: *10.1128/AEM.00625-08*.

Cochran, W.G., 1954: The Combination of Estimates from Different Experiments. *Biometrics* **10**, 101–129, DOI: *10.2307/3001666*.

Cotton, M.J., and C.H.S. Watts, 1967: The ecology of the tick Ixodes trianguliceps Birula (Arachnida; Acarina; Ixodoidea). *Parasitology* **57**, 525–531, DOI: *10.1017/S0031182000072401*.

Cumming, G.S., 2002: Comparing Climate and Vegetation as Limiting Factors for Species Ranges of African Ticks. *Ecology* **83**, 255–268, DOI: *10.1890/0012-9658(2002)083[0255:CCAVAL]2.0.CO;2*.

Dietrich, M., E. Lobato, T. Boulinier, and K.D. McCoy, 2014: An experimental test of host specialization in a ubiquitous polar ectoparasite: a role for adaptation? *Journal of Animal Ecology* **83**, 576–587, DOI: *10.1111/1365-2656.12170*.

Espinaze, M.P.A., E. Hellard, I.G. Horak, and G.S. Cumming, 2016: Analysis of large new South African dataset using two host-specificity indices shows generalism in both adult and larval ticks of mammals. *Parasitology* **143**, 366–373, DOI: *10.1017/S0031182015001730*.

Esser, H.J., J.E. Foley, F. Bongers, E.A. Herre, M.J. Miller, H.H.T. Prins, and P.A. Jansen, 2016: Host body size and the diversity of tick assemblages on Neotropical vertebrates. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* **5**, 295–304, DOI: *10.1016/j.ijppaw.2016.10.001*.

Esser, H.J., E.A. Herre, N. Blüthgen, J.R. Loaiza, S.E. Bermúdez, and P.A. Jansen, 2016: Host specificity in a diverse Neotropical tick community: an assessment using quantitative network analysis and host phylogeny. *Parasites & Vectors* **9**, 372, DOI: *10.1186/s13071-016-1655-6*.

Estrada-Peña, A., N. Alexander, and G.R.W. Wint, 2016: Perspectives on modelling the distribution of ticks for large areas: so far so good? *Parasites Vectors* **9**, 179, DOI: *10.1186/s13071-016-1474-9*.

Estrada-Peña, A., A.D. Mihalca, and T.N. Petney, 2018: Ticks of Europe and North Africa: A Guide to Species Identification. Springer.

Estrada-Peña, A., S. Nava, E. Tarragona, J. de la Fuente, and A.A. Guglielmone, 2020: A community approach to the Neotropical ticks-hosts interactions. *Sci Rep* **10**, 9269, DOI: *10.1038/s41598-020-66400-3*.

Fecchio, A., T.F. Martins, J.A. Bell, G.M. De La Torre, J.B. Pinho, J.D. Weckstein, Vasyl.V. Tkach, M.B. Labruna, and R.I. Dias, 2020: Low host specificity and lack of parasite avoidance by immature ticks in Brazilian birds. *Parasitol Res* **119**, 2039–2045, DOI: *10.1007/s00436-020-06698-0*.

Fedorov, D.S., and S.A. Leonovich, 2021: Analysis of Findings and Host-Parasite Relations of the Tick Ixodes trianguliceps Birula, 1895 (Ixodidae, Ixodinae) in Northwestern Russia and in Neighboring European Countries. *Entmol. Rev.* **101**, 725–732, DOI: *10.1134/S0013873821050122*.

Gray, J.S., H. Dautel, A. Estrada-Peña, O. Kahl, and E. Lindgren, 2009: Effects of Climate Change on Ticks and Tick-Borne Diseases in Europe. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* **2009**, e593232, DOI: *10.1155/2009/593232*.

Grech-Angelini, S., F. Stachurski, R. Lancelot, J. Boissier, J.-F. Allienne, S. Marco, O. Maestrini, and G. Uilenberg, 2016: Ticks (Acari: Ixodidae) infesting cattle and some other domestic and wild hosts on the French Mediterranean island of Corsica. *Parasites Vectors* **9**, 582, DOI: *10.1186/s13071-016-1876-8*.

Guégan, J.F., and C.R. Kennedy, 1996: Parasite richness/sampling effort/host range: the fancy three-piece jigsaw puzzle. *Parasitol Today* **12**, 367–369, DOI: *10.1016/0169-4758(96)10054-5*.

Higgins, J.P.T., and S.G. Thompson, 2002: Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Statistics in Medicine* **21**, 1539–1558, DOI: *10.1002/sim.1186*.

Higgins, J.P.T., S.G. Thompson, J.J. Deeks, and D.G. Altman, 2003: Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ* **327**, 557–560, DOI: *10.1136/bmj.327.7414.557*.

Hoogstraal, H., and A. Aeschlimann, 1982: Tick-host specificity. *Bulletin de la société entomologique suisse* **55**, 5–32.

Klompen, J., W. Black, J. Keirans, and J. Oliver Jr, 1996: Evolution of ticks. *Annual review of entomology* **41**, 141–161.

Krasnov, B.R., M. Stanko, and S. Morand, 2007: Host community structure and infestation by ixodid ticks: repeatability, dilution effect and ecological specialization. *Oecologia* **154**, 185–194, DOI: *10.1007/s00442-007-0824-x*.

Levi, T., F. Keesing, R.D. Holt, M. Barfield, and R.S. Ostfeld, 2016: Quantifying dilution and amplification in a community of hosts for tick-borne pathogens. *Ecological Applications* **26**, 484–498, DOI: *10.1890/15-0122*.

Lymbery, A.J., 1989: Host specificity, host range and host preference. *Parasitology Today* **5**, 298, DOI: *10.1016/0169-4758(89)90021-5*.

Mccoy, K., E. Léger, and M. Dietrich, 2013: Host specialization in ticks and transmission of tick-borne diseases: a review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **3**.

Mücher, C.A., J.A. Klijn, D.M. Wascher, and J.H.J. Schaminée, 2010: A new European Landscape Classification (LANMAP): A transparent, flexible and user-oriented methodology to distinguish landscapes. *Ecological Indicators* **10**, 87–103, DOI: *10.1016/j.ecolind.2009.03.018*.

Mysterud, A., R. Byrkjeland, L. Qviller, and H. Viljugrein, 2015: The generalist tick Ixodes ricinus and the specialist tick Ixodes trianguliceps on shrews and rodents in a northern

forest ecosystem– a role of body size even among small hosts. *Parasites & Vectors* **8**, 639, DOI: *10.1186/s13071-015-1258-7*.

Nava, S., and A.A. Guglielmone, 2013: A meta-analysis of host specificity in Neotropical hard ticks (Acari: Ixodidae). *Bulletin of Entomological Research* **103**, 216–224, DOI: *10.1017/S0007485312000557*.

Occhibove, F., K. Kenobi, M. Swain, and C. Risley, 2022: An eco-epidemiological modeling approach to investigate dilution effect in two different tick-borne pathosystems. *Ecological Applications* **32**, e2550, DOI: *10.1002/eap.2550*.

Ostfeld, R.S., and F. Keesing, 2000a: Biodiversity series: The function of biodiversity in the ecology of vector-borne zoonotic diseases. *Can. J. Zool.* **78**, 2061–2078, DOI: *10.1139/z00-172*.

Ostfeld, R.S., and F. Keesing, 2000b: Biodiversity and Disease Risk: the Case of Lyme Disease. *Conservation Biology* **14**, 722–728, DOI: *10.1046/j.1523-1739.2000.99014.x*.

Ouzzani, M., H. Hammady, Z. Fedorowicz, and A. Elmagarmid, 2016: Rayyan—a web and mobile app for systematic reviews. *Syst Rev* **5**, 210, DOI: *10.1186/s13643-016-0384-4*.

Page, M.J., J.E. McKenzie, P.M. Bossuyt, I. Boutron, T.C. Hoffmann, C.D. Mulrow, L. Shamseer, J.M. Tetzlaff, E.A. Akl, S.E. Brennan, R. Chou, J. Glanville, J.M. Grimshaw, A. Hróbjartsson, M.M. Lalu, T. Li, E.W. Loder, E. Mayo-Wilson, S. McDonald, L.A. McGuinness, L.A. Stewart, J. Thomas, A.C. Tricco, V.A. Welch, P. Whiting, and D. Moher, 2021: The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *Systematic Reviews* **10**, 89, DOI: *10.1186/s13643-021-01626-4*.

Paule, R.C., and J. Mandel, 1982: Consensus Values and Weighting Factors. *J Res Natl Bur Stand (1977)* **87**, 377–385, DOI: *10.6028/jres.087.022*.

Poulin, R., and D. Mouillot, 2003: Parasite specialization from a phylogenetic perspective: a new index of host specificity. *Parasitology* **126**, 473–480, DOI: *10.1017/S0031182003002993*.

Rohde, K., 1980: Host specificity indices of parasites and their application. *Experientia* **36**, 1369–1371, DOI: *10.1007/BF01960103*.

Sándor, A.D., A. Corduneanu, Á. Péter, A.D. Mihalca, L. Barti, I. Csősz, K. Szőke, and S. Hornok, 2019: Bats and ticks: host selection and seasonality of bat-specialist ticks in eastern Europe. *Parasites Vectors* **12**, 605, DOI: *10.1186/s13071-019-3861-5*.

Schmidt, K.A., and R.S. Ostfeld, 2001: Biodiversity and the Dilution Effect in Disease Ecology. *Ecology* **82**, 609–619, DOI: *10.1890/0012-9658(2001)082[0609:BATDEI]2.0.CO;2*.

Schwarzer, G., 2022 (11. July): meta: General Package for Meta-Analysis. .

Senior, A.M., C.E. Grueber, T. Kamiya, M. Lagisz, K. O'Dwyer, E.S.A. Santos, and S. Nakagawa, 2016: Heterogeneity in ecological and evolutionary meta-analyses: its magnitude and implications. *Ecology* **97**, 3293–3299, DOI: *10.1002/ecy.1591*.

Široký, P., K.J. Petrželková, M. Kamler, A.D. Mihalca, and D. Modrý, 2006: Hyalomma aegyptium as dominant tick in tortoises of the genus Testudo in Balkan countries, with notes on its host preferences. *Exp Appl Acarol* **40**, 279–290, DOI: *10.1007/s10493-006-9036-z*.

Spengler, J.R., and A. Estrada-Peña, 2018: Host preferences support the prominent role of Hyalomma ticks in the ecology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **12**, e0006248, DOI: *10.1371/journal.pntd.0006248*.

Stewart, G., 2010: Meta-analysis in applied ecology. *Biology Letters* **6**, 78–81, DOI: *10.1098/rsbl.2009.0546*.

Swei, A., R.S. Ostfeld, R.S. Lane, and C.J. Briggs, 2011: Impact of the experimental removal of lizards on Lyme disease risk. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **278**, 2970–2978, DOI: *10.1098/rspb.2010.2402*.

Viechtbauer, W., 2005: Bias and Efficiency of Meta-Analytic Variance Estimators in the Random-Effects Model. *Journal of Educational and Behavioral Statistics* **30**, 261–293, DOI: *10.3102/10769986030003261*.

Viechtbauer, W., 2022 (21. April): metafor: Meta-Analysis Package for R.

Article 2 :

Systematic Review on Crimean–Congo Hemorrhagic Fever Enzootic Cycle and Factors Favoring Virus Transmission: Special Focus on France, an Apparently Free-Disease Area in Europe

Célia Bernard[1,2,3*], Philippe Holzmuller[1,2], Madiou Thierno Bah[1,2], Matthieu Bastien [3], Benoit Combes[3], Ferran Jori[1,2], Vladimir Grosbois[1,2] and Laurence Vial[1,2]

1 CIRAD, UMR ASTRE, Montpellier, France,
2 ASTRE, Univ Montpellier, CIRAD, INRAE, Montpellier, France,
3 French Establishment for Fighting Zoonoses (ELIZ), Malzéville, France

Citation: Bernard C, Holzmuller P, Bah MT, Bastien M, Combes B, Jori F, Grosbois V and Vial L (2022) Systematic Review on Crimean–Congo Hemorrhagic Fever Enzootic Cycle and Factors Favoring Virus Transmission: Special Focus on France, an Apparently Free-Disease Area in Europe. Front. Vet. Sci. 9:932304. doi: 10.3389/fvets.2022.932304

frontiers | Frontiers in Veterinary Science

SYSTEMATIC REVIEW
published: 19 July 2022
doi: 10.3389/fvets.2022.932304

Systematic Review on Crimean–Congo Hemorrhagic Fever Enzootic Cycle and Factors Favoring Virus Transmission: Special Focus on France, an Apparently Free-Disease Area in Europe

Célia Bernard[1,2,3]*, *Philippe Holzmuller*[1,2], *Madiou Thierno Bah*[1,2], *Matthieu Bastien*[3], *Benoit Combes*[3], *Ferran Jori*[1,2], *Vladimir Grosbois*[1,2] and *Laurence Vial*[1,2]

[1] CIRAD, UMR ASTRE, Montpellier, France, [2] ASTRE, Univ Montpellier, CIRAD, INRAE, Montpellier, France, [3] French Establishment for Fighting Zoonoses (ELIZ), Malzéville, France

OPEN ACCESS

Edited by:
Sara Moutailler,
Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES), France

Reviewed by:
Francisco Ruiz-Fons,
Spanish National Research Council (CSIC), Spain
Ali Mirazimi,
Karolinska University Hospital, Sweden

***Correspondence:**
Célia Bernard
celia.bernard@cirad.fr

Specialty section:
This article was submitted to Veterinary Infectious Diseases, a section of the journal Frontiers in Veterinary Science

Received: 29 April 2022
Accepted: 15 June 2022
Published: 19 July 2022

Citation:
Bernard C, Holzmuller P, Bah MT, Bastien M, Combes B, Jori F, Grosbois V and Vial L (2022) Systematic Review on Crimean–Congo Hemorrhagic Fever Enzootic Cycle and Factors Favoring Virus Transmission: Special Focus on France, an Apparently Free-Disease Area in Europe. Front. Vet. Sci. 9:932304. doi: 10.3389/fvets.2022.932304

Crimean–Congo hemorrhagic fever (CCHF) is a viral zoonotic disease resulting in hemorrhagic syndrome in humans. Its causative agent is naturally transmitted by ticks to non-human vertebrate hosts within an enzootic sylvatic cycle. Ticks are considered biological vectors, as well as reservoirs for CCHF virus (CCHFV), as they are able to maintain the virus for several months or even years and to transmit CCHFV to other ticks. Although animals are not symptomatic, some of them can sufficiently replicate the virus, becoming a source of infection for ticks as well as humans through direct contact with contaminated body fluids. The recent emergence of CCHF in Spain indicates that tick–human interaction rates promoting virus transmission are changing and lead to the emergence of CCHF. In other European countries such as France, the presence of one of its main tick vectors and the detection of antibodies targeting CCHFV in animals, at least in Corsica and in the absence of human cases, suggest that CCHFV could be spreading silently. In this review, we study the CCHFV epidemiological cycle as hypothesized in the French local context and select the most likely parameters that may influence virus transmission among tick vectors and non-human vertebrate hosts. For this, a total of 1,035 articles dating from 1957 to 2021 were selected for data extraction. This study made it possible to identify the tick species that seem to be the best candidate vectors of CCHFV in France, but also to highlight the importance of the abundance and composition of local host communities on vectors' infection prevalence. Regarding the presumed transmission cycle involving *Hyalomma marginatum*, as it might exist in France, at least in Corsica, it is assumed that tick vectors are still weakly infected and the probability of disease emergence in humans remains low. The likelihood of factors that may modify this equilibrium is discussed.

Keywords: CCHF, *Hyalomma* tick vectors, vertebrate host communities, viral transmission cycle, France

INTRODUCTION

Arboviruses are viruses transmitted by arthropod vectors to different hosts, which are susceptible to cause diseases threatening public and animal health (1). One of these viruses is considered as high risk of emergence in Europe is the Crimean–Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV).

Crimean–Congo Hemorrhagic Fever was first described in 1944–1945 (2) in Russian soldiers and peasants who were exposed to ticks in Crimea and in 1956 in Congo (3). This zoonotic disease remains asymptomatic in animals while causing an acute and potentially fatal infection in humans (4). After an incubation period of 2–9 days, fever, progressive lassitude, and behavioral changes can occur, but these symptoms may be mild and go unnoticed or misdiagnosed. In the second phase, some patients (10–40%) develop intracranial and intraperitoneal bleeding, as well as a petechial rash, leading to coma or death (5, 6). Infection in humans usually occurs *via* a tick bite or from contact with contaminated body fluids of infected livestock or human patients (7). In nature, CCHFV is transmitted through an enzootic tick–non-human vertebrate–tick sylvatic cycle. Ticks, mostly of the *Hyalomma* genus, are considered biological vectors, as well as reservoirs for CCHFV, as they are able to maintain the virus for several months or even years. They are also able to transmit CCHFV from one generation to the next (vertical transmission), from one development stage to the other (transovarial transmission), from males to females during copulation (sexual transmission), or from one tick to other ticks feeding closely on a same non-viremic host (cofeeding) (8). Although vertebrate animals are not symptomatic, they can replicate the virus and be a source of infection for both ticks and humans (9), at least during viremia, which is described to last no more than 7–10 days (10). Currently, CCHF is recognized as endemic or potentially endemic in multiple areas of the world throughout Africa, Asia, and Middle East (11). In Europe and in the Mediterranean Basin, it is considered as an emerging disease, with epidemics observed in Turkey since 2002, regular cases in some countries of Balkans, and occasional autochthonous cases recently reported in Spain, as well as one case in Greece (12, 13). As CCHFV has been described in multiple tick and vertebrate species, it circulates on several continents according to the distribution of its tick vectors and different sedentary or migratory vertebrate hosts, which are amplifiers of virus and/or ticks (14). With global warming, the distribution of vectors is changing, potentially modifying CCHFV circulation and increasing the risk of virus emergence in new geographic areas (15). Indeed, the establishment of one of the CCHFV tick vectors, *Hyalomma marginatum*, was recently demonstrated in the mainland of France while it has been already reported in southern Corsica island for 50 years (16, 17). Given the human cases of CCHF recently reported in Spain and the regular exchanges of bulls, horses, and wildlife with this neighboring country, CCHFV circulation was questioned in France.

In areas potentially at risk for CCHFV introduction and circulation, serological surveillance of sensitive domestic animals is a rational system for the early detection of virus circulation (18, 19). It is even more relevant that a large panel of vertebrate animals can host *Hyalomma* ticks and CCHFV, and can develop CCHFV antibodies persisting for several years (10, 20). Sheep are known to sufficiently replicate CCHFV and to show high seroprevalence in some countries (21, 22), and are therefore considered suitable sentinels for monitoring and detecting outbreaks/circulation in new and non-endemic areas (18). Cattle are one of the common domestic hosts for the adult stage of *Hyalomma* ticks and could also be appropriate sentinels for determining at-risk areas for CCHFV circulation since they produce antibodies upon first contact with the virus (23). In France, a preliminary serological study on cattle and small ruminants was carried out in Corsica between 2014 and 2016. Seropositivity of 13% in cattle and 2–3% in small ruminants was observed and the presence of specific neutralizing antibodies was confirmed by plaque reduction neutralization test (23). This suggests that CCHFV already circulates in Corsica, although CCHFV remains to be isolated and genotyped to confirm its presence and phylogenetic origin. This study also highlighted a spatial hotspot of high seroprevalence in the northwest of the island (23). No data is currently available for mainland France but investigations are in progress to determine the epidemiological status of the continental France. Assuming that CCHFV is already circulating at least in Corsica but maybe more widely on the French territory, as any animals must be infected by CCHFV to develop an immune response, the seroprevalence measured can reflect the rate of CCHFV infection in animal vertebrates and can be a proxy for estimating the intensity of CCHFV transmission among the enzootic natural cycle.

To maximize early detection of arbovirus emergence in non-endemic areas, surveillance efforts should target areas where circulation is most likely, and thus identifying these potentially emerging hotspots is a major challenge (24). Determining ecological conditions leading to more or less transmission improves our ability to predict risks (24). Regarding CCHF, there have been several epidemiological and modeling studies examining such factors influencing virus introduction and spread, at the regional or country level (15, 25–29). However, the epidemiology of CCHF is complex and territory dependent, with host–vector–pathogen interactions that can vary from one socio–ecosystem to another (30). If CCHFV is confirmed to circulate in France (apart from ongoing serological and entomological investigation), questions arise regarding the factors responsible for its local amplification and diffusion, to explain the observed occurrence of CCHFV antibodies in ruminants without any reported human cases.

This study aims to review the literature in its entirety concerning CCHF, to revisit the CCHF epidemiological cycle as hypothesized in the French local context and select the most likely parameters that may influence the virus transmission among tick vectors and non-human vertebrate hosts. Hypotheses are also made on other possible not-yet-confirmed factors that may be specific to our French socio–ecosystem.

AVAILABLE BIBLIOGRAPHIC RESOURCES

In 2018, Dereli and Kayser conducted an overview of scientific publications in the CCHF field, to identify new research strategies to control the virus. For our current review, we used the same search databases that produced the highest number of resources in the previous survey, namely, PubMed, Scopus and ScienceDirect, and the same keywords "Crimean–Congo Hemorrhagic Fever" under different orthographies. We framed our searches from the 1940s, the first mentions of articles dedicated to CCHF according to the previous study, to December 2021. By combining the three databases, we obtained 1994 articles (**Figure 1**), with an average of 123 new articles per year since 2015, the last date included in the previous study. This is in line with the reported increase of publications since the massive CCHF human outbreaks in Turkey in 2002, with an average of 100 articles per year since 2011 (31).

Bibliographic resources for which the content was neither available in French nor in English (i.e., written in Russian, Serbian, Turkish, or Japanese) were excluded, as we could not easily exploit them. We also removed articles that did not deal directly with CCHF, as no data could be extracted. Original studies, reviews, and some reports were included in this study. There was also one book dedicated to CCHF that was considered as a sum of several publications. In the end, a total of 1,035 resources, dating from 1947 to 2021, were selected for data extraction and were sorted based on their titles, abstracts, and keywords into a few categories (**Figure 1**). For the purpose of our review, we directly removed those related to CCHFV virology number = 226, CCHF diagnosis and detection methods (32), CCHF symptoms in the form of case reports number = 134, as well as CCHF control and treatment (33) as they were not useful for the data extraction. As we focused on the enzootic circulation of CCHFV, we also removed the articles studying introduction pathways (15). For our analysis, we kept general reviews on many aspects of CCHF (34) and those related to CCHF epidemiology number = 323, the role of ticks as CCHFV vectors (35), and the role of vertebrate animals in CCHF (13). Concerning epidemiology, we considered any studies related to the frequency and distribution of CCHFV in humans and animals, as well as the factors influencing its occurrence. This included the large number of serological surveys conducted in many different countries, serving as the basis for the first investigations on CCHF.

Publications serving specifically as information resources for data extraction were referenced as **Supplementary Material**. For each topic, we first considered the existing reviews as they were expected to synthetize all available data prior to their publication date. To assess their exhaustiveness and relevance, we systematically referred to part of the original cited articles, and then completed or updated data with lacking or newly published information. Regarding tick vectors and vertebrate hosts that should be considered in the CCHFV transmission cycle, we considered the historical review on the epidemiology of CCHF in Asia, Europe, and Africa published by Hoogstraal (14), as well as two specific articles, written by Turell (36) and Nalca and Whitehouse (37). More recently, Gargili et al. (8) provided an update of field and laboratory studies that have contributed to demonstrate vector competence and capacity of different tick species and genera for CCHFV. At the same time, Spengler et al. (10) proposed a systematic review of experimental CCHFV infection studies, assessing the role of many vertebrate animals in CCHFV amplification and transmission.

Some data not directly extracted from our reviewing process were also necessary to complete our understanding on tick vectors and vertebrate hosts in the French context. Concerning host preferences of potential CCHFV tick vectors, especially those of *H. marginatum*, we did not review all the available literature, as it was not the main purpose of our study. However, we made preliminary estimations based on the relative mean infestation rates and the relative proportions of ticks per host species, using what we considered to be reference articles, providing comparable and relevant data for our geographical zone of interest. For host densities in France and the capacity of hosts to spread, we used census and predictive maps available from the French Biodiversity Office (OFB), data archives from major European projects working on the prediction of vector-borne disease transmission (EDENext and Pale–Blue), as well as specific scientific articles. All the related publications or sources of these "extra" data were referenced in **Supplementary Material**.

ASSESSMENT OF FRENCH TICK VECTORS AND RESERVOIRS OF CCHFV

Although the involvement of *Hyalomma* ticks as main vectors and reservoirs of CCHFV is confirmed and quite well-documented, the role of the other tick genera in CCHFV replication and transmission is not as clear. The epidemiological status of ticks is all the more difficult to assess, as detecting the viral genome, or even isolating the virus in a tick does not mean that the latter is able to maintain and replicate the virus, especially when collected directly on viremic animals from which it ingested the virus during a blood meal. In addition, being a competent vector for a virus (i.e., the ability to become infected during a blood meal, replicate the virus, and transmit the virus to another host through a subsequent bite) does not necessarily result in efficient transmission in nature because several other parameters, such as vector density and longevity, feeding rate, and trophic preferences of vectors, as well as the infectious period and susceptibility of vertebrate hosts, are involved in what is called vectorial capacity (36). As a consequence, replication of CCHFV in the tick throughout its development cycle but also the additional tick-to-tick transmission pathways (which characterize the ability of ticks to serve as reservoirs) are crucial in CCHF epidemiology. This is especially true when the likelihood of being infected from viremic animal hosts is low and when it is necessary for ticks to maintain CCHFV infection during periods such as winter in temperate regions such as France that limit active virus transmission (8). In addition, differential tick biology may impact their vector and reservoir roles. In Ixodid ticks, there is one larval, one nymphal, and one adult stage, which each require a bloodmeal from vertebrate hosts before molting or reproducing (38). Ticks known or suspected as CCHFV vectors

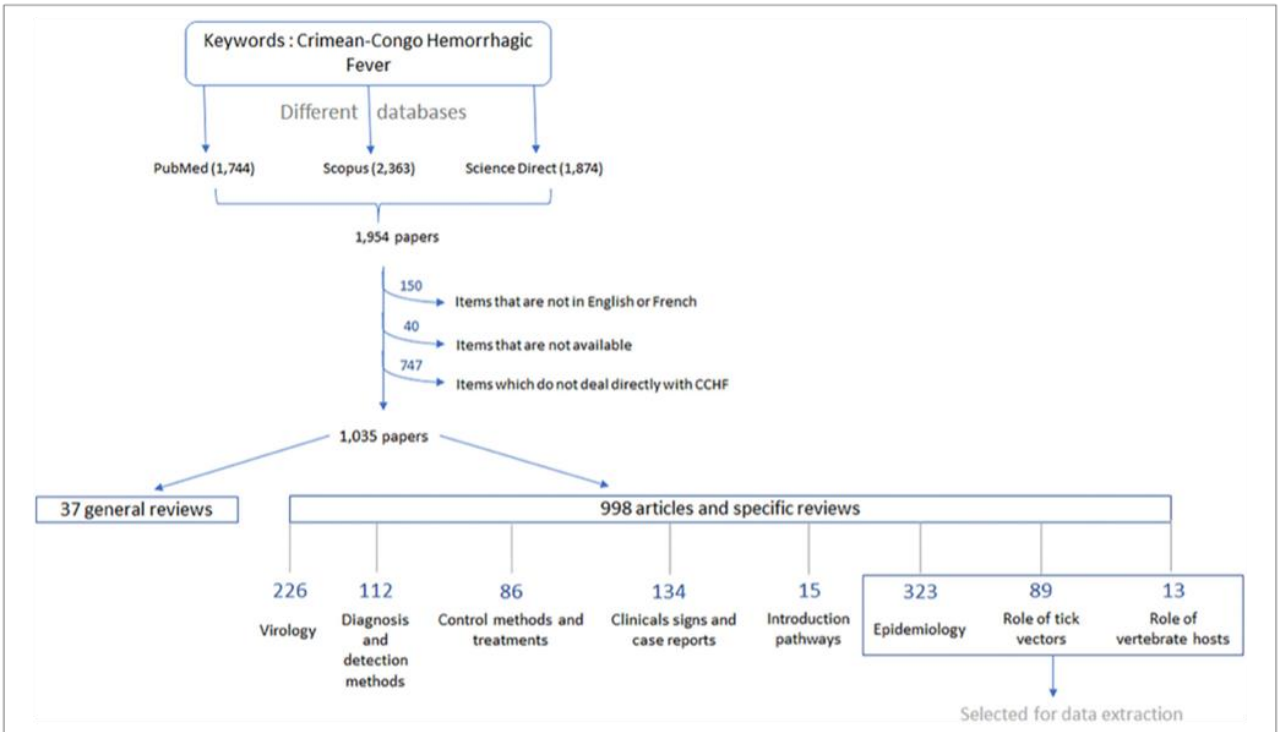


FIGURE 1 | Workflow summarizing the steps taken to classify the different articles in the literature and to select the categories of interest for our study.

can range from one-host species (where each parasitic stage feeds on the same host) to three-host species (where each parasitic stage feeds on different hosts), which impact the opportunity for a tick to become infected from a viremic animal and retransmit the virus during its lifetime (14, 39).

Tick species that have been found to be infected at least once by CCHFV and are present in France are indicated in **Table 1** and related references are indicated in **Supplementary Data 1**. According to several criteria shown in **Table 1**, we were able to rank ticks according to their presupposed importance as CCHFV vectors within the enzootic transmission cycle in the French local context. We did not consider tick species that are not present in France, although they could be introduced punctually (e.g., through migratory birds for *H. rufipes* or imported ruminant for *H. anatolicum*) (16, 40), and may be responsible for CCHFV introduction, they cannot establish viable populations allowing persistent local virus transmission. Concerning *H. lusitanicum*, it apparently likely transmits CCHFV in Spain. Indeed, CCHFV has been mostly detected in such tick species compared to *H. marginatum*, and red deer on which adult stages likely engorge have been found 3 times more CCHFV seropositive than cattle in Spanish areas where CCHFV circulates locally (34). Unfortunately, there is still no experimental data to confirm its vector competence. In France, *H. lusitanicum* was historically reported in south–western part of the territory, as well as in Camargue at the east (20, 41). For the last 60 years, no new reports of *H. lusitanicum* has been referenced. Based on many field observations recorded in an extensive synthesis, Morel (42) described this species as clearly dependent on rabbit populations although Valcárcel (43) recently modulated this assertion. With the quasi-extinction of wild rabbits in France due to myxomatosis epizooties in the 1950s (44), we consequently assumed that this tick species has disappeared from the territory or at least drastically declined to remain anecdotal through residual small populations. Without any updates of presence, we thus decided not to include this tick species into **Table 1**, although keeping in mind its epidemiological importance elsewhere.

As a result, and based on our bibliographic review, it appears that *H. marginatum* seems to be the best "candidate" for the transmission of CCHFV in France. It succeeded experimentally in all pathways of transmission, and is often associated with CCHF human cases in other endemic countries, and presents bioecological features favoring engorgement on potential CCHFV amplifier hosts at immature and adult stages. Its abundance in Corsica and its recent establishment in the southern mainland (16, 43, 45), in addition with the detection of CCHFV antibodies in Corsican cattle (23), make it a very suitable vector with the risk of CCHFV circulation. *Dermacentor marginatus*, which is autochthonous in the South of France (41, 46) and which adults stages can also engorge on CCHFV amplifier hosts would also be a suitable vector. Although its ability for transovarial transmission from infected females to subsequent generations was demonstrated once in the 1970s (47), no further assays have been conducted since this date and

TABLE 1 | Candidate tick species as vectors and/or reservoirs of CCHFV in France.

Tick species	CCHFV isolation or RNA detection	Experimental evidence of vectorial competence	Vertebrate animal hosts	Number of hosts
Rhipicephalus bursa	Virus isolation in Crimea, Bulgaria, Greece, Armenia, Azerbaijan, Turkmenia Antigens and RNA detection, in Greece, Armenia Albania, Kosovo, Turkey (ticks on hosts)	No data	Mostly on cattle, sheep, goat at any development stage Original hosts: roe deer, wild goat, mouflon	Three-host tick
Hyalomma scupense	Virus isolation in Azerbaijan, Uzbekistan, Kazakhstan, Tadzhikistan (ticks on hosts) RNA detection in Turkey, Pakistan, Iran (ticks on hosts) RNA detection in non-engorged ticks collected in the field in China	One assay where no infection in eggs hatched by infected females (data not available)	Mostly on cattle at any development stage	One-host tick
Haemaphysalis punctata	Virus isolation in Crimea and Moldavia	No data	Immature stage mostly on birds and hares Adults mostly on cattle, sheep, goat, and birds Reports on humans	Three-host tick
*R. sanguineus sensu lato**,** — *Rh. sanguineus*	Viral isolation in Crimea and Bulgaria, RNA detection in Iran, Turkey (but not regular although other *Hyalomma* ticks are positive), antigens detected in Pakistan	Infection of salivary glands detected once by IFAT	Mostly on dogs at any development stage Reports on humans	Three-host tick
*R. sanguineus sensu lato**,** — *Rh. turanicus*	Virus isolation in Kirgizia and RNA detection in Turkey, Armenia, Greece, Iran, Bulgaria (ticks on hosts)	No data	Immature stage mostly on rodents and insectivores Adults mainly on cattle, goat, sheep	Two- and three-host tick
Ixodes ricinus	Virus isolation in Moldavia and Crimea RNA detection in Bulgaria, Kosovo (ticks on hosts)	No data	Immatures stage mostly on rodents and birds Adults mainly on cattle and roe deer Reports on humans	Three-host tick
Dermacentor marginatus	RNA detection in Turkey, Spain, Greece (ticks on hosts)	Some larvae, nymphs and adults obtained from eggs hatched by infected females were infected and able to maintain and transmit CCHFV	Immature stage mostly on insectivores, rodents and small carnivores Adults mostly on cattle, horse, sheep, wild boar, deer In Russia, concordance between *D. marginatus* bite and CCHF human cases	Three-host tick
Hyalomma marginatum	Antigens and RNA detected in Spain, Russia, Turkey, Iran, Bulgaria, Armenia, Pakistan and Kosovo (ticks on hosts) RNA detection in non-engorged ticks collected in the field in Turkey	Larvae, nymphs and adults obtained from eggs hatched by infected females were all infected and able to maintain and transmit CCHFV Very high rates of infection through infectious blood meal (up to 100%) Higher rates of transovarial transmission than other tick species	Immature stage mainly on lagomorphs and birds Adults mainly on horse, cattle, wild boar, less on sheep and goat Concordance between *H. marginatum* bite and CCHF human cases in Turkey	Two-host tick

**Rhipicephalus rossicus: good vector but not present in France.*
***The specific identification of Rh. sanguineus vs. Rh. turanicus is difficult and thus preferred to keep the group Rh. sanguineus sensu lato.*
Colors were used to assess their role, with green, orange and red representing weak, middle, and high evidence of vector competence and/or vectorial capacity, respectively.

evidence of CCHFV genome detection in ticks remains scarce compared to *H. marginatum*. In the east of the Mediterranean Basin, where CCHFV circulates at high levels, several studies did not detect CCHFV in *D. marginatus*, whereas the virus was amplified from other tick species collected on the same animals (48–51). However, *D. marginatus* ticks feeding on wild boars

were found to be infected in CCHF endemic areas in Spain, without determining the infectious status of animals (34). In Turkey, some specimens collected from wild boars were also found infected but this was attributed to their association with *Hyalomma* infected ticks on the same host (52). Therefore, further investigation is required to definitively confirm or deny *D. marginatus* as a CCHFV vector; however, its role as a secondary vector cannot be excluded at this stage. Apart from these two species, no other ticks present in France presented virological or bioecological criteria to be considered as potential CCHFV vectors. Historically, *Hyalomma scupense* has been described in western France and has been recently identified in Corsica (45, 53). Although it could be assumed to be a competent as any *Hyalomma* tick species, the fact that it infests the same cattle host throughout its development cycle (one-host tick) and cannot transmit CCHFV to its progeny (14) does not make this tick species a suitable vector of CCHFV. Regarding *Rh. bursa*, Gargili et al. (8) suggested that its bioecology could be favorable for CCHFV transmission but in absence of the relevant virological evidence, we did not consider this species as a suitable vector, despite its abundance in the South of France (17, 41, 54).

ASSESSMENT OF FRENCH VERTEBRATE ANIMALS AS HOSTS OF CCHFV AND TICK VECTORS

We considered that vertebrate animals can contribute to CCHFV transmission within the natural enzootic cycle through three major abilities: (i) by sufficiently replicating CCHFV to be able to infect tick vectors during a blood meal, (ii) by amplifying tick vector populations and providing sufficient naive ticks to be infected, and (iii) by introducing CCHFV or CCHFV-infected or uninfected tick vectors in free geographical areas through long-distance movements. Regarding the community of vertebrate hosts to be considered in a potential CCHFV enzootic cycle in the French context, we decided to focus on those infested by *H. marginatum* as it was identified to be the best current "candidate" vector to locally transmit CCHFV.

Although data are scarce (**Supplementary Data 2**), the monitoring of virus kinetics in experimentally infected animals is the only relevant method to assess the role of vertebrate hosts as CCHFV amplifiers. Conversely, many field investigations are based on serological tests measuring antibodies targeting CCHFV as this is very useful for early detection and provides relevant information on transmission levels (14). However, some animal species, such as horses, can develop the same levels of antibodies as any other animals although their viremia remains insufficient to allow the infection of new naive ticks to maintain transmission through blood feeding (10). As a consequence, we consider that serology likely reflects the exposure of vertebrate hosts to CCHFV-infected tick vectors, depending either on tick bite frequency or on tick infection rate. As stated above, cattle and small ruminants have often been reported as the most sensitive indicators of low-level CCHFV circulation, as they seem to be highly infested by CCHFV tick vectors (55, 56). However, this can vary according to the geographical region and the local CCHFV transmission cycle, and does not predict their ability as CCHFV amplifiers. Another limiting aspect of using field serological surveys is the difficulty to compare results, as many different techniques with distinct sensitivity and specificity were used over the years and between studies (55). As viremia is short in any animal, reports of direct CCHFV detection in field animal samples remain too scarce to be used to assess their relative role in CCHFV replication. The few symptoms in animals, when present, are not informative on their role as CCHFV amplifiers since they do not seem to be correlated with viremia (10).

Regarding the ability of vertebrate animals to amplify tick vector populations, this mainly depends on host preferences and abundance of tick vectors, but also on the availability of vertebrate hosts for ticks. Theories are very extensive on host preferences in ticks, ranging from the necessity for ticks to be specialist and co-evolve with their hosts, and consequently their environment (57), to their likely adaptation to abiotic conditions and specific habitats resulting in host preferences (58). This question remains difficult to assess, as experimental studies providing practical measures are few to none. For *H. marginatum*, only one study tested the efficiency of its development cycle according to its blood feeding on three different small vertebrates (mice, guinea pig, and white rabbit), which led to a laboratory animal model useful for CCHFV transmission experiments (59). Two field surveys were also conducted to test the effect of host species and host abundances on population densities of *H. aegyptium* and *H. lusitanicum* (60, 61). For the latter, it was shown that the experimental removal of hares from the environment was significantly correlated to a lower abundance of *H. lusitanicum*, although it did not prevent its presence. Based on such partial results, field data reporting infestation rates of several host species by *H. marginatum* or relative proportions of *H. marginatum* among all tick species found on different hosts may be a proxy to assess host preferences of this tick species. These studies are numerous, at least for common domestic hosts such as cattle, small ruminants, and horses (**Supplementary Data 2**). However, scientists have usually investigated ticks from livestock because of its economic importance and the confirmed side effects of ticks and tick-borne infections on productivity. The same phenomenon can be observed on emblematic wild vertebrates and this may bias comparisons between vertebrate hosts. For *H. marginatum*, only one study is available on its presence on a striped field mouse (*Apodemus agrarius*) in Bulgaria (62). However, because rodents are frequently examined for ticks as they are reservoirs for Lyme Borreliosis and ick-borne encephalitis causative agents, we can assume that *H. marginatum* never, or extremely rarely, parasitizes rodents, as suggested by Hoogstraal (14). Another limitation of using field data on tick collections from hosts to assess host preferences is the apparent heterogeneity and incongruences between geographical regions, as it is observed for example for cattle and small ruminants in Romania compared to Turkey, and even within Turkey (52, 63, 64). This could be due to either distinct abilities of ecoclimatic zones to host *H. marginatum*, which may result in various tick densities, or distinct host communities available for this

"generalist" tick. This last case suggests that some ticks could adapt their host preferences according to local contexts and thus we should remain very cautious when interpreting tick data collection from the field.

Finally, to assess the role of hosts as spreaders of CCHFV or CCHFV tick vectors, the most important information is their capacity to move long distances, as well as the duration of tick attachment on the host for blood feeding. As many vertebrate animals show short CCHFV viremia, the probability of movement during viremia is very low; they are therefore more likely to spread ticks infected with CCHFV than to directly spread the virus *via* physical contacts with contaminated fluids. Hard ticks at all development stages, remain attached to their host during blood feeding for ∼10 days, until they become completely engorged (65). However, this duration may increase if the tick species in question reduces its free-living phases, like *H. marginatum* for which larval and nymphal stages engorge on the same small vertebrate for an average of 14–21 days without falling to the ground for larval molting (20, 59, 66). Although some authors do not support this assumption (10), this period largely covers the duration of Trans-Mediterranean bird migrations, known as major hosts for immature stages (67, 68). Additionally, the commercial trade of livestock may result in long-distance movements of ruminants, potentially infested by CCHFV-infected tick vectors, as their external parasitic status is not necessarily controlled for importation (69). While domestic animal trade is common between European countries, inter alia, from Spain where CCHFV is known to circulate among domestic ungulates, importation of livestock from non-European CCHF-endemic areas into Europe remains rare (70). Occasional wildlife trans locations, such as the reintroduction of the Spanish ibex (*Capra hircus*) into the transboundary Pyrenees mountains, remain infrequent and highly monitored; however, this can be considered a practice at-risk since CCHFV antibodies have been detected in Spanish Ibex (71). In addition, the international trade of game species for the hunting industry can represent a potential source of introduction into new territories (72). Wild rabbit and hare imports have been reported from Spain since the 1970s to restock French hunting reserves and palliate the disappearance of native species due to myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease (73, 74).

Based on the different criteria discussed above, **Tables 2A,B**, presents an assessment of the different vertebrate hosts of *H. marginatum* for their role in CCHFV circulation within the natural enzootic transmission cycle (reference articles are indicated in **Supplementary Data 2**). Voluntarily, we did not include exotic species, present in zoos or other public reception structures as their presence remains sufficiently rare to not significantly change transmission levels. This is the case for camels that are assumed to be good CCHFV amplifiers and can be parasitized by *Hyalomma* ticks (75), ostriches (*Struthio camelus*), African starling (*Lamprotornis* sp.), and red-beaked hornbills (*Tockus erythrorynchus*), the latter three representing the only bird species able to develop sufficient CCHFV viremia to infect ticks (76, 77). In the case of ostriches, they were also able to contaminate humans by direct contact in African slaughterhouses (78). However, such animals are not naturally and endemically found in France.

Considering **Tables 2A,B**, lagomorphs, especially hares, seem to play a major role as CCHFV amplifiers, as well as being a preferred host with birds for immature stages of *H. marginatum*. According to Hoogstraal (14), hares would be the vertebrate hosts mainly involved in the circulation of CCHFV in endemic areas. French populations of hares are stable but very heterogeneous depending on the habitat (74, 79), while wild rabbits remain rare despite repopulation actions. Likewise, some families of birds, especially those feeding on the ground and that can be easily infested by hunting ticks such as *H. marginatum*, are reported as important hosts for immature stages. In Cyprus and Spain, resident blackbirds and rooks showed very high infestation rates (80, 81). Their role as tick population amplifiers is all the more reason to consider these birds, as they are largely distributed in many diverse habitats of France. In addition, some representatives of these families are migrating birds connecting African and European CCHF endemic areas to France and their ability for spreading ticks potentially infected by CCHFV should be pointed out. Indeed, the recent tick collections conducted in the South of France have reported the presence of immature stages of *H. marginatum*, but also *H. rufipes* that is only established in Africa, from migrating Eurasian Blackcaps (*Sylvia atricapilla*), dunnocks (*Prunella modularis*), and European robins (*Erithacus rubecula*) (16). However, most birds are considered refractory to CCHFV and may not act as CCHFV sources (10). Considering adult stages of *H. marginatum*, the main hosts are domestic ungulates, especially horses and to a lesser extent cattle. Horses are frequent in the South of France whereas cattle farming remains rare, except in Corsica where *H. marginatum* is highly abundant (17) and in humid pastures of Camargue for bull rearing where *H. marginatum* cannot develop (82). Both species may be involved in long-distance tick spreading due to international trade, national seasonal transhumance, or even equestrian competitions. However, only cattle have been reported as good CCHFV amplifiers whereas horses cannot be sufficiently viremic to infect ticks (10). Sheep were also demonstrated to efficiently replicate CCHFV but they are very rarely infested by *H. marginatum*, at least in France (17). The role of wild ungulates remains partially unknown and deserves further investigation, although red deer (*Cervus elaphus*) has been reported to be an important host for the Spanish tick vector *H. lusitanicum* and are suspected to be efficient CCHFV amplifiers (34). However, this tick species is apparently absent from France and red deer populations are not abundant in the French area colonized by *H. marginatum* and seem to be exceptionally infested by this tick (34).

THE PRESUPPOSED CCHFV TRANSMISSION CYCLE IN FRANCE: IMPORTANCE OF TICK VECTORS AND VERTEBRATE HOST COMMUNITIES

Few articles describe the entire CCHFV transmission cycle (**Supplementary Data 3**). Those that exist are mostly dealing

TABLE 2 | Candidate vertebrate hosts of *H. marginatum* and CCHFV that are present in France.

	Species	CCHFV amplifier (source of infection for ticks)	Tick population enhancer (key host to obtain a viable tick population)	Tick carrier (source of ticks infected or not)
(A)				
Host of immatures	Hedgehog	Successful infection by inoculation, viremia (2–6 dpi) (4log), successful infection of ticks only for *Hemiechinus auritus* Not for *Erinaceus europaeus* that is present in France	Infestation (Hungary, Ukraine, Turkey, ex-USSR): IR: one report only (0.4%) RP: average of 4–5% [0.02–9] Density: From 4.4/km² in rural areas to 36.5/km² in urban areas in France	Short-distance movements (0.5–3 km; home range of about 2 ha, up to 50 ha for some males)
	Lagomorphs	Hare (*Lepus saxatalis and L. europaeus*) Successful infection by tick bite and inoculation, high viremia (1–15 dpi) (4–5log), successful infection of ticks, no symptom In Turkey, CCHFV genome detected in 7% of hares Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) Successful infection by inoculation, sufficient viremia to infect ticks, no symptom	Hare Infestation (Spain, Italy, Ukraine, Turkey): IR: 5–14% to 100% RP: 57–100% (according to season and zone) In Crimea and Balkans, hares highly infested but less than rooks Density: 15–20/km² (south of France) Rabbit Infestation (Portugal): IR:2%, RP:1% Density: 0,01/km² in France	Short-distance movements Hare: variable home range (20–140 ha) Rabbit: low home range (<10 ha) Imports of hares and rabbits from Spain
	Rodents	Only African rodents tested, which are not present in France In some species: successful infection through inoculation but too low viremia (1–4log) to infect ticks	Infestation of rodents and shrews is the exception, contrary to other tick species (ex-USSR) During the favorable season, only one report of a tick found on *A. agrarius* (Bulgaria) Variable according to species but high densities	Short-distance movements Variable according to species
	Birds	Majority of species develop no viremia (refractory): experimental infections failed on fowls, doves, and rooks. African partridge (*Numida meleagris*): successful infection through inoculation but viremia not easily detectable to assess their ability to infect ticks	Infestation (numerous reports in southern and northern Europe): IR is always low apart for some bird families that are ground-feeding (Muscicapidae, Turdidae-like blackbird, Corvidae like rook and magpie, Phasianidae like partridges, Strigidae like owls) (30–100%) Within these species, RP always high if favorable season Variable densities according to species For partridges, farms do not settle in areas where *H. marginatum* is present	Long-distance natural migrations for some species, different routes (trans-Sahara, intra-EU)
(B)				
Hosts of adults	Cattle	Successful infection through inoculation and tick bite, high viremia (4–6log) (2–8 dpi) sufficient to infect ticks, no symptoms except appetite loss and lethargy in some calves	Infestation: RP variable according to zone (5–10% to 73%) (south of France 22%) Low density in south of France (except Camargue)	Long-distance movements through trade (from Spain) and national transhumance
	Sheep	Successful infection through inoculation and tick bite, high viremia (4-6log) (2-10 dpi) sufficient to infect ticks, even on pre-immunized non-viremic sheep Mild symptoms (fever, liver and kidney dysfunctioning, abnormal cell count), antibodies transmitted to lamb during at least 2 months	Infestation: RP variable according to zone (0.03–0.05% to 82%) (south of France 4.4%) Variable densities, some intensive production in south-western France	Few importations and national transhumance
	Goat	No experimental data available	Infestation: RP variable according to zone (0% in south of France) Low density everywhere in France	Few importations
	Horse	Successful infection through inoculation, too low viremia to infect ticks, mild symptoms (fever, lethargy, inflammatory syndrome)	Infestation: High RP (42–78% at favorable season) Relatively high densities in France, especially Camargue	Long-distance movements through trade (from Spain and Italy), national transhumance equestrian competitions

(Continued)

TABLE 2 | Continued

Species	CCHFV amplifier (source of infection for ticks)	Tick population enhancer (key host to obtain a viable tick population)	Tick carrier (source of ticks infected or not)
Donkey	Successful infection through inoculation, too low viremia to infect ticks, no symptom	Anecdotal infestation Low densities in France	Short-distance movements
Wild boar	No experimental data available In Turkey, CCHFV genome detected in 8% wild boar tested In Spain, *D. marginatus* collected on wild boars are CCHFV positive	Infestation remains low (Italy, Spain, Portugal, France): IR: 2–8% and RP: 3–5% (except 69% in a report of Spain and 29% in Turkey) Very high densities in south of France (difficult to estimate)	Short-distance movements (<5–10 km; home range of 300–500 ha; up to 3,000 ha for males) Few and only illegal importations since 2018
Roe deer	No experimental data available	Only one proof of infestation in Israel (RP: 13%) Low densities in scrublands from south of France where *H. marginatum* is abundant	Short-distance movements (home range from 35 to 150 ha)
Red deer	No experimental data available In Spain, supposed to be good CCHFV amplifier as human cases occurred where red deer and *H. lusitanicum* are present. Red deer shows higher CCHFV seroprevalence (70%) than cattle (16%) in areas infested by infected *Hyalomma* ticks	Low infestation compared to *H. lusitanicum* that is the main ectoparasite of red deer in Spain (no information elsewhere) Low densities in France, concentrated in humid forest where *H. marginatum* is absent	Short-distance movements (home range from 800 to 3,000 ha)

IR, infestation rate of hosts by H. marginatum (number of hosts infested among hosts examined); RP, relative proportion of H. marginatum among other tick species infesting the same host species (number of H. marginatum among the whole amount of ticks infesting one-host species).
Their role as amplifiers of CCHFV, amplifiers of tick populations, and carriers of ticks infected or not with CCHFV is informed, with colors from green, orange to red for low, middle, and high evidence, respectively. A, Host of immature stages; B, Host of adult stages.

with mathematic modeling used to describe generic transmission cycles or surveys that focus on disease epidemiology in some endemic areas, mainly eastern ones. Other publications addressing CCHFV transmission pathways usually focus on one aspect of the viral cycle, such as the role of tick vectors, the status of vertebrate hosts or potential routes for virus transmission. Among the proposed cycles, generic ones that are deliberately simplified to model reality, cannot reflect the total diversity of tick species and vertebrate animals interacting in CCHFV transmission. For example, in West African Sahelian regions, *H. truncatum* has been considered to be the main vector of CCHFV for humans. However, some "helpers" may locally favor virus transmission and long-term persistence (39). As only 17% of CCHFV transovarial transmission and <1% of CCFV cofeeding is reported in *H. truncatum* (83), adult ticks may likely become infected at the immature stage through feeding on viremic lagomorphs. However, such small vertebrates are scarce in the region and cannot allow frequent infection in ticks. Fortunately, another tick *H. rufipes,* present at similar latitudes, was demonstrated as a possible vector of CCHFV, at least within the enzootic cycle; thanks to a large infestation of immature stages on the abundant red-beaked hornbill, the only bird able to amplify CCHFV and replace "traditional" lagomorph amplifiers (76). In southern Sudanese regions where *Hyalomma* ticks are scarce, *Amblyomma variegatum*, another tick with a large diversity of vertebrate hosts was also demonstrated to participate in CCHFV transmission. This tick species has a diversity of vertebrate hosts, including "traditional" and abundant cattle amplifiers, parasitized by each developmental stage of this tick species. Its anthropophilic behavior may also make it a good candidate for CCHFV transmission to humans (39). The above example clearly shows the risk of biased predictions when oversimplifying such complex virus epidemiological cycles or adapting previously described cycles to another geographical area, as tick and vertebrate host communities may differ and change the dynamics and levels of virus transmission. Regarding the recent emergence of CCHF in Spain, one could not have predicted that the virus would likely circulate within red deer living in forested areas and that the tick vector would be *H. lusitanicum*, rather than *H. marginatum*, the latter being more widely distributed within the country and commonly considered as the main CCHFV vector in southern Europe and northern Mediterranean countries (34, 84).

Considering the assessment of ticks and vertebrate hosts in CCHFV transmission detailed above, the pre-supposed enzootic CCHFV transmission cycle in France can be mapped as illustrated in **Figure 2**. In our state of knowledge on vector competence and French tick distribution, *H. marginatum* is considered the only "serious" local candidate for CCHFV transmission. As we hypothesized that *H. lusitanicum* may be absent or only present in residual populations on our territory, it seems unable to maintain a sustainable and perennial transmission of CCHFV. In the South of France, immature stages of *H. marginatum* may likely engorge on birds, which are much more numerous in the environment than lagomorphs, though both animal classes are considered preferred hosts. However, as birds are refractory to CCHFV, the probability for ticks to become infected at immature stages and the resulting ability

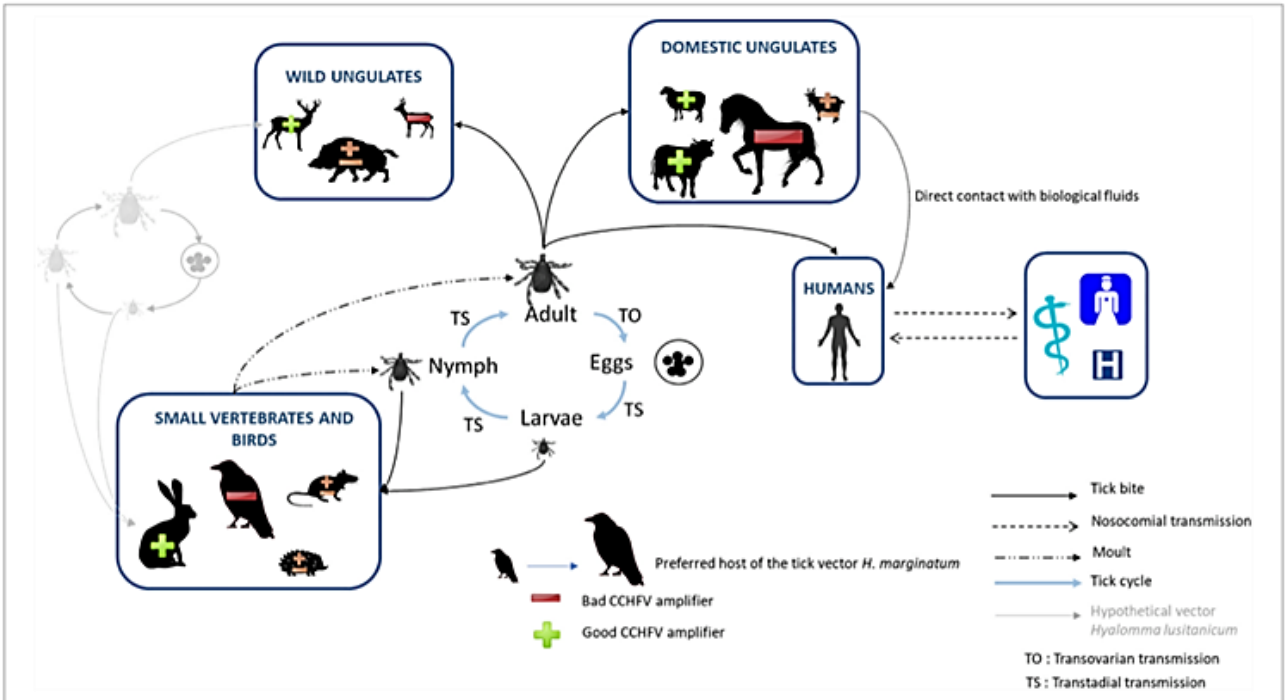


FIGURE 2 | Presumed enzootic transmission cycle of CCHFV in France, involving the candidate tick vector *H. marginatum* and its different vertebrate hosts. Animals are represented in different sizes according to relative host preferences of *H. marginatum*. The ability of these animals to replicate CCHFV is indicated by "+" for good CCHFV amplifiers and "–" for bad CCHFV amplifiers.

of emerging adults to further infect large ungulates through biting are low. This might be however modulated if cofeeding on birds may occur, but transmission rates using this pathway seem to remain low (85) and we have no specific data for *H. marginatum*. Moreover, adults of *H. marginatum* mainly parasitize horses, which are both the preferred hosts and also abundant in the south of France, but cannot develop sufficient viremia to infect ticks. Except if cofeeding may also occur on horses, their role for CCHFV transmission seems to be low to null. Blood feeding on confirmed good CCHFV amplifiers, such as cattle or sheep, remains infrequent or rare and therefore cannot strongly participate in increasing infection level in the tick vector. Regarding wild ungulates, as stated above, only red deer was assumed as good CCHFV amplifiers, although they remain quasi-absent from southern French areas where *H. marginatum* is established, and are considered unlikely hosts for this tick. Without any more information about the ability of other wild ungulates, especially wild boar, to participate in CCHFV replication or in the amplification of *Hyalomma* tick populations, their role cannot yet be fully considered. In the current state of our knowledge and our assumptions on CCHFV circulation in France, opportunities for *H. marginatum* ticks to become infected and to infect new animals would be rare, at any development stage, even if transovarial transmission and cofeeding are partially efficient. Therefore, the risk for humans to be contaminated through either tick bite or direct contact with animals' body fluids can currently be estimated as low. This prediction is based on the theoretical concept of the "dilution effect," developed by LoGiudice et al. (86) for Lyme disease and emphasizes the impact of host biodiversity and community composition of ecosystems on their functions. The authors identified "dilution hosts" as animals characterized by high tick burden, low reservoir competence, and high population density, as could be the case of horses and/or birds in the French context of CCHFV transmission. Therefore when the host community is less diverse and mostly composed by "dilution hosts," a "generalist" tick such as *H. marginatum* is likely to engorge on these hosts and show low infection prevalence (86). This could partially explain the detection of antibodies targeting CCHFV in French domestic ungulates, yet the lack of CCHFV detection in tick and the lack of CCHF human case reports, for example. However, we cannot omit other possible explanations, such as the existence of low virulent CCHFV strains resulting in particularly few (or no) hemorrhagic symptoms, or CCHFV-like viral strains that may be able to cause immune cross-reaction in domestic ungulates but would be too divergent to be detected in ticks using specific CCHFV molecular amplification methods. In addition, although we estimate the risk of CCHF emergence in France as low considering its presumed local transmission cycle between animals and ticks, this situation is not static and is likely to change under climate and global changes, as observed in Spain (69).

FACTORS THAT MAY PROMOTE CCHFV ENZOOTIC TRANSMISSION IN FRANCE: INTRINSIC SENSITIVITY AND MODULATION OF EXPOSURE

In the literature, some articles do refer to risk factors involved in CCHFV transmission. Among the 58 articles referenced in our review as epidemiological studies investigating risk factors for the transmission of CCHFV, 34 looked at factors favoring human contamination (usually measured by the incidence of disease cases or the seroprevalence of CCHFV antibodies in humans) and 24 referred to biotic or abiotic factors impacting the natural circulation of CCHFV among vertebrate animals. Based on the latter publications, we were able to schematize the effects of the major factors cited, either on the exposure of vertebrate hosts to CCHFV tick vectors or the prevalence of CCHFV infection among tick vectors. We determined which factors have proximal or ultimate effects and interact together, and we only considered factors in **Figure 3** that could make sense within the local French context of CCHFV enzootic transmission.

Several studies conducted in Africa and Asia have shown that CCHF seroprevalence significantly increases with the animal age, either in cattle, small ruminants, and camels (33, 35, 87–97). This correlation was mainly attributed to an increasing probability of an animal to be exposed to infected tick vectors, contract CCHFV, and develop an immune response in relation with increasing age (33). Such an additive effect of age seems obvious as antibodies are assumed to persist for a long period in animals, up to several years (98). An additional potential age-linked relevant factor for exposure to CCHFV is variation in tick burden associated with body size, physiological age-linked variations, e.g., immune competence, and behavioral patterns (99). However, other parameters may explain such patterns, such as diverse breeding practices. In Sudan, when assessing age as a risk factor for cattle CCHFV seroprevalence, the authors showed that calves started to get infected after the age of 2 years, as this was when animals were released to pasture and therefore became exposed to infected ticks and subsequently to CCHFV infection (35, 89). In Mauritania, this hypothesis of overexposure in older animals has been also proposed to explain an apparent higher seroprevalence in camels than in cattle or small ruminants, as camels are bred for longer periods of time (95). Although we agree that the age effect may be a confounding factor with animal species, most ticks present host preferences that could result in differential infestation rates according to the vertebrate species. In addition, tick vectors and host species may be not homogeneously distributed, with some vertebrates being over-represented locally and therefore more infested by the tick vectors in question, present in the same zone. The investigation of both age and species effects in a serological survey conducted on small ruminants from Pakistan confirmed significant differences of CCHFV seroprevalence between goat and sheep that were not due to age, as both species are typically kept no more than a few years before slaughtering (88).

Regarding other intrinsic host-related risk factors, significant differences in CCHFV seroprevalence were also detected on several occasions depending on the breed of the animals. In Sudanese cattle, the highest rates of infection have been observed in cross breeds, compared to endogenous ones, as they seemed to be very susceptible to tick infestation (89). Relative resistance of native breeds to tick infestation has often been described in relation to distinct patterns of transmission for several tick-borne pathogens (100–102). However, concerning CCHFV, significant differences were not systematically highlighted, even within the same country (35), and in some cases the tendency was just the opposite (88). The effect of breeds was also reported in camels from Sudan but each breed was actually representative of one locality of the country and may likely reflect local tick exposure (90). In cattle, differences in husbandry practices may also occur depending on the breed, as these breeds do not show the same aptitudes for production. Production systems have their own organizational constraints. Consequently, practices related to animal movements can modify the exposure of animals to CCHFV tick vectors, as discussed in the following. This aspect should be investigated especially in French areas, like Corsica, where traditional cattle breeds are maintained and, suckling farming with free-ranging has become popular and widespread. Moreover, parasite resistance may be influenced by cross-breeding—between the Corsican breed and Limousine, Aubrac, or Charolaise—that some farmers do to increase their production compared to the Corsican breed adapted to harsh scrublands and supposed to be more resistant to ticks.

Apart from the breed, sex as another host-related risk factor was also tested in several studies and its effect was mostly insignificant on the CCHFV seroprevalence (88, 91, 96, 97). The only exception was for cattle from Malawi and South Africa where CCHFV seroprevalence was higher in females than males, although this cannot be attributed to intrinsic resistance in females against ticks (33, 87). In these countries, female cattle are raised mainly for breeding purposes, meaning they spend more time in the fields grazing and therefore have an increased risk of tick exposure. Males, however, are used for drought power and stay away from pastures longer than females and young cattle, particularly during the rainy season when crop cultivation is at its peak and ticks are active (33). In two studies conducted on cattle from Sudan, animal body condition was also tested in relation to CCHFV seroprevalence but its effect was insignificant to the assumption that poor body conditions may invoke higher susceptibility of CCHFV infection in animals (35, 89). Conversely, the possibility that CCHFV infection induces a poorer body condition in infected animal is considered anecdotal, since no clinical signs have been detected in animals to date.

As stated above, husbandry practices, such as feeding systems, can be important factors impacting the exposure of animals to tick vectors and thus there exists the risk for CCHFV transmission. A few studies conducted in Africa and Asia reported higher CCHF seroprevalence in animals grazing in pastures than those fed on trough (87, 88), and even higher prevalence in nomadic herds covering long distances (89). In Iran, Lotfollahzadeh et al. (93) also pointed out vegetation where grazing took place as an additional factor that may favor the presence and abundance of ticks and thus exposure to CCHFV

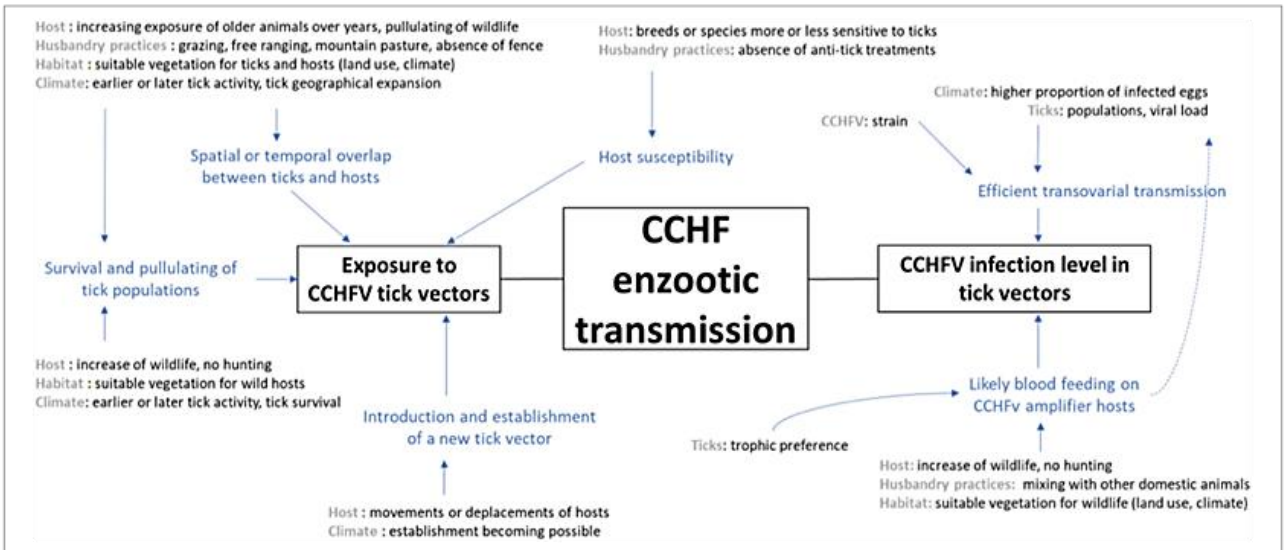


FIGURE 3 | Scheme representing factors that may impact either the exposure of animals to tick vectors or the CCHFV infection level of tick vectors, which could finally influence the CCHFV enzootic transmission in France.

vectors. In the South of France, extensive farming systems where animals are highly exposed to ticks do exist, as observed for cattle rearing in Camargue. However, these areas are of wet habitats and have been demonstrated as unsuitable for the establishment of the *H. marginatum* tick vector (103). Extensive farming can also be temporary as mostly reported in Corsica where most cattle are free-ranging in suitable scrubs during spring and summer, corresponding to the activity period of the adult stages of *H. marginatum*. Another husbandry practice that was reported as an important factor modifying the risk of CCHFV transmission is the use of acaricide treatments on animals, as they decrease the infestation load and the susceptibility of animals to ticks and subsequently the probability of CCHFV transmission. This phenomenon was reported in cattle from Pakistan (88) and was considered a reliable preventive strategy when animals from Sudan were introduced into Saudi Arabia (104). This was clearly linked to the tick burden of animals, which was also measured in some studies (33, 35, 87–91). Conversely, some studies reported insignificant or opposite effects of acaricide treatments or tick control actions but a little information was provided on the chemicals and methods used to assess their reliability (35, 87, 89). Although tick infestation rates may be lower in France than those observed in tropical or subtropical regions, some farmers use acaricides or insecticides, punctually, the latter targeting flies, or anthelmintics with ivermectine that can be indirectly active on ticks. These practices should be tested as factors influencing the exposure of animals to CCHFV tick vectors. Finally, several other husbandry practices, such as the flock size, the import of animals into farms, the slaughtering of animals on farms, or the contact with other farms, have been tested in some studies but remained insignificant (87, 88). Two factors captured our attention as they seemed relevant within the French context and could impact not only the exposure of animals to tick vectors but also the level of infection in tick vectors are as follows: (1) The presence of other domestic animals on farms and (2) the possible contact with wildlife (87, 88). As stated above regarding the importance of the host community composition for tick vectors, changes may occur in CCHFV prevalence among tick vectors depending on the probability of these ticks to feed on other viremic and infectious animals reared in conjunction with cattle. In the South of France where *H. marginatum* has been established, sheep farming and the use of horses for cultivation were previously considered traditional practices. However, farmers have progressively diversified their activities since the 1960s by including suckling cattle for meat production and dairy goats; all these animal species presenting differential abilities to replicate CCHFV and amplify tick populations. Similarly, spatial overlap between cattle and wildlife, such as lagomorphs, birds, or wild boars in absence of fences or due to free-range farming, as observed in Corsica, may change the probability for tick vectors to become infected with CCHFV.

However, apart from the husbandry practices, contact between cattle and wildlife can also result from changes in land use (21). For example, CCHFV emergence in Turkey since 2002 has been mainly attributed to the local increase of hares' abundance, which highly amplified populations of *H. marginatum* and enhanced their infection with CCHFV. This was mainly due to security issues resulting in the temporary prohibition of hunting and agricultural activities, followed by the reopening of these areas after several years with the sudden exposure of humans to highly infectious ticks (105). This was also concomitant to higher spring temperatures over several successive years within the country that accelerated the development cycle of the tick vector *H.*

marginatum, decreased its density-independent mortality, and thus increased populations available to become infected (106). Kulichenko in the Russian Federation (106) and Vescio in Bulgaria (107) also mentioned climate as a main factor impacting the development of CCHFV tick vectors and thus local virus circulation. Climate can also increase tick search activity and host parasitic load, which promotes virus circulation (24). In a deterministic model considering the total development cycle of *H. marginatum* and each CCHFV transmission pathway between ticks and vertebrate hosts, Estrada-Pena and collaborators (108) showed that increased temperature, especially in late summer, allows for increased oviposition events in females before unsuitable autumn conditions, which increases survival probability of developing eggs. However, he also demonstrated that a key factor for CCHFV transmission by *H. marginatum* was a climate-independent biological parameter intrinsic to the tick vector, namely the rate of CCHFV transovarial transmission (108). Although few studies described the vector competence of *H. marginatum* for CCHFV, including tick-to-tick transmission processes such as transovarial transmission, it is assumed that this ability depends on both the tick population/species and the viral strain, as it has been well-described for other arboviruses (109, 110). Nevertheless, if CCHFV transovarial transmission is efficient, better egg survival due to higher temperature is predicted to result in a higher proportion of infected eggs. Consequently, it is possible to assert that climate change may impact both the exposure of animals to tick populations and also the level of CCHFV infection in the tick vectors. Climate change is also likely to expand the geographical range of *H. marginatum* northward in the Mediterranean Basin, with ticks recently being found in southwestern Europe (32, 111), as well as contribute to concomitant geographical spread of CCHFV from neighboring endemic areas. Indeed, *Hyalomma* ticks prefer warm summers, relatively mild winters, and reduced precipitation, which is becoming normal under the current climate change in this region (21, 112). Successful establishment of new CCHFV tick vectors in France such as *H. lusitanicum* or *H. rufipes*, due to the combined climate change and introduction events, may also occur. In relation to global warming, habitats can also change and become more or less suitable for both the survival of CCHFV tick vectors and the increased abundance of some wild mammal species, such as wild boars (113). In southern Europe, including the South of France, specific categories of xerophilous land covers such as shrubs, grasslands, and herbaceous vegetation may expand under climate change and favor the establishment of *H. marginatum* (103) among locally abundant small vertebrates population such as hares and rabbits (74). In addition, modifications in land use and husbandry practices, as a consequence of either climate or global changes (e.g., land conversion to pastures through deforestation), can contribute to an increase of open areas. Inversely, habitat reforestation due to agriculture decline can contribute to a higher abundance of wild ungulates populations, while fragmented habitats with wooded areas can increase their movement and the transportation of adult ticks to the new environments (30, 107). It appears that the environmental conditions are the ultimate factors that impact all the pre-cited factors.

CONCLUSION

France seems to be still an apparently free-disease area for CCHF, as there have never been any reports of human autochthonous cases and the virus has never been detected in ticks. However, CCHFV antibodies have been detected in domestic ruminants in Corsica Island, suggesting local transmission of the virus at least in this part of France. In this work, we have shown that *H. marginatum* seems to be the best candidate for this transmission, as its distribution has been increasing in the south of France, for some years, under climate changes. The known vertebrate hosts of this tick are present and numerous locally, which also enhanced its establishment. Some of these hosts such as lagomorphs or cattle are considered as good CCHFV amplifiers while others like birds or horses are not. Although the circulation of the virus seems to be possible as shown by serological evidence in cattle, the trophic preference of *H. marginatum* and the availability of hosts may impact the probability for *H. marginatum* tick vectors to become infected though what is called "the dilution effect" and therefore to efficiently transmit CCHFV. The natural enzootic transmission of CCHFV between ticks and non-human vertebrate hosts, commonly measured by seroprevalence in animals, depends on either the exposure of such animals to tick vectors or the level of infection of such ticks. These two parameters can be impacted by various factors related to the hosts, husbandry practices, habitat, and climate.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CB: bibliographic review, formal analysis, writing the original draft, and reviewing and editing the manuscript. LV: bibliographic review, formal analysis, conceptualization, reviewing and editing the manuscript, supervision, and funding acquisition. PH and VG: conceptualization and reviewing and editing the manuscript. MTB: bibliographic review and review and editing of the manuscript. FJ: scientific support and review and editing. MB and BC: funding acquisition and reviewing and editing the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

The authors thank the funders who made this work possible: French Ministry of Agriculture—General Directorate for Food (DGAl, grant agreement: SPA17 n°0079-E), European Funds for Regional Development (FEDER, Grand-Est), Monitoring Outbreaks for Disease surveillance in a data science context project (MOOD project, EU H2020, grant agreement ID: 874850), French Establishment for Fighting Zoonoses (ELIZ) and the Association Nationale Recherche Technologie (ANRT, grant agreement No.: 2019-1145).

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the working group Risk analysis for human and animal health related to *Hyalomma* ticks of French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (ANSES) to which one of our co-authors participate by carrying the bibliographic search on *Hyalomma* ticks' vector competence. In addition, we thank Léa Souq, first year master degree student for her bibliographic work on *H. marginatum* hosts. We would also like to thank Iyonna Zortmann for her careful proofreading of the language.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.932304/full#supplementary-material

REFERENCES

1. Papa A. Emerging arboviruses of medical importance in the Mediterranean region. *J Clin Virol.* (2019) 115:5–10. doi: 10.1016/j.jcv.2019.03.007
2. Ergönül Ö. Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Lancet Infect Dis.* (2006) 6:203–14. doi: 10.1016/S1473-3099(06)70435-2
3. Khan JA, Rehman S, Fisher-Hoch SP, Mirza S, Khurshid M, McCormick JB. Crimean congo-haemorrhagic fever treated with oral ribavirin. *Lancet.* (1995) 346:472–5. doi: 10.1016/S0140-6736(95)91323-8
4. Öncü S. Crimean-Congo hemorrhagic fever: an overview. *Virol Sin.* (2013) 28:193–201. doi: 10.1007/s12250-013-3327-4
5. Yaqub T, Oneeb M, Mukhtar N, Tahir Z, Shahid F, Subhan S, et al. Crimean–Congo Haemorrhagic Fever: case study analysis of a sporadic outbreak from Chakwal, Pakistan. *Zoonoses Public Health.* (2019) 66:871–3. doi: 10.1111/zph.12623
6. WHO. *Crimean-Congo Haemorrhagic Fever.* (2013). Available online at: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/crimean-congo-haemorrhagic-fever (accessed November 19, 2019).
7. Mardani M, Keshtkar-Jahromi M. Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Arch Iran Med.* (2007) 10:204–14. Available online at: https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?id=64251
8. Gargili A, Estrada-Peña A, Spengler JR, Lukashev A, Nuttall PA, Bente DA. The role of ticks in the maintenance and transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: a review of published field and laboratory studies. *Antiviral Res.* (2017) 144:93–119. doi: 10.1016/j.antiviral.2017.05.010
9. Spengler JR, Estrada-Peña A. Host preferences support the prominent role of Hyalomma ticks in the ecology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *PLoS Negl Trop Dis.* (2018) 12:e0006248. doi: 10.1371/journal.pntd.0006248
10. Spengler JR, Estrada-Peña A, Garrison AR, Schmaljohn C, Spiropoulou CF, Bergeron É, et al. Chronological review of experimental infection studies of the role of wild animals and livestock in the maintenance and transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Antiviral Res.* (2016) 135:31–47. doi: 10.1016/j.antiviral.2016.09.013
11. Nasirian H. Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) seroprevalence: a systematic review and meta-analysis. *Acta Trop.* (2019) 196:102–20. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.05.019
12. Stavropoulou E, Troillet N. Fièvre hémorragique de Crimée-Congo : une maladie virale émergente en Europe. *Rev Med Suisse.* (2018) 14:1786–9. doi: 10.53738/REVMED.2018.14.622.1786
13. Papa A, Sidira P, Larichev V, Gavrilova L, Kuzmina K, Mousavi-Jazi M, et al. Crimean-congo hemorrhagic fever virus, Greece. *Emerg Infect Dis.* (2014) 20:288–90. doi: 10.3201/eid2002.130690
14. Hoogstraal H. The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa. *J Med Entomol.* (1979) 15:307–417. doi: 10.1093/jmedent/15.4.307
15. Estrada-Peña A, Zatansever Z, Gargili A, Aktas M, Uzun R, Ergonul O, et al. Modeling the spatial distribution of crimean-congo hemorrhagic fever outbreaks in Turkey. *Vect Borne Zoonot Dis.* (2007) 7:667–78. doi: 10.1089/vbz.2007.0134
16. Vial L, Stachurski F, Leblond A, Huber K, Vourc'h G, René-Martellet M, et al. Strong evidence for the presence of the tick Hyalomma marginatum Koch, 1844 in southern continental France. *Ticks Tick Borne Dis.* (2016) 7:1162–7. doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.08.002
17. Grech-Angelini S, Stachurski F, Lancelot R, Boissier J, Allienne J-F, Marco S, et al. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting cattle and some other domestic and wild hosts on the French Mediterranean island of Corsica. *Parasit Vect.* (2016) 9:582. doi: 10.1186/s13071-016-1876-8
18. De Liberato C, Frontoso R, Magliano A, Montemaggiori A, Autorino GL, Sala M, et al. Monitoring for the possible introduction of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in Italy based on tick sampling on migratory birds and serological survey of sheep flocks. *Prev Vet Med.* (2018) 149:47–52. doi: 10.1016/j.prevetmed.2017.10.014
19. Schuster I, Chaintoutis SC, Dovas CI, Groschup MH, Mertens M. Detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus-specific IgG antibodies in ruminants residing in Central and Western Macedonia, Greece. *Ticks Tick Borne Dis.* (2017) 8:494–8. doi: 10.1016/j.ttbdis.2017.02.009
20. Morel PC. Les Tiques d'Afrique et du Bassin méditerranéen. *Bull Académie Vét Fr.* (2003) 1–1342. doi: 10.4267/2042/66807
21. Mertens M, Schmidt K, Ozkul A, Groschup MH. The impact of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus on public health. *Antiviral Res.* (2013) 98:248–60. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.02.007
22. Christova I, Panayotova E, Groschup MH, Trifonova I, Tchakarova S, Sas MA. High seroprevalence for Crimean–Congo haemorrhagic fever virus in ruminants in the absence of reported human cases in many regions of Bulgaria. *Exp Appl Acarol.* (2018) 75:227–34. doi: 10.1007/s10493-018-0258-7
23. Grech-Angelini S, Lancelot R, Ferraris O, Peyrefitte CN, Vachiery N, Pédarrieu A, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus antibodies among livestock on Corsica, France, 2014–2016. *Emerg Infect Dis.* (2020) 26:1041–4. doi: 10.3201/10.3201/eid2605.191465
24. Esser HJ, Mögling R, Cleton NB, van der Jeugd H, Sprong H, Stroo A, et al. Risk factors associated with sustained circulation of six zoonotic arboviruses: a systematic review for selection of surveillance sites in non-endemic areas. *Parasit Vect.* (2019) 12:265. doi: 10.1186/s13071-019-3515-7
25. Hoch T, Breton E, Josse M, Deniz A, Guven E, Vatansever Z. Identifying main drivers and testing control strategies for CCHFV spread. *Exp Appl Acarol.* (2016) 68:347–59. doi: 10.1007/s10493-015-9937-9
26. Hoch T, Breton E, Vatansever Z. Dynamic modeling of Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus (CCHFV) spread to test control strategies. *J Med Entomol.* (2018) 55:1124–32. doi: 10.1093/jme/tjy035
27. Ak Ç, Ergönül Ö, Gönen M. A prospective prediction tool for understanding Crimean–Congo haemorrhagic fever dynamics in Turkey. *Clin Microbiol Infect.* (2019) 26:123.e1–7. doi: 10.1016/j.cmi.2019.05.006
28. Goldfarb LG, Chumakov MP, Myskin AA, Kondratenko VF, Reznikova OY. An epidemiological model of Crimean hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* (1980) 29:260–4. doi: 10.4269/ajtmh.1980.29.260
29. Switkes J, Nannyonga B, Mugisha JYT, Nakakawa J. A mathematical model for Crimean-Congo haemorrhagic fever: tick-borne dynamics with conferred host immunity. *J Biol Dyn.* (2016) 10:59–70. doi: 10.1080/17513758.2015.1102976
30. Estrada-Peña A, Jameson L, Medlock J, Vatansever Z, Tishkova F. Unraveling the ecological complexities of tick-associated Crimean-Congo hemorrhagic fever virus transmission: a gap analysis for the Western Palearctic. *Vect Borne Zoon Dis.* (2012) 12:743–52. doi: 10.1089/vbz.2011.0767

31. Dereli AS, Kayser V. Crimean–Congo hemorrhagic fever: a bibliometric assessment of the literature. *J Infect Public Health.* (2018) 11:147–8. doi: 10.1016/j.jiph.2017.06.010
32. Andersen LK, Davis MDP. Climate change and the epidemiology of selected tick-borne and mosquito-borne diseases: update from the International Society of Dermatology Climate Change Task Force. *Int J Dermatol.* (2017) 56:252–9. doi: 10.1111/ijd.13438
33. Phonera MC, Simuunza MC, Kainga H, Ndebe J, Chembensofu M, Chatanga E, et al. Seroprevalence and risk factors of Crimean-Congo hemorrhagic fever in cattle of smallholder farmers in central Malawi. *Pathog Basel Switz.* (2021) 10:1613. doi: 10.3390/pathogens10121613
34. Moraga-Fernández A, Ruiz-Fons F, Habela MA, Royo-Hernández L, Calero-Bernal R, Gortazar C, et al. Detection of new Crimean–Congo haemorrhagic fever virus genotypes in ticks feeding on deer and wild boar, Spain. *Transbound Emerg Dis.* (2021) 68:993–1000. doi: 10.1111/tbed.13756
35. Ibrahim AM, Adam IA, Osman BT, Aradaib IE. Epidemiological survey of Crimean Congo hemorrhagic fever virus in cattle in East Darfur State, Sudan. *Ticks Tick Borne Dis.* (2015) 6:439–44. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.03.002
36. Turell MJ. Role of ticks in the transmission of crimean-congo hemorrhagic fever virus. In: Ergonul O, Whitehouse CA, editors. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: A Global Perspective.* Dordrecht: Springer (2007). p. 143–54. doi: 10.1007/978-1-4020-6106-6_12
37. Nalca A, Whitehouse C. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection among animals. In: *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: A Global Perspective.* Amsterdam: Springer (2007). p. 155–65. doi: 10.1007/978-1-4020-6106-6_13
38. Boulanger N, McCoy KD (eds). *Tiques et maladies à tiques : Biologie, écologie évolutive, épidémiologie.* Marseille: IRD Éditions (2017). p. 336–8. Available online at: http://books.openedition.org/irdeditions/9001 (accessed April 24, 2022).
39. Camicas J-L, Cornet J-P, Gonzalez J-P, Wilson ML, Adam F, Zeller HG. *La fièvre hémorragique de Crimée-Congo au Sénégal : dernières données sur l'écologie du virus CCHF.* (1994) 6 p.
40. Khan AS, Maupin GO, Rollin PE, Noor AM, Shurie HH, Shalabi AG, et al. An outbreak of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the United Arab Emirates, 1994-1995. *Am J Trop Med Hyg.* (1997) 57:519–25. doi: 10.4269/ajtmh.1997.57.519
41. Rageau J. *Répartition géographique et rôle pathogène des tiques (acariens : Argasidae et Ixodidae) en France.* (1972) 13 p.
42. Morel P-C. Les *Hyalomma* (Acariens, *Ixodidæ*) de France. *Ann Parasitol Hum Comparée.* (1959) 34:552–5. doi: 10.1051/parasite/1959344552
43. Valcárcel F, González J, González MG, Sánchez M, Tercero JM, Elhachimi L, et al. Comparative ecology of *Hyalomma lusitanicum* and *Hyalomma marginatum* Koch, 1844 (Acarina: Ixodidae). *Insects.* (2020) 11:303. doi: 10.3390/insects11050303
44. Giban J, Barthélémy J, Aubry J. *L'épizootie de myxomatose en France chez le lapin de garenne: (Oryctolagus cuniculus L.).* 13 p.
45. Macaigne F, Perez-Eid C. Hyalomma scupense Schulze, 1919 (Acarina, Ixodoidea) tique autochtone du Sud-Ouest de la France. *Ann Parasitol Hum Comparée.* (1993) 68:199–200. doi: 10.1051/parasite/1993684199
46. Cicculli V, Oscar M, Casabianca F, Villechenaud N, Charrel R, de Lamballerie X, et al. Molecular detection of spotted-fever group rickettsiae in ticks collected from domestic and wild animals in Corsica, France. *Pathog Basel Switz.* (2019) 8:E138. doi: 10.3390/pathogens8030138
47. Kondratenko V, Blagoveschchenskaya N, Butenko A, Vyshnivetskaya L, Zarubina L, Milyutin V, et al. Results of virological investigation of ixodid ticks in Crimean hemorrhagic fever focus in Rostov Oblast. *Crime Hemorr Fever.* (1970) 10:29–35.
48. Sherifi K, Cadar D, Muji S, Robaj A, Ahmeti S, Jakupi X, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus Clades V and VI (Europe 1 and 2) in Ticks in Kosovo, 2012. *PLoS Negl Trop Dis.* (2014) 8:e3168. doi: 10.1371/journal.pntd.0003168
49. Gevorgyan H, Grigoryan GG, Atoyan HA, Rukhkyan M, Hakobyan A, Zakaryan H, et al. Evidence of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus occurrence in ixodidae ticks of Armenia. *J Arthropod-Borne Dis.* (2019) 13:9–16. doi: 10.18502/jad.v13i1.928
50. Yaser SA, Sadegh C, Zakkyeh T, Hassan V, Maryam M, Ali OM, et al. Crimean–Congo hemorrhagic fever: a molecular survey on hard ticks (Ixodidae) in Yazd province, Iran. *Asian Pac J Trop Med.* (2011) 4:61–3. doi: 10.1016/S1995-7645(11)60034-5
51. Yesilbag K, Aydin L, Dincer E, Alpay G, Girisgin AO, Tuncer P, et al. Tick survey and detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in tick species from a non-endemic area, South Marmara region, Turkey. *Exp Appl Acarol.* (2013) 60:253–61. doi: 10.1007/s10493-012-9642-x
52. Orkun Ö, Karaer Z, Çakmak A, Nalbantoglu S. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks in Turkey: a broad range tick surveillance study. *Infect Genet Evol.* (2017) 52:59–66. doi: 10.1016/j.meegid.2017.04.017
53. Grech-Angelini S, Stachurski F, Lancelot R, Boissier J, Allienne J-F, Gharbi M, et al. First report of the tick Hyalomma scupense (natural vector of bovine tropical theileriosis) on the French Mediterranean island of Corsica. *Vet Parasitol.* (2016) 216:33–7. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.11.015
54. Rocafort-Ferrer G, Leblond A, Joulié A, René-Martellet M, Sandoz A, Poux V, et al. Molecular assessment of *Theileria equi* and *Babesia caballi* prevalence in horses and ticks on horses in southeastern France. *Parasitol Res.* (2022) 121:999–1008. doi: 10.1007/s00436-022-07441-7
55. Spengler JR, Bergeron É, Rollin PE. Seroepidemiological Studies of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in domestic and wild animals. *PLoS Negl Trop Dis.* (2016) 10:e0004210. doi: 10.1371/journal.pntd.0004210
56. Schuster I, Mertens M, Mrenoshki S, Staubach C, Mertens C, Brüning F, et al. Sheep and goats as indicator animals for the circulation of CCHFV in the environment. *Exp Appl Acarol.* (2016) 68:337–46. doi: 10.1007/s10493-015-9996-y
57. Hoogstraal H, Aeschlimann A. Tick-host specificity. *Bull Société Entomol Suisse.* (1982) 55:5–32.
58. Klompen JSH, Black WC, Keirans JE, Oliver JH. Evolution of ticks. *Annu Rev Entomol.* (1996) 41:141–61. doi: 10.1146/annurev.en.41.010196.001041
59. Gargili A, Thangamani S, Bente D. Influence of laboratory animal hosts on the life cycle of *Hyalomma marginatum* and implications for an *in vivo* transmission model for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Front Cell Infect Microbiol.* (2013) 3:39. doi: 10.3389/fcimb.2013.00039
60. Tiar G, Tiar-Saadi M, Benyacoub S, Rouag R, Široký P. The dependence of *Hyalomma aegyptium* on its tortoise host *Testudo graeca* in Algeria. *Med Vet Entomol.* (2016) 30:351–9. doi: 10.1111/mve.12175
61. Valcárcel F, González J, Tercero-Jaime JM, Olmeda AS. The effect of excluding ungulates on the abundance of ixodid ticks on wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Exp Appl Acarol.* (2017) 72:439–47. doi: 10.1007/s10493-017-0166-2
62. Kanchev K, Kamenov Y, Atanassova I, Davidova R, Tomov R. Parasitic alien terrestrial arthropods on small mammals in Northeast and South Bulgaria. *Bulg J Agric Sci Bulg.* (2012) 18:965–70. Available online at: https://www.agrojournal.org/18/06-20-12.pdf
63. Ionita M, Mitrea IL, Pfister K, Hamel D, Silaghi C. Molecular evidence for bacterial and protozoan pathogens in hard ticks from Romania. *Vet Parasitol.* (2013) 196:71–6. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.01.016
64. Koc S, Aydin L, Cetin H. Tick species (Acari: Ixodida) in Antalya City, Turkey: species diversity and seasonal activity. *Parasitol Res.* (2015) 114:2581–6. doi: 10.1007/s00436-015-4462-7
65. James GH, Dinulos M. Infestations and bites. In: *Habif's Clinical Dermatology.* (2021). Available online at: https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780323612692000150 (accessed April 11, 202).
66. Elhachimi L, Valcárcel F, Olmeda AS, Elasatey S, Khattat SE, Daminet S, et al. Rearing of *Hyalomma marginatum* (Acarina: Ixodidae) under laboratory conditions in Morocco. *Exp Appl Acarol.* (2021) 84:785–94. doi: 10.1007/s10493-021-00641-3
67. Pascucci I, Di Domenico M, Capobianco Dondona G, Di Gennaro A, Polci A, Capobianco Dondona A, et al. Assessing the role of migratory birds in the introduction of ticks and tick-borne pathogens from African countries: An Italian experience. *Ticks Tick-Borne Dis.* (2019) 10:101–272. doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.101272
68. Grard G, Drexler JF, Fair J, Muyembe J-J, Wolfe ND, Drosten C, et al. Re-emergence of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Central Africa. *PLoS Negl Trop Dis.* (2011) 5:e1350. doi: 10.1371/journal.pntd.0001350
69. Portillo A, Palomar AM, Santibáñez P, Oteo JA. Epidemiological Aspects of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Western Europe: what about

the Future? *Microorganisms.* (2021) 9:649. doi: 10.3390/microorganisms9030649
70. Spengler JR, Bergeron É, Spiropoulou CF. Crimean-Congo hemorrhagic fever and expansion from endemic regions. *Curr Opin Virol.* (2019) 34:70–8. doi: 10.1016/j.coviro.2018.12.002
71. Espunyes J, Cabezón O, Pailler-García L, Dias-Alves A, Lobato-Bailón L, Marco I, et al. Hotspot of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus seropositivity in wildlife, Northeastern Spain. *Emerg Infect Dis.* (2021) 27:2480–4. doi: 10.3201/eid2709.211105
72. Hars J, Rossi S, Faure E, Taconet A-E, Gay P, Landelle P, et al. *Risques sanitaires liés à l'importation de gibier sauvage d'élevage et de repeuplement [French].* (2015) 4.
73. González-Redondo P, Sánchez-Martínez R. Characterisation of wild rabbit commercial game farms in Spain. *World Rabbit Sci.* (2014) 22:51. doi: 10.4995/wrs.2014.1213
74. Letty J, Olivier A, Tatin L, Galaup O. Lièvre France. In: *Atlas des mammifères sauvages de France volume 2.* Paris: Publications scientifiques du Muséum national d'Histoire naturelle (2021).
75. Nabeth P, Cheikh DO, Lo B, Faye O, Vall IOM, Niang M, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever, Mauritania. *Emerg Infect Dis.* (2004) 10:2143–9. doi: 10.3201/eid1012.040535
76. Zeller HG, Cornet JP, Camicas JL. Crimean-Congo haemorrhagic fever virus infection in birds: field investigations in Senegal. *Res Virol.* (1994) 145:105–9. doi: 10.1016/S0923-2516(07)80012-4
77. Swanepoel R, Leman PA, Burt FJ, Jardine J, Verwoerd DJ, Capua I, et al. Experimental infection of ostriches with Crimean–Congo haemorrhagic fever virus. *Epidemiol Infect.* (1998) 121:427–32. doi: 10.1017/S0950268898001344
78. Capua I. Crimean-Congo haemorrhagic fever in ostriches: a public health risk for countries of the European Union? *Avian Pathol.* (1998) 27:117–20. doi: 10.1080/03079459808419311
79. Mauvy B, Souchay L. *Réseau lièvre-OFB* (2020).
80. Kaiser MN, Hoogstraal H, Watson GE. Ticks (Ixodoidea) on migrating birds in Cyprus, fall 1967 and spring 1968, and epidemiological considerations*. *Bull Entomol Res.* (1974) 64:97–110. doi: 10.1017/S0007485300027024
81. Palomar AM, Portillo A, Mazuelas D, Roncero L, Arizaga J, Crespo A, et al. Molecular analysis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus and Rickettsia in Hyalomma marginatum ticks removed from patients (Spain) and birds (Spain and Morocco), 2009–2015. *Ticks Tick Borne Dis.* (2016) 7:983–7. doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.05.004
82. Stachurski F, Vial L. *Santé Animale - Alimentation* (2018). 5 p.
83. Wilson ML, Gonzalez J-P, Cornet J-P, Camicas J-L. Transmission of crimean-congo haemorrhagic fever virus from experimentally infected sheep to hyalomma truncatum ticks. *Res Virol.* (1991) 142:395–404. doi: 10.1016/0923-2516(91)90007-P
84. Crimean-Congo Hemorrhagic F. 2011-2015. *Emerg Infect Dis.* (2019) 25:1177–84. doi: 10.3201/eid2506.180877
85. Gordon SW, Linthicum KJ, Moulton JR. Transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in two species of Hyalomma ticks from infected adults to cofeeding immature forms. *Am J Trop Med Hyg.* (1993) 48:576–80. doi: 10.4269/ajtmh.1993.48.576
86. LoGiudice K, Ostfeld RS, Schmidt KA, Keesing F. The ecology of infectious disease: effects of host diversity and community composition on Lyme disease risk. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2003) 100:567–71. doi: 10.1073/pnas.0233733100
87. Msimang V, Weyer J, le Roux C, Kemp A, Burt FJ, Tempia S, et al. Risk factors associated with exposure to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in animal workers and cattle, and molecular detection in ticks, South Africa. *PLoS Negl Trop Dis.* (2021) 15:e0009384. doi: 10.1371/journal.pntd.0009384
88. Kasi KK, Sas MA, Sauter-Louis C, von Arnim F, Gethmann JM, Schulz A, et al. Epidemiological investigations of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus infection in sheep and goats in Balochistan, Pakistan. *Ticks Tick-Borne Dis.* (2020) 11:101324. doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.101324
89. Adam IA, Mahmoud MAM, Aradaib IE, A. seroepidemiological survey of Crimean Congo hemorrhagic fever among cattle in North Kordufan State, Sudan. *Virol J.* (2013) 10:178. doi: 10.1186/1743-422X-10-178
90. Suliman HM, Adam IA, Saeed SI, Abdelaziz SA, Haroun EM, Aradaib IE. Crimean Congo hemorrhagic fever among the one-humped camel (Camelus dromedaries) in Central Sudan. *Virol J.* (2017) 14:147. doi: 10.1186/s12985-017-0816-3
91. Balinandi S, von Brömssen C, Tumusiime A, Kyondo J, Kwon H, Monteil VM, et al. Serological and molecular study of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in cattle from selected districts in Uganda. *J Virol Methods.* (2021) 290:114075. doi: 10.1016/j.jviromet.2021.114075
92. Guilherme JM, Gonella-Legall C, Legall F, Nakoume E, Vincent J. Seroprevalence of five arboviruses in Zebu cattle in the Central African Republic. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* (1996) 90:31–3. doi: 10.1016/S0035-9203(96)90468-X
93. Lotfollahzadeh S, Nikbakht Boroujeni GHR, Mokhber Dezfouli MR, Bokaei S. A serosurvey of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in dairy cattle in iran: serosurvey of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in dairy cattle. *Zoonoses Public Health.* (2011) 58:54–9. doi: 10.1111/j.1863-2378.2009.01269.x
94. Ozan E, Ozkul A. Investigation of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ruminant species slaughtered in several endemic provinces in Turkey. *Arch Virol.* (2020) 165:1759–67. doi: 10.1007/s00705-020-04665-9
95. Schulz A, Barry Y, Stoek F, Pickin MJ, Ba A, Chitimia-Dobler L, et al. Detection of crimean-congo hemorrhagic fever virus in blood-fed hyalomma ticks collected from mauritanian livestock. *Parasit Vectors.* (2021) 14:342. doi: 10.1186/s13071-021-04819-x
96. Wilson M, Desoutter D, Gonzalez J-P, Camicas J-L, Guillaud ML, LeGuenno B. Distribution of Crimean-Congo hemorrhagic fever viral antibody in senegal: environmental and vectorial correlates. *Am J Trop Med Hyg.* (1990) 43:557–66. doi: 10.4269/ajtmh.1990.43.557
97. Zohaib A, Saqib M, Athar MA, Hussain MH, Sial A-R, Tayyab MH, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in humans and livestock, Pakistan, 2015–2017. *Emerg Infect Dis.* (2020) 26:5. doi: 10.3201/eid2604.191154
98. Burt FJ, Leman PA, Abbott JC, Swanepoel R. Serodiagnosis of Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Epidemiol Infect.* (1994) 113:551–62. doi: 10.1017/S0950268800068576
99. Vor T, Kiffner C, Hagedorn P, Niedrig M, Rühe F. Tick burden on European roe deer (Capreolus capreolus). *Exp Appl Acarol.* (2010) 51:405–17. doi: 10.1007/s10493-010-9337-0
100. Tabor AE, Ali A, Rehman G, Rocha Garcia G, Zangirolamo AF, Malardo T, et al. Cattle tick *Rhipicephalus microplus*-host interface: a review of resistant and susceptible host responses. *Front Cell Infect Microbiol.* (2017) 7:506. doi: 10.3389/fcimb.2017.00506
101. Yessinou RE, Adoligbe C, Akpo Y, Adinci J, Youssao Abdou Karim I, Farougou S. Sensitivity of different cattle breeds to the infestation of cattle ticks *Amblyomma variegatum, Rhipicephalus microplus*, and *Hyalomma* spp. on the Natural Pastures of Opkara Farm, Benin. *J Parasitol Res.* (2018) 2018:1–9. doi: 10.1155/2018/2570940
102. Nwachukwu EN, Ogbu CC, Edozie C, Oke UK, Ojewola GS, Ekumankama OO. Incidence of tick infestation in mixed breeding herd of indigenous cattle in a rainforest agro-ecological zone. *Livestock Res Rural Develop.* (2020) 32. Available online at: http://www.lrrd.org/lrrd32/1/cosch32004.html (accessed June 29, 2022).
103. Bah MT, Grosbois V, Stachurski F, Muñoz F, Duhayon M, Rakotoarivony I, et al. The Crimean-Congo haemorrhagic fever tick vector Hyalomma marginatum in the south of France: Modelling its distribution and determination of factors influencing its establishment in a newly invaded area. *Transbound Emerg Dis.* (2021). doi: 10.1111/tbed.14578. [Epub ahead of print].
104. Hassanein KM, El-Azazy OME, Yousef HM. Detection of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus antibodies in humans and imported livestock in Saudi Arabia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* (1997) 91:536–7. doi: 10.1016/S0035-9203(97)90014-6
105. Jameson LJ, Ramadani N, Medlock JM. Possible drivers of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus transmission in Kosova. *Vect Borne Zoon Dis.* (2012) 12:753–7. doi: 10.1089/vbz.2011.0773
106. Kulichenko AN, Prislegina DA. Climatic prerequisites for changing activity in the natural Crimean-Congo hemorrhagic fever focus in the South of the Russian Federation. *Russ J Infect Immun.* (2019) 9:162–72. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-162-172

107. Vescio FM, Busani L, Mughini-Gras L, Khoury C, Avellis L, Taseva E, et al. Environmental correlates of crimean-congo haemorrhagic fever incidence in Bulgaria. *BMC Public Health*. (2012) 12:1116. doi: 10.1186/1471-2458-12-1116
108. Estrada-Peña A, Ruiz-Fons F, Acevedo P, Gortazar C, de la Fuente J. Factors driving the circulation and possible expansion of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in the western Palearctic. *J Appl Microbiol*. (2013) 114:278–86. doi: 10.1111/jam.12039
109. Ciota AT, Bialosuknia SM, Zink SD, Brecher M, Ehrbar DJ, Morrissette MN, et al. Effects of Zika virus strain and aedes mosquito species on vector competence. *Emerg Infect Dis*. (2017) 23:1110–7. doi: 10.3201/eid2307.161633
110. Pereira De Oliveira R, Hutet E, Lancelot R, Paboeuf F, Duhayon M, Boinas F, et al. Differential vector competence of Ornithodoros soft ticks for African swine fever virus: what if it involves more than just crossing organic barriers in ticks? *Parasit Vect*. (2020) 13:618. doi: 10.1186/s13071-020-04497-1
111. Gale P, Stephenson B, Brouwer A, Martinez M, de la Torre A, Bosch J, et al. Impact of climate change on risk of incursion of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in livestock in Europe through migratory birds. *J Appl Microbiol*. (2012) 112:246–57. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05203.x
112. Dreshaj S, Ahmeti S, Ramadani N, Dreshaj G, Humolli I, Dedushaj I. Current situation of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Southeastern Europe and neighboring countries: a public health risk for the European Union? *Travel Med Infect Dis*. (2016) 14:81–91. doi: 10.1016/j.tmaid.2016.03.012
113. Massei G, Kindberg J, Licoppe A, Gačić D, Šprem N, Kamler J, et al. Wild boar populations up, numbers of hunters down? A review of trends and implications for Europe. *Pest Manag Sci*. (2015) 71:492–500. doi: 10.1002/ps.3965

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Bernard, Holzmuller, Bah, Bastien, Combes, Jori, Grosbois and Vial. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Conclusion du chapitre 1 :

A travers le travail de revue de l'**article 2**, nous avons pu identifier des espèces de tiques, présentes en France, qui pourraient représenter un risque pour la transmission du VFHCC puisque déjà détectées positives au VFHCC au moins une fois dans le monde. Parmi les 9 espèces identifiées, nous avons considéré deux candidats principaux et trois autres candidats secondaires. Pour les deux premiers, *H. marginatum* et *H. lusitanicum*, nous savons qu'elles sont pleinement compétentes pour la transmission de VFHCC et qu'elles se nourrissent entre autres sur des lagomorphes aux stades immatures et sur de grands ongulés sauvages ou domestiques au stade adulte, une partie de ces animaux répliquant efficacement le VFHCC. Par contre, ce qui différencie ces deux espèces de tiques en tant que vecteurs potentiels de VFHCC en France est leur abondance sur le territoire. Alors que *H. marginatum* est largement établie dans les départements littoraux méditerranéens du sud de la France avec des populations parfois abondantes, *H. lusitanicum* était jusqu'à très récemment supposée avoir disparue du territoire suite à l'épizootie de myxomatose ayant décimé les populations de lapins de garenne dans les années 1950, et plus récemment avec la maladie hémorragique du lapin touchant aussi le lièvre. Pour les trois autres espèces de tiques, *Rhipicephalus bursa* ou *Dermacentor marginatus* sont largement présentes en France, avec une écologie qui pourrait favoriser la transmission du VFHCC, mais il n'existe pour l'instant aucune preuve tangible de leur compétence vectorielle. Pour *H. scupense*, également présente en France, le fait qu'il s'agisse d'une tique à un hôte se nourrissant du même bovin pendant tout son cycle de développement en fait un vecteur peu probable, sauf s'il existe une transmission transovarienne permettant la production de nouveaux adultes déjà infectés pour transmettre le VFHCC aux ongulés ou si le « co-feeding » existe pour cette espèce.

Une fois établi que la tique *H. marginatum* s'avère être à l'heure actuelle le meilleur candidat pour être vecteur de VFHCC en France, nous nous sommes intéressés aux préférences trophiques de cette tique dans le cadre du travail réalisé dans l'**article 1**. Parmi les tiques du genre *Hyalomma*, *H. marginatum* est la plus documentée, ce qui pourrait expliquer le nombre élevé d'hôtes vertébrés décrits comme nourriciers mais aussi la très grande diversité spécifique d'oiseaux sur lesquels cette tique peut être retrouvée aux stades immatures. Ainsi, il semble tout de même que cette tique soit à classer dans les tiques dites "généralistes" avec un très large panel d'hôtes. Bien que dans notre méta-analyse la nature des hôtes n'explique pas l'entièreté de l'hétérogénéité des associations tique-hôte mesurées dans la nature, certains groupes d'hôtes semblant être préférés, comme les oiseaux pour les stades immatures, en particulier les familles des Emberizidae (passereaux) et Strigidae (hiboux et apparentés) (au détriment des lagomorphes pour lesquels très peu de signalements d'infestation par *H. marginatum*

étaient rapportés), et les chevaux pour les stades adultes (les cervidés étant peut-être sur-estimés de par une erreur d'identification spécifique des tiques infestant ces animaux, à une certaine époque, en Espagne). Le fait que des associations préférentielles même ténues soient rapportées pour *H. marginatum* alors que le nombre d'espèces d'hôtes à son actif est élevé, et que ces associations préférentielles semblent parfois changer d'un pays à un autre (e.g. association préférentielle des stades adultes aux vaches en Turquie et aux chevaux en France et en Italie), suggère peut-être que *H. marginatum* est finalement une "généraliste" globale mais une "spécialiste" locale, c'est-à-dire avec des spécificités d'hôtes locales en fonction de la nature et de la composition des communautés d'hôtes disponibles sur place.

Du fait de cette grande tolérance et de la diversité des hôtes présents en France, la quête d'un hôte adapté ne constitue a priori pas une limitation à l'installation ou l'expansion de *H. marginatum* en France, mais pourrait avoir une influence sur ses choix de gorgement et ainsi sur le niveau de circulation du VFHCC qu'elle transmettrait, comme cela a été investigué dans l'article 2. Les stades immatures de *H. marginatum* se nourrissent, en apparence, principalement sur les oiseaux, et dans une moindre mesure sur des lagomorphes. Les oiseaux sont abondants et diversifiés en France, mais ils sont pour la plupart réfractaires au VFHCC, donc incapables de réinfecter des tiques. Les lagomorphes, quant à eux, sont de bons réplicateurs viraux, mais ils sont présents en faible densité dans le sud de la France malgré des campagnes de réintroductions et sont a priori rarement infestés par *H. marginatum* en Europe. De ce fait, en France, même si le VFHCC circule, il est peu probable que les hôtes des stades immatures de *H. marginatum* soient en mesure de l'infecter et qu'ils donnent des stades adultes infectés après la mue nymphale. Pour les stades adultes, les chevaux sont apparemment les hôtes préférentiels de *H. marginatum*, en particulier en Italie et France dont la Corse, et ils sont largement abondants dans le sud de la France. Ils sont susceptibles au VFHCC et peuvent développer une virémie, mais pas suffisante pour réinfecter de nouvelles tiques. *H. marginatum* peut également se gorger sur les bovins, mais moins fréquemment que sur les chevaux et encore moins sur les moutons, bien que ces deux espèces soient de bons amplificateurs de VFHCC. Elle est tout aussi peu attirée par les chèvres mais il n'existe aucune preuve que les chèvres soient de bons amplificateurs du VFHCC, comme les moutons. En ce qui concerne la faune sauvage, nos connaissances sont encore plus limitées. Le sanglier peut être infesté par *H. marginatum* et est abondant en France, mais aucune preuve n'est disponible concernant son rôle pour le VFHCC. Le cerf est supposé, en Espagne, être un bon amplificateur VFHCC car les tiques *H. lusitanicum* qui le parasitent fréquemment au stade adulte sont les plus infectées au VFHCC, mais il est par contre très rarement infesté par *H. marginatum* et n'est distribué que très localement, en forêt et donc hors des zones favorables à *H. marginatum*, dans le sud de la

France. Quant au chevreuil, et bien qu'il soit très abondant dans certaines campagnes françaises, rien n'est connu quant à son rôle pour *H. marginatum* et le VFHCC. Dans l'état actuel de nos connaissances et les communautés d'hôtes disponibles dans le sud de la France, si le VFHCC circule, on prédit également une faible probabilité de contamination des adultes de *H. marginatum* par gorgement, et donc une faible probabilité pour des femelles de transmettre le VFHCC à leur descendance par transmission transovarienne, ou à d'autres tiques par cofeeding, même si ces modes de transmission sont efficaces.

En appliquant toutes ces informations au contexte français, on suppose donc une prévalence d'infection au VFHCC chez *H. marginatum* faible à très faible. Or, les adultes de *H. marginatum* constituent le seul stade de développement qui infeste occasionnellement à l'homme et peut lui transmettre le VFHCC. Dans le contexte actuel français, compte-tenu des rares occasions précitées d'infection aux stades immatures pour donner des adultes infectés, on prédit comme très peu probable la contamination d'un homme par le VFHCC par piqûre de *H. marginatum*. Cette assertion doit toutefois être modulée, et des études complémentaires doivent être réalisées, car nous ne disposons pas d'informations sur l'exposition de l'homme en France aux piqûres de *H. marginatum*, facteur pourtant essentiel pour estimer le risque de transmission. En outre, le niveau de circulation enzootique du VFHCC et le risque d'émergence de cas humains en France pourraient changer dans le futur sous l'effet de certains facteurs identifiés dans l'article 2, comme certaines pratiques d'élevage ou d'usage des paysages sous l'effet des changements climatiques et de nouvelles contraintes économiques (e.g. intensification du parcours et envoi des animaux en estives pour pallier le manque de fourrages, retour aux élevages mêlant plusieurs espèces animales et plusieurs activités pour une meilleure stabilité financière, déprise agricole avec fermeture des habitats et pullulation de la faune comme les lagomorphes ou les cervidés…). Ces changements de pratiques peuvent augmenter l'exposition des animaux aux tiques, accroître la transmission virale par l'effet des communautés d'hôtes, ou favoriser la pullulation de tiques vectrices. La hausse des températures pourrait en outre avoir un effet direct en accélérant le cycle de développement des tiques, en particulier de *H. marginatum*, voire en favorisant la multiplication et la dissémination virale du VFHCC dans son vecteur hétérotherme. Enfin, en termes de surveillance de la FHCC en France, dans le cas où le virus circulerait déjà en France mais à bas bruit, il se pourrait que cette prévalence d'infection chez les tiques soit inférieure à notre seuil de détection virale et notre effort d'échantillonnage (en considérant la prévalence de VFHCC de 0,2% dans les tiques et une prévalence de la maladie inférieure à 0,1% en l'absence de cas humains, le calcul d'après Cicculli *et al.* (2022) indique qu'il faudrait analyser 3 800 tiques pour en trouver une positive), ce qui pourrait expliquer que les tiques *H. marginatum* collectées jusqu'à présent en Corse aient toutes

été trouvées négatives au VFHCC, et ce même s'il est possible de détecter au même endroit des anticorps contre le VFHCC chez des ruminants domestiques car ces derniers sont connus pour développer une immunité durable au VFHCC. C'est d'ailleurs pour cela que l'âge des animaux est un des principaux facteurs individuels favorisant la séropositivité pour le VFHCC, cette dernière étant le reflet des expositions cumulées d'un animal aux tiques infectées. La sérologie semble donc constituer un outil particulièrement sensible pour détecter précocement la circulation de VFHCC en France, outil que nous utiliserons au chapitre 2.

Chapitre 2 : Evaluation de la circulation de VFHCC en France par sérologie et déterminants de la transmission

Ce second chapitre porte sur l'évaluation, par des données de sérologie, de la circulation de VFHCC en France et des facteurs favorisant sa transmission. Avec les récents cas humains de FHCC en Espagne (Lorenzo Juanes et al. 2023), la présence d'anticorps chez la faune sauvage et domestique (Arteaga *et al.* 2020 ; Carrera-Faja *et al.* 2022 ; Espunyes *et al.* 2021) et la détection de VFHCC dans des tiques du genre *Hyalomma* de ce pays (Moraga-Fernández *et al.* 2021 ; Ana Negredo *et al.* 2019 ; Palomar *et al.* 2016), il est certain que le VFHCC circule déjà aux abords de la France. En raison des échanges de taureaux, de chevaux et de faune sauvage (oiseaux migrateurs, sangliers, lapin ibérique) entre ces zones et de la présence déjà avérée de la tique *H. marginatum* en France, nous supposons que le VFHCC circule déjà sur notre territoire, ou à défaut, qu'il présente un risque élevé d'introduction.

Les taux de tiques infectées par le VFHCC étant extrêmement faibles, même en zones d'endémie (0,50% à 3,70%) (Vincent Cicculli, Maitre, et al. 2022), et les virémies chez les animaux étant particulièrement courtes, la sérologie semble être un meilleur indicateur de transmission et circulation du virus que la détection virologique, en particulier pendant la phase d'installation précoce en l'absence de cas humains, puisque quasiment tous les hôtes de *H. marginatum* (sauf la majorité des oiseaux) sont susceptibles au VFHCC et développent une réponse immunitaire durable. De ce fait, on peut considérer que la séroprévalence pour un groupe d'animaux d'un même endroit ou d'une même espèce est le reflet de leur exposition relative aux tiques infectées, et donc constitue une estimation du niveau de transmission du VFHCC. Ainsi, sous l'hypothèse que les chevaux et les vaches constituent les hôtes préférentiels des *H. marginatum* adultes (voir chapitre 1), on prédit de plus fortes séroprévalences chez ces espèces, la sérologie chez ces dernières devenant alors particulièrement adaptée pour surveiller la circulation précoce de VFHCC. Sous cette même hypothèse de préférences trophiques différentielles chez *H. marginatum*, on prédit que des séroprévalences différentes selon l'espèce animale considérée seront observées. D'après les deux revues de la littérature présentées en chapitre 1, on prévoit de plus fortes séroprévalences chez les vaches ou les chevaux que chez les petits ruminants, les sangliers et les cervidés qui sont rarement infestés par cette tique. C'est d'ailleurs ce qui a été observé en Corse lors de la première enquête sérologique réalisée en 2014-2016, avec 13% de bovins et seulement 2-3% de petits ruminants séropositifs sur l'ensemble de l'île (Grech-Angelini, Lancelot, et al. 2020). En fonction des résultats que nous obtiendrons, et malgré les limites d'échantillonnage parfois rencontrées, cela pourra aussi renseigner quant au rôle de ces hôtes dans la circulation du VFHCC, via leurs contacts avec des tiques vectrices infectées.

En France, deux cas de figures peuvent être distingués : (i) la Corse où de premiers résultats sérologiques (confirmés en séroneutralisation en laboratoire P4) suggèrent une circulation de VFHCC sur l'île, sans savoir si cette circulation perdure dans le temps et aux mêmes endroits, et (ii) la France

continentale où aucune enquête sérologique n'a pour l'instant été réalisée. Pour ce dernier aspect, la technique d'analyse ELISA qui indique la plus ou moins forte quantité d'anticorps dans l'échantillon par la mesure d'une densité optique (DO), a été utilisée (ID Screen® CCHF DAM ELISA). Si la sérologie est indicative du niveau de contact des animaux avec les tiques vectrices infectées, plus ces tiques sont présentes et abondantes depuis plusieurs décennies comme c'est le cas en Corse, plus les opportunités de piqûres infectieuses sont supposées fréquentes, ce qui se traduirait par des séroprévalences élevées et une production plus importante et durable d'anticorps anti-VFHCC par stimulations répétées du système immunitaire. En revanche, sur le continent, où la présence de la tique *H. marginatum* est a priori plus récente et où on suppose qu'elle n'a pas encore utilisé toute sa niche écologique, avec certaines populations peut-être encore instables et faiblement abondantes, nous nous attendons à des séroprévalences plus faibles, voire nulles si le VFHCC ne circule pas encore, et des DO chez les animaux séropositifs également moins élevées. Dans l'hypothèse que notre étude révèle de l'hétérogénéité quant au statut sérologique des animaux, que ce soit au niveau individuel ou à certaines échelles spatiales, il est intéressant d'aller questionner les déterminants de la circulation de VFHCC en France, tels que pré-identifiés dans le chapitre 1. En Corse, les données de la nouvelle enquête sérologique sont présentées en première partie du chapitre et les perspectives de recherche de facteurs explicatifs seront discutées dans la partie conclusions et perspectives, car nécessitant des enquêtes complémentaires n'ayant pu être entièrement réalisées durant ma thèse. Ce travail d'analyse sérologique de la faune domestique et sauvage du continent, et de recherche de facteurs explicatifs, a fait l'objet d'un article dont je suis premier auteur, intitulé "**First detection of Crimean Congo Hemorrhagic Fever antibodies in cattle and wild fauna in southern continental France: investigation of explicative factors**" et présenté ci-dessous (article 3), encore en cours d'écriture et qui sera soumis à l'automne 2023 au journal "Emerging Infectious Diseases". Ces travaux ont fait l'objet de trois présentations orales, au congrès « Tiques et Maladies à Tiques » en Mars 2022, au Groupe de Travail sur les risques liés aux *Hyalomma* et à la FHCC en Juin 2022 et enfin à l'ADILVA en Octobre 2022

Concernant la méthodologie pour réaliser l'enquête sérologique chez la faune domestique (en Corse et sur le continent), il a été décidé de sélectionner et d'analyser des sérums de bovins issus de la prophylaxie annuelle car ces échantillons sont déjà disponibles et ne nécessitent pas de réaliser une campagne d'échantillonnage dédiée. Ces sérums sont récupérés auprès des laboratoires départementaux d'analyses, s'ils acceptent de participer à l'étude, lorsqu'ils ont terminé les tests à réaliser pour la prophylaxie annuelle, c'est-à-dire entre 6 mois à 1 an après la fin de la saison de prophylaxie. Par contre, les sérums restent la propriété de l'éleveur auquel appartiennent les vaches et nécessitent l'acceptation éclairée de ce dernier pour l'analyse réalisée sur ses sérums. De même, les

sérums sont récupérés avec des Documents d'Accompagnement de Prélèvements (DAP), informant sur l'exploitation et l'éleveur, ce qui implique un processus de protection des données personnelles suivant le Règlement Général sur la Protection des Données (RGPD). Afin d'obtenir l'acceptation éclairée des éleveurs, j'ai collaboré avec les Groupements de Défense Sanitaire (GDS) des différents départements concernés par notre étude. Pour cela, il a été convenu de déposer sur chaque DAP un bordereau d'acceptation à destination des éleveurs que les vétérinaires sanitaires faisaient signer lors de leur passage pour la prophylaxie. La mise en place de cette démarche ainsi qu'une politique de protection des données personnelles avec le service juridique du CIRAD a pris plusieurs mois de travail. Enfin, sur le continent lorsqu'il n'a pas été possible de récupérer tous les bordereaux d'acceptation signés et où l'échantillonnage des communes n'a pu être exhaustif, la représentation spatiale des données de séroprévalence par commune a subi une transformation par création de polygones de Voronoï (les polygones de Voronoï créent des frontières qui séparent l'espace en cellules autour du centroïde de chaque commune ; dans chaque cellule, tous les points sont plus proches du centroïde associé que de tous les autres centroïdes). Ces polygones ont permis d'obtenir des entités épidémiologiques comparables aux communes mais ne suivant pas leurs délimitations, empêchant l'identification des élevages qui seraient uniques dans leur commune. Pour ce qui est de la faune sauvage, une collaboration avec la Fédération Nationale de la Chasse (FNC), et certaines fédérations départementales ayant accepté de participer à l'étude, a permis de récupérer des sérums de faune issus de sérothèques pré-existantes dédiées à la surveillance sanitaire de maladies émergentes dans la faune sauvage. L'analyse réalisée en faune sauvage a fait l'objet d'un stage de Master I Eco-Epidémiologie (Valentin Chauvin) que j'ai co-encadré au printemps 2022. Que ce soit pour la faune domestique ou sauvage, il faut garder à l'esprit que la réception d'échantillons était soumise au bon vouloir des laboratoires et fédérations de chaque département, ce qui a parfois limité l'exhaustivité de mon enquête. Par contre, pour les départements ayant accepté l'étude, dans la mesure du possible, un sous-échantillonnage des sérums a été réalisé afin d'avoir la meilleure représentativité spatiale, en termes d'élevages testés. En effet, l'objectif étant de détecter des anticorps anti-VFHCC dans les élevages et en connaissant le niveau de circulation en Corse, nous avons évalué le nombre d'échantillons à tester par élevage (en étudiant tous les élevages d'un département quand cela est possible) nous permettant la détection d'anticorps quand le virus semble circuler. Tous les sérums ont été analysés selon la même procédure, à l'aide du kit ELISA (ID Screen CCHF Double Antigen Multispecies) commercialisé par Innovative Diagnostics (ex-IdVET) (Sas et al. 2018), et une partie d'entre eux ont été confirmés par séroneutralisation par l'IRBA (Institut de Recherche Biomédicale des Armées) au laboratoire P4 de Lyon, comme dans l'enquête précédemment réalisée en Corse. Pour le continent, afin de tester l'effet

de certains facteurs pré-identifiés dans le chapitre 1, j'ai réalisé un modèle linéaire généralisé à effet mixte (effet fixe des facteurs à tester et effets aléatoires emboîtés des départements, communes et élevages) pour expliquer la séropositivité de chaque animal. A partir de bases de données existantes comme la BDNI (Base de Données Nationale d'Identification), j'ai pu obtenir des informations individuelles concernant les bovins (âge, sexe, race) et leur exploitation (élevage d'origine, mais aussi sur leurs mouvements entre exploitations au cours de leur vie). L'article de Bah *et al.* (2022) étudiant la distribution géographique de *H. marginatum* en France m'a permis d'obtenir des données et prédictions de présence de cette tique pour le continent, ainsi que des données climatiques et d'habitat permettant de caractériser les environnements pouvant favoriser la présence de tiques vectrices, dont *H. marginatum*.

I- La situation en Corse

a. Faune domestique

D'après l'enquête sérologique réalisée entre 2014-2016, nous savons d'ores et déjà que le VFHCC semble circuler en Corse (Grech-Angelini, Lancelot, et al. 2020), et ce bien que le virus n'ait pas encore été détecté chez les tiques (Vincent Cicculli, Maitre, et al. 2022). L'étude avait montré une séroprévalence individuelle (toutes espèces confondues) de 9% sur l'ensemble de l'île, avec une séroprévalence plus élevée (13%) pour les bovins que pour les ovins et les caprins (2-3%). Cette différence pouvait entre autres s'expliquer par les préférences trophiques de la tique *H. marginatum*, qui semble parasiter plus fréquemment les bovins que les petits ruminants et donc avoir plus d'occasions d'infecter des bovins (Grech-Angelini et al. 2016). Une zone de plus forte circulation virale, s'exprimant par des séroprévalences par commune plus élevées, était identifiée au nord-ouest de l'île, en Balagne et en Centre-Corse, de l'Ile Rousse à Cargèse et jusqu'à Corte dans les terres, ainsi que dans la zone d'Ajaccio à l'ouest et celle autour de Sartène au sud-ouest (Figure Corse).

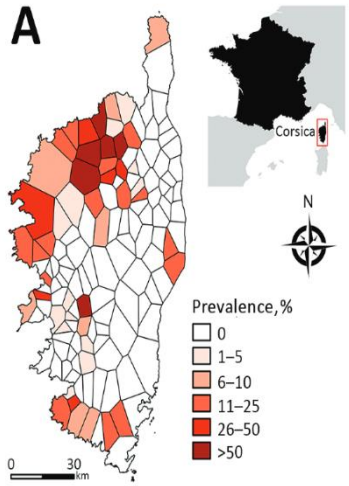


Figure Corse : Variabilité spatiale de la prévalence des anticorps anti-CCHFV

Dans la présente étude, mon objectif était en premier lieu de confirmer la pérennité de cette circulation virale et de déterminer la séroprévalence à l'échelle de la commune, qui constituait comme précédemment notre unité épidémiologique. Nous avons donc, tout d'abord, décidé de concentrer nos efforts sur les vaches puisque cette espèce animale présentait en 2014-2016 de plus fortes

séroprévalences, maximisant ainsi les chances de détecter de la circulation virale. La précédente étude montrant une forte hétérogénéité spatiale entre élevages au sein d'une même commune, avec des élevages pourtant proches pouvant être totalement indemnes à fortement séropositifs avec jusqu'à 45% d'animaux séropositifs, il a été préféré un sous-échantillonnage aléatoire stratifié par l'élevage. Afin d'être le plus exhaustif possible spatialement, pour cette nouvelle enquête, toutes les communes présentant des élevages bovins étaient si possible échantillonnées. En outre, au lieu de ne prendre que 3 élevages par commune comme en 2014-2016, où pourtant la probabilité de ne pas détecter une commune infectée était déjà considérée comme faible (Grech-Angelini, Lancelot, et al. 2020), 6 élevages ont été sélectionnés par commune lorsque cette dernière en contenait plus (en sachant que sur 298 communes possédant des élevages bovins, seulement 13% avaient plus de 6 exploitations) et sinon la totalité des élevages était testée. Concernant le nombre d'animaux à tester par exploitation, ce dernier restait fixé à 10 car c'est le nombre de bovins testés par élevage dans le cadre de la prophylaxie annuelle en Corse. Toutefois, dans les fermes positives, les séroprévalences bovines intra-élevage variant entre 31% et 45% (Grech-Angelini, communication personnelle), la probabilité de rater un animal séropositif dans un élevage était très faible (ce qui nous permet, avec une prévalence globale estimée de 13% de détecter au moins un animal positif). Enfin, lorsqu'une commune ne possédait pas d'exploitation bovine mais avait des élevages de petits ruminants, les sérums de ces derniers étaient alors testés, en augmentant le nombre de sérums testés à 25 (comme dans l'étude de 2014-2016) puisque la séroprévalence estimée était plus faible pour cette espèce.

Au final, nous avons obtenu des laboratoires départementaux d'analyses 6 072 sérums (5 722 sérums bovins et 350 sérums de petits ruminants : 225 ovins et 125 caprins), dont 4 252 de Haute-Corse et 1 820 de Corse-du-Sud. Dans la présente étude réalisée en 2019-2020, un plus grand nombre de communes a été étudié (71% des communes de l'île ayant des ateliers d'élevage contre 45% en 2014-2016) et nous obtenons ainsi une meilleure couverture spatiale (Figure 23).

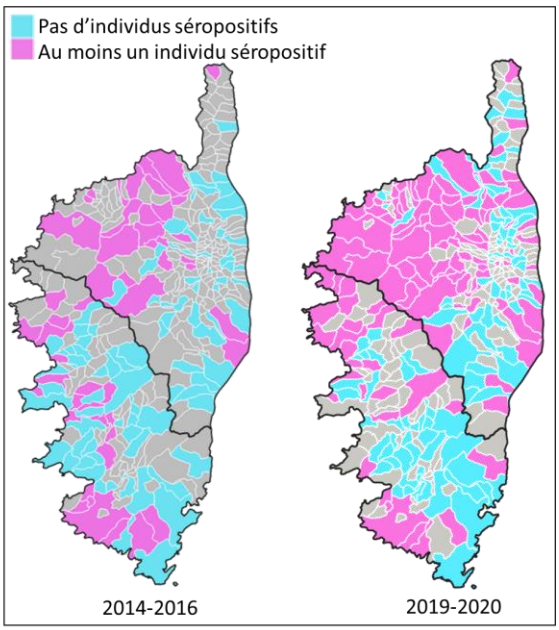


Figure 23 : Statut des communes corses vis-à-vis de la présence d'anticorps contre le VHFCC en 2019-2020 (en comparaison à 2014-2016). Les communes restées en gris sont celles ne présentant aucun élevage bovin ou de petits ruminants en 2019-2020. Les communes colorées sont celles où des sérums d'animaux ont été testés, avec en rose les communes avec au moins un animal séropositif et en bleu les communes où tous les animaux testés étaient séronégatifs.

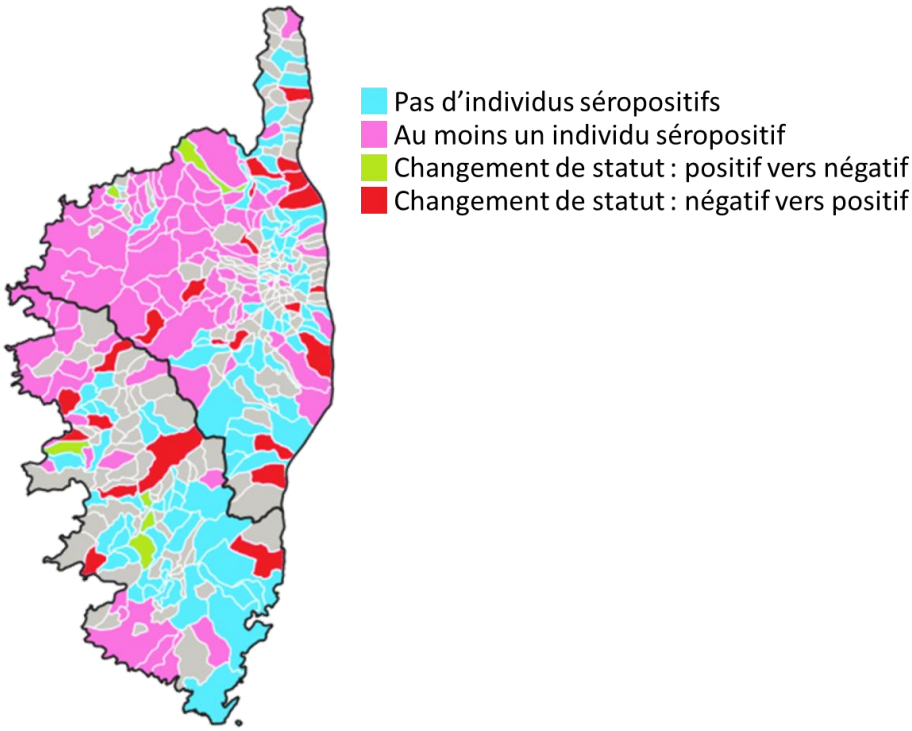


Figure 24 : Évolution du statut des communes en 2019-2020 par rapport à la campagne 2014-2016. Les communes restées positives sont en rose et celles restées négatives sont en bleu. Les communes en vert sont celles où le statut est passé de positif à négatif et celle en rouge où le statut est passé de négatif à positif.

Concernant le statut infectieux des communes, il a peu changé pour les communes ayant été échantillonnées aux deux périodes d'étude (Figure 24). Ainsi, seulement 6 communes (en vert sur la Figure 24) qui avaient au moins un animal séropositif en 2014-2016 sont devenues négatives. Ceci peut, sans doute, s'expliquer par le fait que nous n'avons pas nécessairement analysé les sérums des mêmes animaux et/ou des mêmes élevages. Par ailleurs, il y a 21 communes (en rouge sur la Figure 24) qui étaient négatives en 2014-2016 et qui sont devenues positives en 2019-2020. Encore une fois, il faudrait savoir s'il s'agissait des mêmes individus prélevés ou non, ce qui n'est pas faisable car les données de 2014-2016 avaient été anonymisées en amont et ne permettaient pas l'identification des animaux prélevés ou encore des élevages. En outre, plus d'élevages par commune ont été testés en 2019-2020 qu'en 2014-2016, augmentant ainsi les chances de détecter au moins un élevage avec un animal séropositif au sein d'une commune. Une autre hypothèse est une circulation récente du VFHCC dans ces communes. Étant donné que 5 ans se sont écoulés entre les deux enquêtes, il y a de fortes chances que de nouveaux animaux, qui n'étaient pas encore nés en 2016, aient été prélevés en 2019-2020 et que les résultats indiquent plutôt que le virus circule maintenant dans ces communes. Au vu du peu d'échantillons de petits ruminants, nous parlerons dans la suite de la partie uniquement des résultats issus des sérums bovins.

En termes de séroprévalence, là aussi, la situation n'a pas beaucoup évolué, bien que la séroprévalence ait légèrement augmenté chez les bovins (16,3% sur l'ensemble de l'île en 2019-2020 contre 13% en 2014-2016). Cette séroprévalence est plus élevée en Haute-Corse avec 17,1% contre 11% pour la Corse-du-Sud. On observe toujours le même groupement spatial, avec des communes à plus fortes séroprévalences, au nord-ouest de l'île jusqu'à Cargèse et dans la région de Sartène (Figure 25).

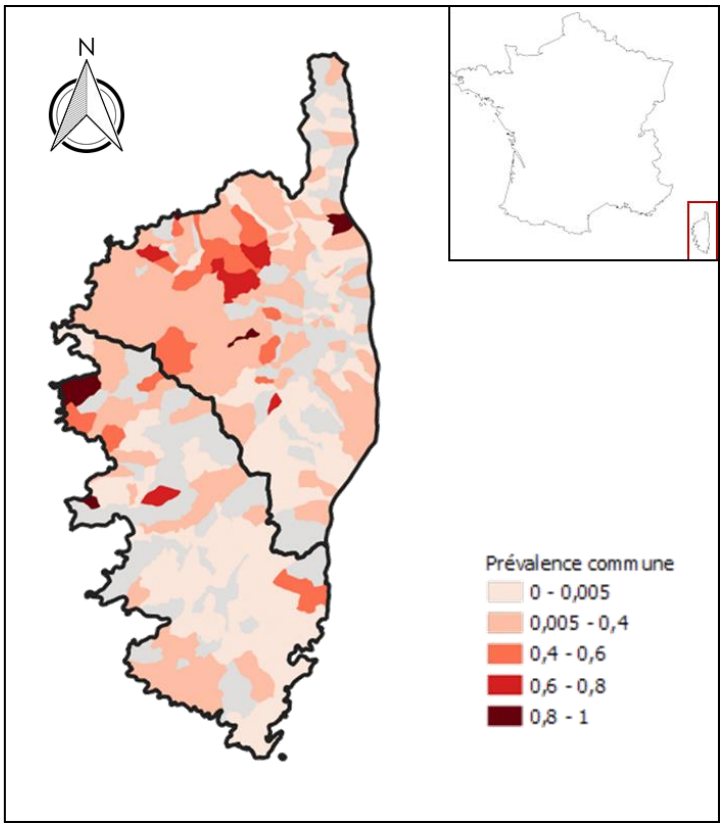


Figure 25 : Séroprévalence moyenne au VCCHF par commune, en Corse, en 2019-2020, avec des communes en rose pâle avec très peu ou pas d'animaux séropositifs vers des communes en rouge foncé et bordeaux où 60 à 100% des animaux peuvent être séropositifs. Les communes grisées n'ont pas été échantillonnées.

Toutefois, au sein de cette zone à forte transmission enzootique de VFHCC, une grande hétérogénéité spatiale existe localement entre exploitations à l'intérieur d'une même commune, comme l'indique la carte de la Haute-Corse ci-dessous (Figure 26). Une commune comme Pietralba, avec une séroprévalence intra-commune forte, présente pourtant au moins un élevage négatif, et un faiblement positif. A l'inverse, une commune comme Manso présente une séroprévalence intra-commune moyenne, du fait d'un élevage avec 70% de ses animaux séropositifs tandis que les deux autres élevages de la commune sont négatifs. La séroprévalence intra-élevage moyenne en Haute-Corse est de 20%. Cette répartition suggère que la transmission du VFHCC est locale et que des facteurs propres aux élevages (pratiques d'élevage, environnement biotique et abiotique, ou zones exploitées par les animaux) favorisent plus ou moins la circulation virale au sein de ces exploitations. En termes de surveillance, cette répartition confirme aussi l'intérêt d'augmenter le nombre d'élevages échantillonnés par commune, comme cela a été fait en 2019-2020 par rapport à la campagne précédente, afin de pouvoir détecter au moins un élevage séropositif. Au vu des séroprévalences intra-élevages, 10 bovins prélevés par élevage semble permettre de détecter sérologiquement quasi systématiquement la circulation virale au sein d'un élevage (car supérieure à 10% soit 1 animal sur 10).

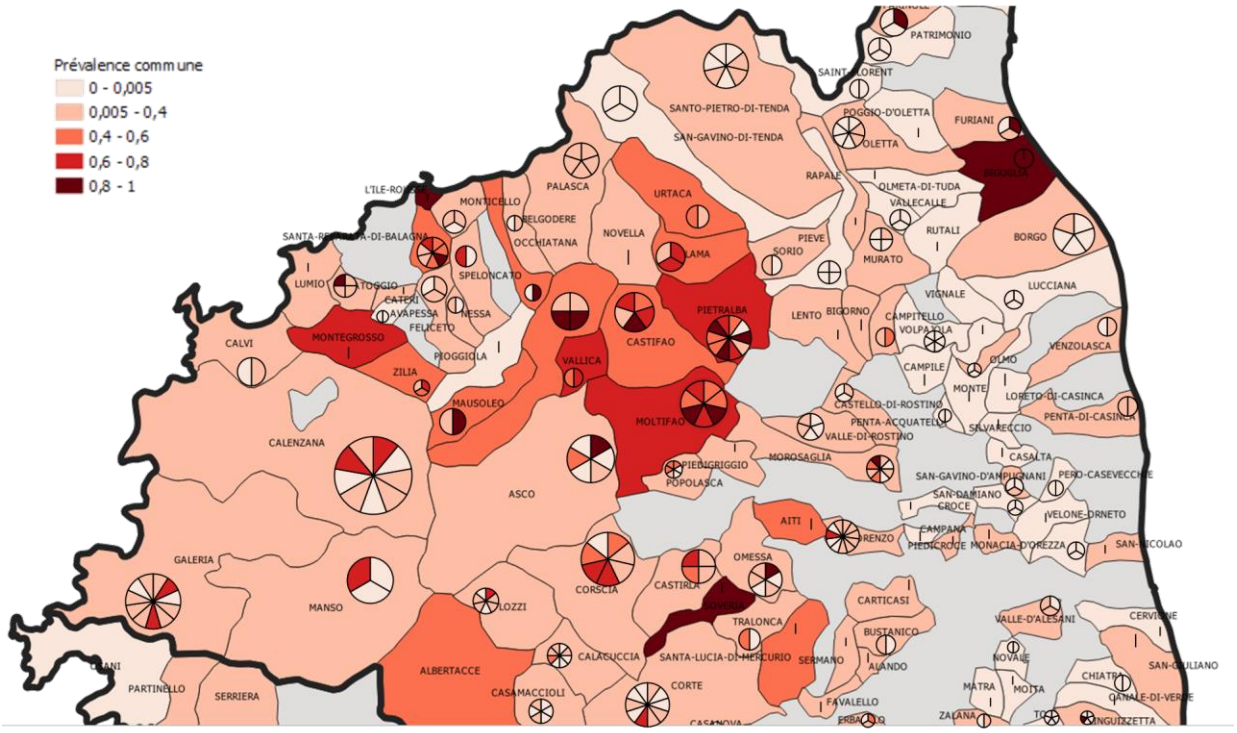


Figure 26 : Séroprévalences par commune et par élevage au sein des communes, dans la zone de forte circulation de VFHCC au Nord-Ouest de la Corse. Les communes sont colorées en gradient de rouge pour représenter des séroprévalences intra-communes croissantes. Les élevages sont représentés par des diagrammes circulaires (un quartier = une exploitation) au sein de chaque commune et le même code couleur que les communes a été attribué pour les séroprévalences intra-élevages.

Lorsque l'on regarde les DO des sérums de Corse testés par ELISA, les échantillons séropositifs et séronégatifs forment deux populations bien distinctes et largement éloignées de part et d'autre du seuil de détection de l'ELISA (Figure 27). Les échantillons séronégatifs présentaient une distribution groupée (médiane = 3,9). Les échantillons séropositifs présentaient un seul profil avec des DO très élevées et homogènes (médiane = 127,2).

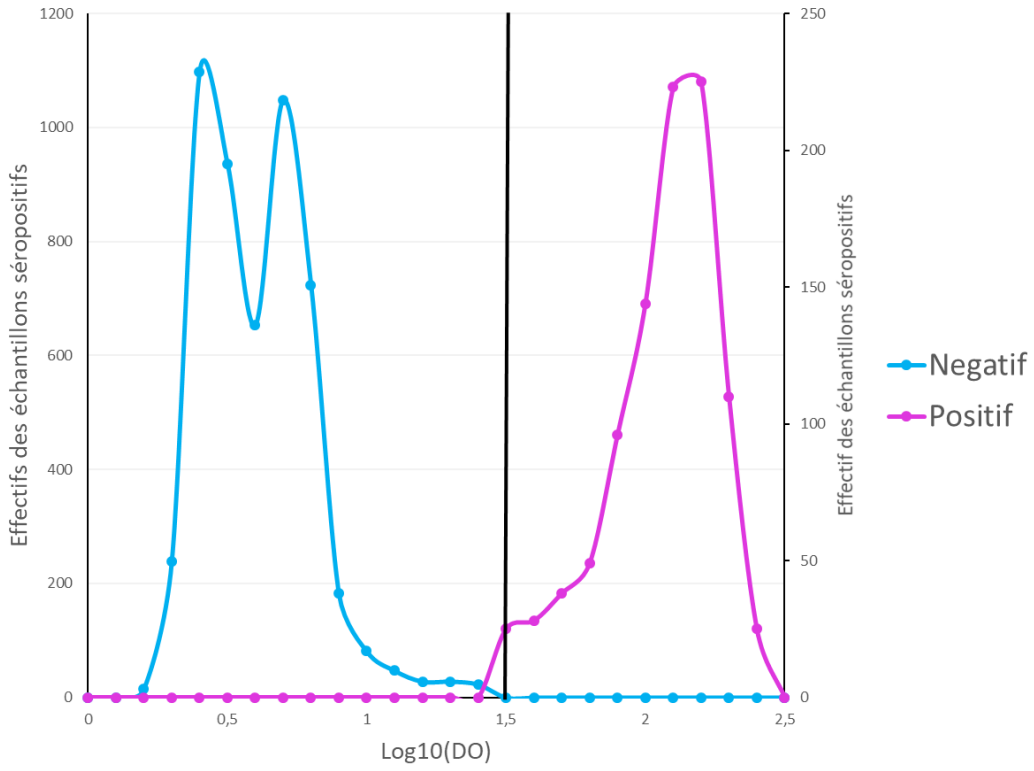


Figure 27 : Distribution des valeurs de Densités Optiques (DO) obtenues par ELISA VFHCC pour les sérums de bovins corses, en 2019-2020, avec en bleu les animaux considérés comme séronégatifs et en rose ceux considérés comme séropositifs par le test.

b. Faune sauvage

Nous avons également reçu des échantillons de faune sauvage (n = 131) dont 4 sérums de lièvres et 127 sérums de sangliers. Parmi eux, seulement trois échantillons de sangliers étaient séropositifs avec des DO élevées (médiane = 131,82). Les 128 autres échantillons, séronégatifs, montraient des valeurs de DO faibles (médiane = 6,72), comme pour la faune domestique. Malheureusement, pour une grande majorité de ces échantillons (n = 113), les données de localisation qui auraient permis de réaliser une carte de distribution des échantillons analysés étaient indisponibles.

II- La situation en France continentale

Article 3 :

First detection of Crimean Congo Hemorrhagic Fever antibodies in cattle and wild fauna of southern continental France: investigation of explicative factors

Bernard C[1,2,3]; A. Apolloni1,[1,2]; V. Grosbois [1,2]; A. Peyraud [1,2]; P. Saengram [1,2]; F. Jori [1,2]; E. Faure[8], N. Keck[6], R. Pin[7], O. Ferraris[4], L. Comtet[5], B. Combes[3], M. Bastien[3], V. Chauvin [1,2]; L. Guerrini [1,2], P. Holzmuller[1,2], L. Vial [1,2]

1 CIRAD, UMR ASTRE, Montpellier, France.

2 ASTRE, Univ Montpellier, CIRAD, INRAE, Montpellier, France

3 ELIZ, Nancy, France

4 Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Brétigny-sur-Orge, France

5 ID.Vet, Montpellier

6 Department Veterinary Laoratory of Hérault, Montpellier, France

7 Department Veterinary Laboratory of Alpes-Maritimes, Nice, France

8 FNC

Citation: Bernard C, A. Apolloni, V Grosbois, A Peyraud, P Saengram, F Jori, E Faure, N Keck, R Pin, O Ferraris, L Comtet, B Combes, M Bastien, V Chauvin, Laure Guerrini, P Holzmuller, L Vial (in prep). First detection of Crimean Congo Hemorrhagic Fever antibodies in cattle and wild fauna of southern continental France: investigation of explicative factors

Introduction:

Crimean-Congo Haemorrhagic Fever (CCHF) is a tick-borne zoonosis, caused by the infection with a RNA virus of the *Nairovirus* genus and *Bunyaviridae* family (1). CCHF is the most widespread tick-borne disease worldwide (2), which occurs in Africa, the Middle East, the Balkans, and Central Asia (3,4). Its emergence into new areas such as India and Pakistan, as well as western Europe like Greece and Spain, over the last two decades is a public health concern (3,5,6). Humans are contaminated through tick bites, or when they are exposed to blood or infected tissues of viremic animals, or infected persons (WHO). Only a part of infected people will develop symptoms, with a first phase of fever, tremors, myalgia, headache, nausea and vomiting, abdominal pain and arthralgia, and sometimes complications with internal and external bleedings as well as ecchymosis; mortality of infected people varies between 9 to 50%, depending on the earliness of treatments and the virulence of the viral strain (7,8). In contrast, the infection of wild or domestic animals with the Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Virus (CCHFV) does not cause any clinical signs, although most of these animals are able to be viremic and develop a humoral immune response (9). However, these animals can play essential roles in CCHFV transmission, in either the amplification of tick vector populations, the replication of CCHFV to reinfect new tick vectors, or the spread of infected ticks (10,11). Animals can be contaminated only by the bite of infected ticks, and this circulation of the virus between vertebrate animals and ticks constitutes the enzootic natural transmission cycle of CCHFV (12). Among these animals, those that are likely hosts of tick vectors such as cattle have much more occasions to be bitten by infected ticks and to develop immune response after viremia; using serological test to detect antibodies, they are considered to be useful indicators of CCHFV circulation in a naïve area (12). CCHFV genome has been detected in many tick species worldwide but only ticks of the genus *Hyalomma* (with *H. marginatum* and *H. lusitanicum* as likely vectors in southern Europe) are considered best competent vectors for CCHFV (13, Bonnet et al., 2022). Regarding their ability to maintain the virus for several months or years, and their competence for horizontal but also transovarial transmission, as well as cofeeding, ticks are vectors but also the natural reservoirs of CCHFV (14). Thus, the geographical distribution of CCHFV used to coincide with that of tick vectors (15) and can be extended through the introduction and establishment of infected ticks into new suitable territories, by either migratory birds or human-driven long-distance displacements of livestock. CCHF has recently emerged in western Europe, with virus genome detected as soon as 2010 in *Hyalomma* ticks in Spain (16,17) and the annual reporting of a few human cases linked to the bite of an infected tick in this country since 2016 (18). Antibodies against CCHFV have been detected in the neighborhood of France, in cattle and wildlife in Spain (19,20) but also in bovine sera from Italy where antibodies have

been detected in 1.89% at animal-level and 26.63% at herd-level (21). In addition, a serological survey was conducted on domestic ruminants in Corsica, a French island southeast of the mainland, between 2014 and 2016, and detected about 9% of positive animals (cattle, sheep ang goat) among 4,000 tested (22). Although detection and isolation of the virus in ticks are lacking to definitively confirm its presence in France (23,24), the presence of anti-CCHFV antibodies in animals has been confirmed. No studies have been carried out in Corsica to determine the factors influencing seroprevalence, but research in this field has been carried out in other countries, and has identified a number of factors (e.g. grazing system, age) (25,26). In the state of our current knowledge, this may suggest CCHFV circulation in Corsica, but the epidemiological situation remains still unknown on mainland France.

Given the recent establishment of the known tick vector *H. marginatum* on southern coastal areas of mainland France (27,28), it seems important to question the possible transmission of CCHFV in this region, at least within the natural enzootic cycle. Thus, we conducted a first serological study in cattle and wild fauna in different areas of the French Mediterranean rim, in order to detect antibodies against CCHFV and estimate individual seroprevalences in animals as indicators of CCHFV circulation levels. Using a correlative approach, we also aimed to identify individual, environmental and anthropogenic determinants associated with CCHFV transmission.

Materials and methods

Study area/period and sample selection

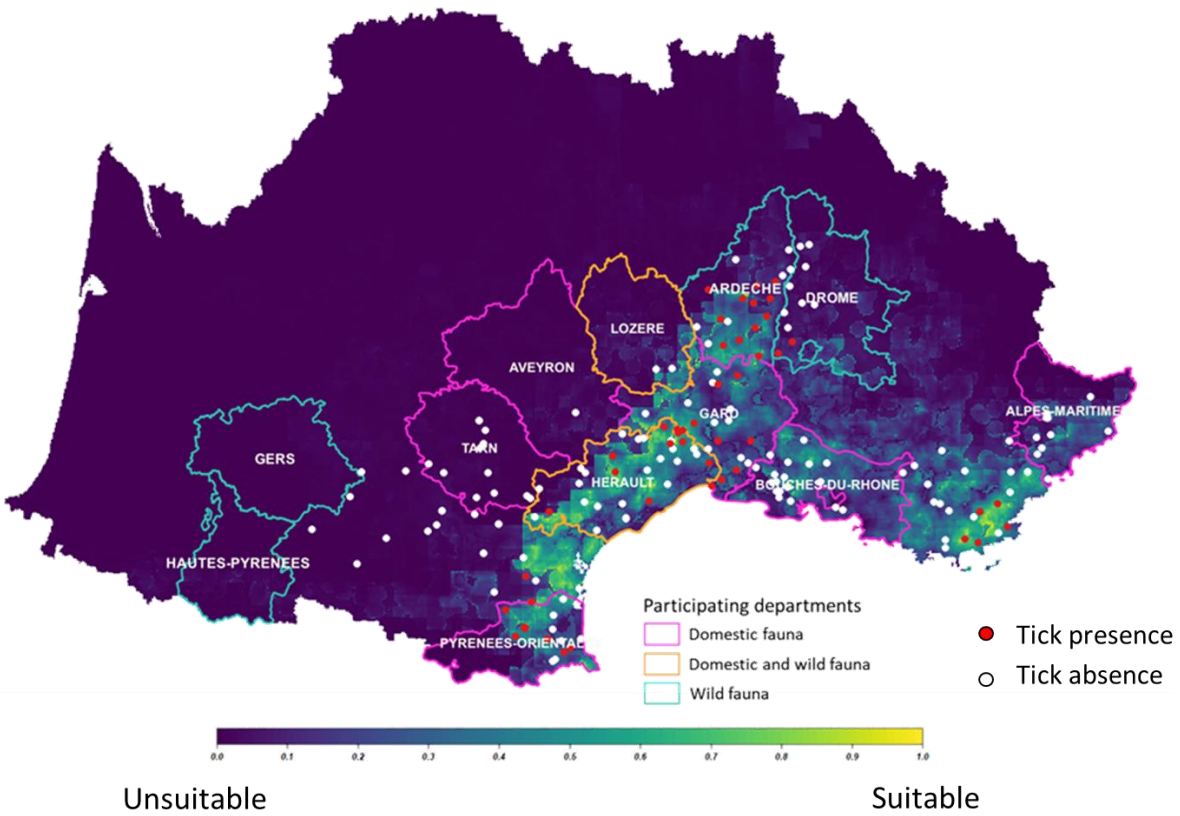


Figure 1 : Study area of the various participating departments in domestic and/or wild fauna. In the background, the map predicted probability of presence for *H. marginatum* in the South of France, using the most parsimonious model (dark blue: null probability to bright yellow: highest probability). Red circles represent the observed presences and white circles observed absences from testimonies and surveys. Adapted from (28).

The study area was focused on the South of France, in areas known for the presence of the CCHFV tick vector *H. marginatum*, or close to predicted zones to become suitable for its establishment, in the more or less long term, due to climate changes (27, 28). This area is located between Spain and Italy, where *H. marginatum* is widely distributed, and CCHFV has been confirmed to circulate and cause human cases in Spain (29) (Figure 1). Within this area, a special attention was given to departments (corresponding to NUTS-3 administrative division in the European nomenclature) and municipalities (lower division within departments) belonging to local clusters of tick presence, but also to some localities where *H. marginatum* was a priori absent (Figure 1), as the establishment process of this exotic tick species is still ongoing (28). Although this is not the area with the highest cattle density in France, southern France is still home to a large number of cattle, particularly suckler cows for meat marketing. There are also a number of local breeds, such as fighting bulls and cows in Camargue (Bouches-du-Rhône).

Sera from cattle were selected among those collected during the national prophylaxis program. Indeed, as part of the surveillance of regulated animal diseases in France, domestic ruminants, including cattle, are blood sampled each year, during winter, to be serologically tested for several pathogens. Collection of blood samples is conducted in each French department by designated veterinarians, and sera are analyzed by official veterinary departmental laboratories. For our study, we thus needed the agreement of laboratories to participate and deliver samples after their use, and selection of samples first depended on their own sample management and storage policy. Considering this primary constraint, a subsampling of sera was conducted, in order to obtain large spatial covering in concerned departments and be able to detect positive farms and estimate animal seroprevalence at least at municipality level. A previous CCHF serological survey in Corsica showed spatial heterogeneity of seroprevalence at both municipality and farm levels (22). This could be related to *H. marginatum* distribution, although this tick seems to be largely present and abundant in many Corsican areas (30). On the mainland, as *H. marginatum* is distributed in spatial clusters and seems to continue spreading, we predicted small local foci of CCHFV circulation if existing, with no assumption on the level of spatial heterogeneity. For this reason, in participating departments, all municipalities with cattle farms were included when possible and all farms in these municipalities (or at least 6 farms per municipality) were tested, as more than 25% of Corsican farms had at least one positive cattle in the previous study (Grech-Angelini, personal communication) but we expected a much lower proportion of infected farms on the mainland. In each farm, the number of sera was limited to 5-10 animals, which was considered enough to conclude on the epidemiological status of farms, as the estimated individual seroprevalence in positive farms was higher than 30% in the Corsican serological survey (Grech-Angelini, personal communication). Sera were selected from three successive prophylaxis campaigns (2018-2019, 2019-2020, and 2020-2021) (Table 1) to cover as many farms as possible, according to available samples in laboratories. Only for Pyrénées-Orientales, a second 2021-2022 prophylaxis period was added to complete our sera sampling. In our analysis, because CCHFV antibodies remain for several months, even years, in most vertebrate animals (9), we considered all these successive years as the same single period. In case of rare animals that were sampled twice, we considered their last serological status, as no animal became seronegative from one year to the other but a few ones seroconverted.

Sera from wild fauna were obtained from some departmental hunting federations that accepted to participate in the study, under the aegis of the national federation (Figure 1). As part of French sanitary monitoring of wildlife, sera from wild animals have been collected annually since 2008, for further analyses in case of emerging health issues. In participating departments, all available sera of wild boar (*Sus scrofa*), mouflon (*Ovis orientalis*), red deer (*Cervus elaphus*), roe deer (*Capreolus capreolus*) and

fox (*Vulpes vulpes*), which can host adult stages of *H. marginatum* (31), were tested for CCHFV antibodies. Although departments have begun their sanitary monitoring at different times, they all have continued these last years and provided us recent sera samples, except Ardèche for which we obtained a few sera collected between 2009 and 2012 (Table 2).

Ethic statement:

Furthermore, our study was strengthened by the willing participation of farmers, who consented to the analysis of sera collected from their livestock for the detection of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) antibodies. To ensure the privacy and confidentiality of data, robust data protection measures were implemented during sample handling, storage, and analysis. Ethical considerations extended to the use and conservation of these precious samples, in alignment with established guidelines. For visual representation of our findings, a Voronoi diagram was employed, which effectively obscures the identification of specific municipalities. Given the variability in sample availability across regions, Voronoi polygons were employed to delineate regional boundaries. This innovative approach facilitated the estimation of seroprevalence distribution, providing valuable insights into the spatial dynamics of CCHF exposure.

Serological analysis of samples

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

All sera selected from cattle and wildlife were tested for the presence of IgG and IgM antibodies against CCHFV, using a double-antigen ELISA kit (ID Screen CCHF Double Antigen Multispecies, Innovative Diagnostics (formerly IdVet, https://www.innovative-diagnostics.com) according to the manufacturer's instructions. For this kit, the 95% CI for sensitivity is 96.8%–99.8%, and 95% CI for specificity is 99.8%–100% (32). A reference serum of an immunized sheep against CCHFV, provided by the manufacturer, was used as an internal positive control to standardize experiments. For each sample, the S/P (Sample / Positive control) percentage was calculated as follows: S/P% = ODsample / ODpositive control, with OD as the Optical Density or absorbance of the colorimetric immuno-enzymatic reaction. Samples with S/P%<30% were considered negative and those with S/P%>=30% were considered positive.

Pseudo-Plaque Reduction Neutralization (PPRN)

In order to confirm serological results obtained by the ELISA test, we sent part of our ELISA-positive sera as well as 10 ELISA-negative sera (5 from Corsica and 5 from the CCHFV-free Netherlands) to

a Biosafety Level 4 laboratory (Laboratory Jean Mérieux, Lyon, France) to be analyzed by the national reference center for CCHFV (Institut Pasteur and Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Paris, France) designated by the World Health Organization and the World Organisation for Animal Health. They used the Pseudo–Plaque Reduction Neutralization test (PPRNT) (6) to measure the neutralizing effect of sera antibodies against the IbAr10200 CCHFV strain (same antigen used in the ELISA test), at successive dilutions 1/20, 1/40, 1/80, 1/160. Results were given by Dilution Threshold (DT) until which the neutralizing effect of each sera sample was observed. We also included in our confirmation process 5 ELISA-positive cattle Corsican sera for which the absence of immune cross-reaction with CCHFV close-related viruses (namely, the Hazara virus from the same serogroup as CCHFV and the Dugbe virus that belongs to the close Nairobi sheep disease serogroup) was already tested in previous CCHF survey, although they clearly neutralized CCHFV culture (22).

Statistical analysis of serological data

In order to identify factors that may be linked to animal seropositivity against CCHFV in France, we collected several information from available databases on the tested animals, their environment and the related human rearing practices for the domestic ones. As a basis of analysis, a previous literature review on CCHF allowed us to determine the presupposed CCHFV natural enzootic transmission cycle in France and to identify key factors that could influence this transmission in the epidemiological French context (33). As intrinsic animal data, we informed their sex (male or female), age (young, subadult or adult for wildlife, and the exact number of years for cattle), as well as the species for wild animals and the breed for cattle, using both field information collected by hunters and the BDNI (National Identification DataBase) for domestic animals. From this last database, information on rearing practices were also compiled, such as the rearing of other domestic animals (i.e. sheep, goat, pigs, or a mix of these) in addition to cattle on the same farm, as an index of contacts for cattle with different animal species that may have distinct abilities to replicate CCHFV and infect tick vectors. Cattle breeds were also grouped in different types of production for which we assume distinct grazing practices and various exposure to CCHFV tick vectors (dairy cattle mostly in barns, rustic dairy cattle mixing barns and pastures, free-ranging suckling cattle for meat production, peculiar cattle breeds used for leisure such as bullfighting or demonstrations). For environmental data, the probability of *H. marginatum* presence in the South of France, derived from the suitability of local habitats and climate for the establishment of this tick species (28), was the first information to be collected, as an index of the exposure of animals to CCHFV tick vectors. However, we also considered the alternative scenario where *H. marginatum* would not be the only or the main vector of CCHFV in France, as it seems to

be the case in Spain (29), and we thus also collected row data on climate and habitat. Indeed, each tick species has its own environmental needs to survive and succeed its development cycle, which defines its spatio-temporal ecological niche (34). In addition, climate and/or habitats may impact not only the dynamics of tick vectors but also other parameters of CCHFV transmission such as the distribution, the abundance or the specific diversity of vertebrate animal hosts, as well as the success of virus replication in ectothermic tick vectors (33). For climate, we used synthetic variables already defined by principal component analysis, which processed meteorological data in the South of France, from 2000 to 2018, and including temperatures, rainfall, potential evapotranspiration and relative humidity (28). For habitats, we also used a raster file (in pixels) presenting 7 land cover classes generated by Bah (28), through the combination of CORINE Land Cover and BD forêt. To attribute climate and habitat, as well as the predicted probability of presence for *H. marginatum*, to each farm from which cattle were serologically tested, we preferred considering the potential area where they could graze instead of the local point of the farm. Using the GPS coordinates of the farm's head office, we created a 4-km radius buffer zone around each GPS coordinate. Within this buffer, we calculated the average *H. marginatum'*s probability of presence, and mean values for the three climatic principal components. For the habitat, we calculated a proportion for each of the 7 classes in each buffer zone. As data from wildlife were located at the municipality level, the similar measures were calculated for climate, habitat and *H. marginatum*'s probability of presence for each municipality where wild animals were serologically tested. The QGIS software (3.28.3-Firenze) was used for processing spatial dataset ("Zonal statistics" and "Zonal Histogram").

To estimate the effect of these factors on the probability for an individual animal to be seropositive, we informed a Hierarchical Multivariate Logistic Regression Generalized Mixed Effect Model, with the sampling locality including several nested levels (i.e. department, municipality, and farm) and the breed (30 reported breeds) as random effects, and the other explanatory variables as fixed effects. Data processing and analysis was performed using R programming language (Rstudio, version 4.2.1). We used a dredge procedure (MuMin package) adding intrinsic, anthropogenic and environmental factors to improve the model. The choice of the "best model" was based on the lowest Akaike Information Criteria (AIC) value and a Delta AIC<2, but also on the percentage of data variance explained, the higher level of explainability using Somers, Dxy rank correlation test (Packages : car, MuMin, Lme4).

Results

Seropositive animals using ELISA test

Thanks to veterinary departmental laboratories and hunting federations, we obtained 8 557 cattle sera along four prophylaxis periods from 2018 to 2022 (Table 1), and 2 182 sera of wildlife from 2008 to 2022 (Table 2), to be tested using the ELISA test.

Table 1: Number of cattle, municipalities, and farms analyzed for detecting CCHFV antibodies, in each department that accepted to participate in the study, and number of cattle sera found positive in CCHFV antibodies.

Departement	Nb sera	Nb farms	Nb positive	Year
ALPES MARITIMES	571	75	41 (7 farms)	2019-2020
AVEYRON	1246	126	2 (2 farms)	2019-2020 2020-2021
BOUCHES-DU-RHÔNE	1710	188	7 (3 farms)	2018-2019 2019-2020 2020-2021
GARD	1013	60	17 (2 farms)	2018-2019 2019-2020
HÉRAULT	1946	191	28 (10 farms)	2018-2019 2019-2020
LOZERE	100	20	0	2020-2021
PYRÉNÉES-ORIENTALES	880	87	80 (19 farms)	2019-2020 2021-2022
TARN	1112	111	1 (1 farm)	2019-2020 2020-2021

Table 2: Number of wildlife sera obtained from 2008 to 2020, for each hunted animal species, to be analyzed using the CCHF ELISA test in each department that accepted to participate in the study, and number of sera found positive in CCHFV antibodies.

Departement	Nb tested sera	Nb tested municipalities	Nb. pos. sera	Wild boar	Roe deer	Red deer	Mouflon	Fox	Year
ARDÈCHE	28	5/335	0	0/17	0/11	-	-	-	2009-2012
DRÔME	434	35/363	0	-	0/434	-	-	-	2016-2020
GERS	379	98/461	0	0/74	0/305	-	-	-	2010-2021
HAUTES-PYRENEES	621	148/469	45	9/179	16/197	20/244	0/1	-	2008-2022
HÉRAULT	622	49/342	3	3/566	0/23	0/8	0/21	0/4	2012-2022
LOZÈRE	98	12/152	1	0/33	0/7	-	1/58	-	2019-2022

Antibodies against CCHFV were detected by ELISA in 176 bovine sera in most of the tested departments, except in Lozère that remained negative (Table 1). Tarn and Aveyron only showed one and two seropositive animals, respectively, each of them isolated in a farm in separated municipalities. The two seropositive cattle in Aveyron are animals that have changed farms in the course of their lives:

the first was born in Hérault in 2016 and arrived at the farm where it was sampled at the end of 2018. The second was born in Aveyron in 2011, and although it has changed farms, it has remained in the north-west of the département all its life. In contrast, the seropositive animal sampled in the Tarn region has never changed farm since birth (Figure 2). Although individual seroprevalences were higher in Bouches-du-Rhône (0.4%), Hérault (1.44%) and Gard (1.68%), positive municipalities remained spatially dispersed and most of farms contained one seropositive animal, except a few farms that concentrated several seropositive cattle (intra-farm seroprevalence in farms with more than one positive animal 26.08% [4.08-66.67%]) (Figure 2). Then, individual seroprevalences were the highest in Alpes-Maritimes (7.18%) and Pyrénées-Orientales (9.09%), where seropositive municipalities were clustered around apparent "hotspots" of transmission (intra-municipality seroprevalence 39.1% [11.11-100%]) and most of positive farms concentrated many seropositive animals (intra-farm seroprevalences in clusters 47.93% [10-100%]) (Figure 2).

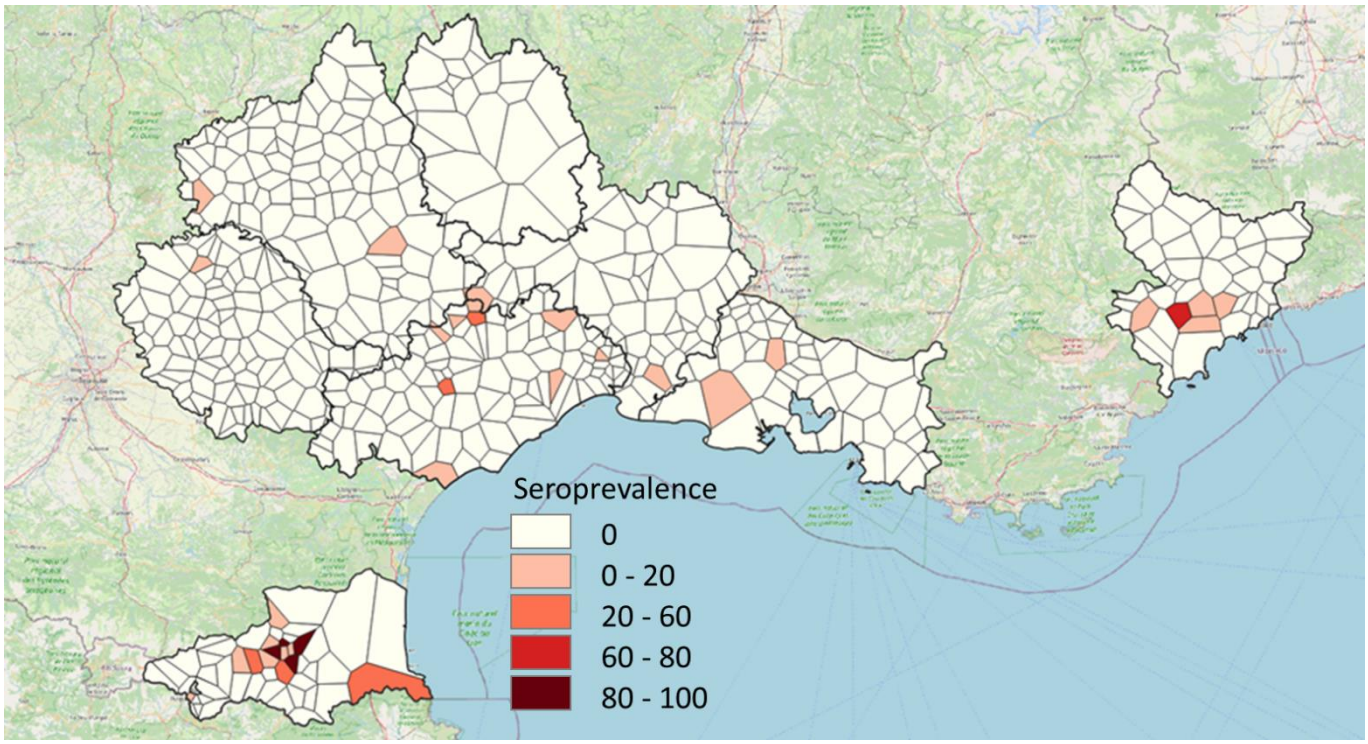


Figure 2: Map of cattle individual seroprevalences per municipality (increasing seroprevalences from pale pink to dark red, and sampled but negative municipalities in white), in departments that accepted to participate to the study, with Voronoï polygons as a representation of municipalities guaranteeing anonymity of farmers in sampled municipalities and dealing with absence of sampling in some municipalities.

For wildlife, 49 positive samples were detected: 3 wild boars in 2016 and 2018 in Hérault, 1 mouflon in 2021 in Lozère, and 45 animals (including wild boar, roe deer and red deer) from 2008 to 2022 in Hautes-Pyrénées (Table 2). In this last department, seropositive animals were mainly located in the piedmont, which is a band of natural habitats and agricultural activities between northern plains and southern Pyrénées mountains (Figure 3). Antibodies have been detected each year since 2008, except from 2019 and 2021 when covid drastically decreased outdoor practices including hunting and sampling effort was consequently very low (10 animals hunted in three years).

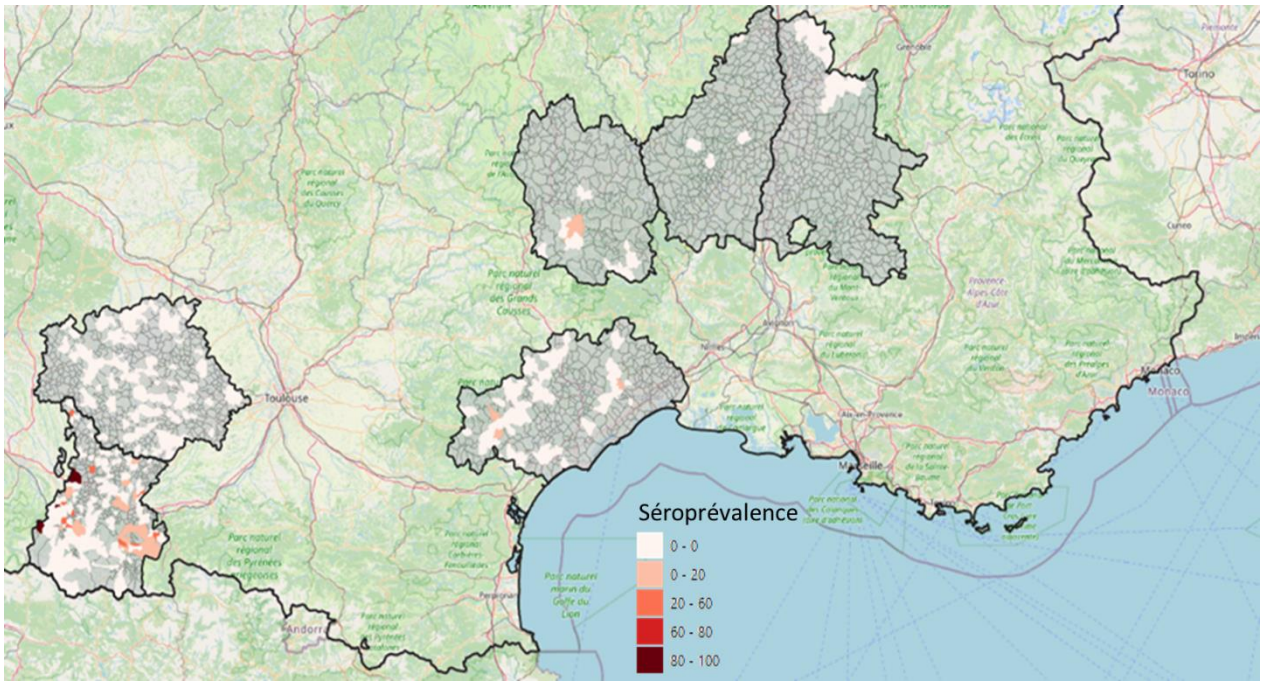


Figure 3: Map of wildlife seroprevalences per municipality in departments (increasing seroprevalences from pale pink to dark red, and sampled but negative municipalities in grey)

When looking at OD values of sera tested by ELISA for CCHFV antibodies, positive and negative samples grouped in two separated populations either for cattle and wildlife (Figure 4A and 4B). However, we observed distinct OD value distributions for cattle samples. Negative samples exhibited a clustered distribution around a consistent OD value (median = 3.68). In contrast, positive samples exhibited two discernible profiles (Figure 4A). Pyrénées-Orientales and Hérault demonstrated homogeneous high OD values (median = 152.36). Conversely, OD values for the other positive departments exhibited a broader distribution, with some samples approaching the ELISA threshold (median = 65.87). Notably, different patterns emerged among these departments, Alpes-Maritimes displayed a single, prominent peak of OD values, while Gard exhibited two distinct peaks. In the case of wildlife, primarily comprising samples from Hautes-Pyrénées, all negative samples exhibited a

similar value (median = 5.93). Notably, positive samples displayed two distinct peaks on the positive side of the distribution, with one peak aligning closely with the threshold.

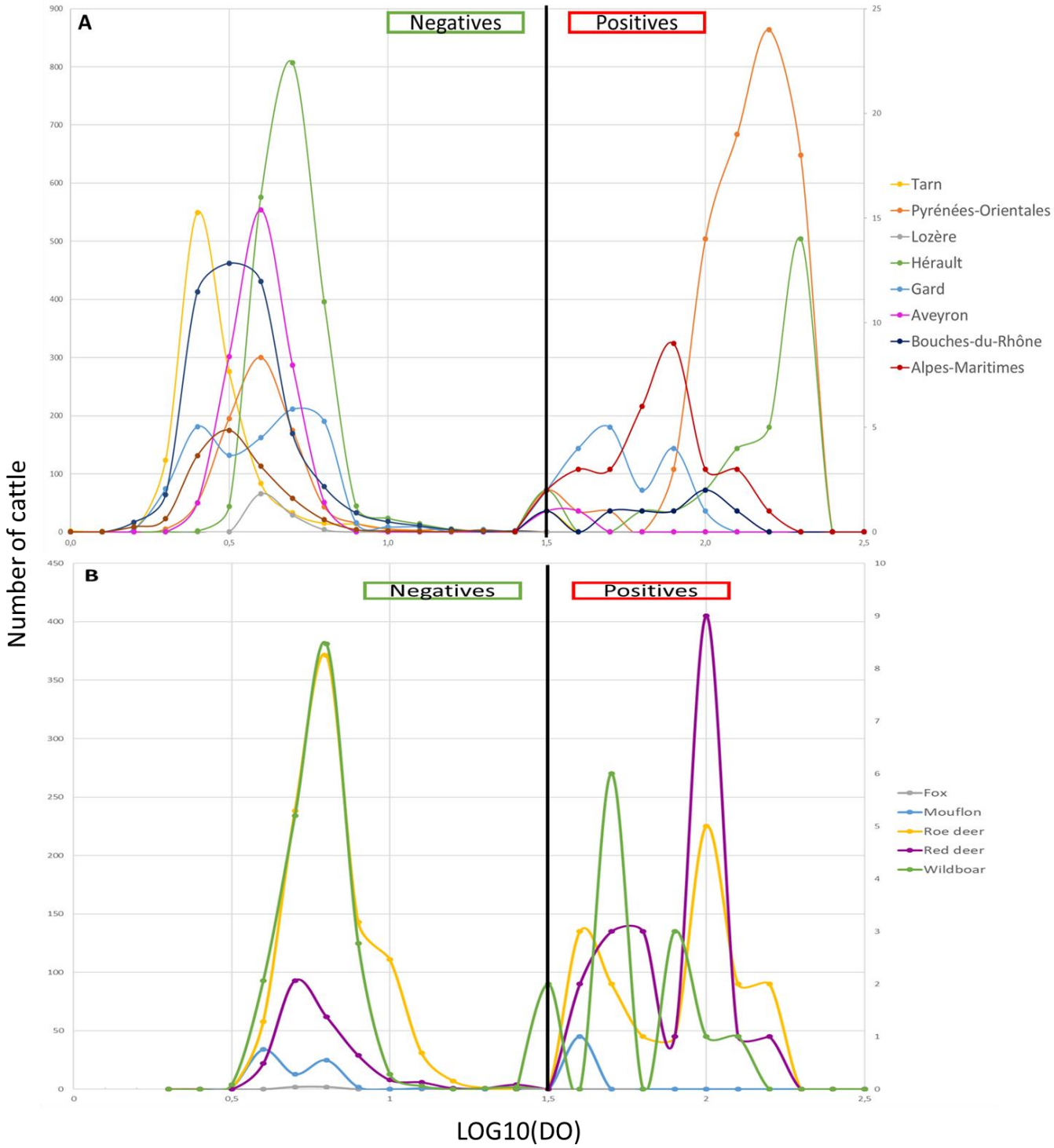


Figure 4: Antibody response profiles against Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Livestock (A) and Wildlife (B) revealed through distribution analysis of Optical Density (OD) in Log10 Scale.

Each graph displays seronegative sera on the left ordinate and seropositive sera on the right. In graph A, curves represent results by Department, and in graph B, results are stratified by wild species.

Confirmation of positivity using PPRN test

59 ELISA-positive cattle sera (17 from Alpes-Maritimes, 3 from Bouches-du-Rhône, 10 from Gard, 20 Hérault, 9 Pyrénées-Orientales) and 40 ELISA-positive wildlife sera (39 from Hautes-Pyrénées, 1 from Lozère) in addition to 5 positive and 10 negative controls (as presented above), were sent to a BSL4 laboratory for conducting PPRN test. The results of PPRN are shown in supplementary data 1. Among controls, the 10 ELISA-negative samples were PPRN-negative, and 4 positive controls were confirmed positive by PPRN until 1/80 dilution and one at 1/20 dilution. Concerning cattle, 39 out of the 59 ELISA-positive sera were confirmed with a minimum threshold of 1/20. Those which could not be confirmed mainly came from Alpes-Maritimes (n=6/17), Bouches-du-Rhône (n=3/3), Gard (n=8/10) and a few from Hérault (n=3/20). Concerning wildlife, 39 out of the 43 ELISA-positive sera were confirmed with a minimum threshold of 1/20, and most of them (n=30/39) were still confirmed at 1/80 dilution.

There was a slight correlation between OD values provided by the ELISA test and dilutions thresholds provided by the PPRN test for cattle (R^2=0.35), even slighter in wildlife (R^2=0.29) (Figure 5A and 5B), suggesting that the higher the antibodies level is, the higher is the dilution until which it is possible to detect neutralizing antibodies.

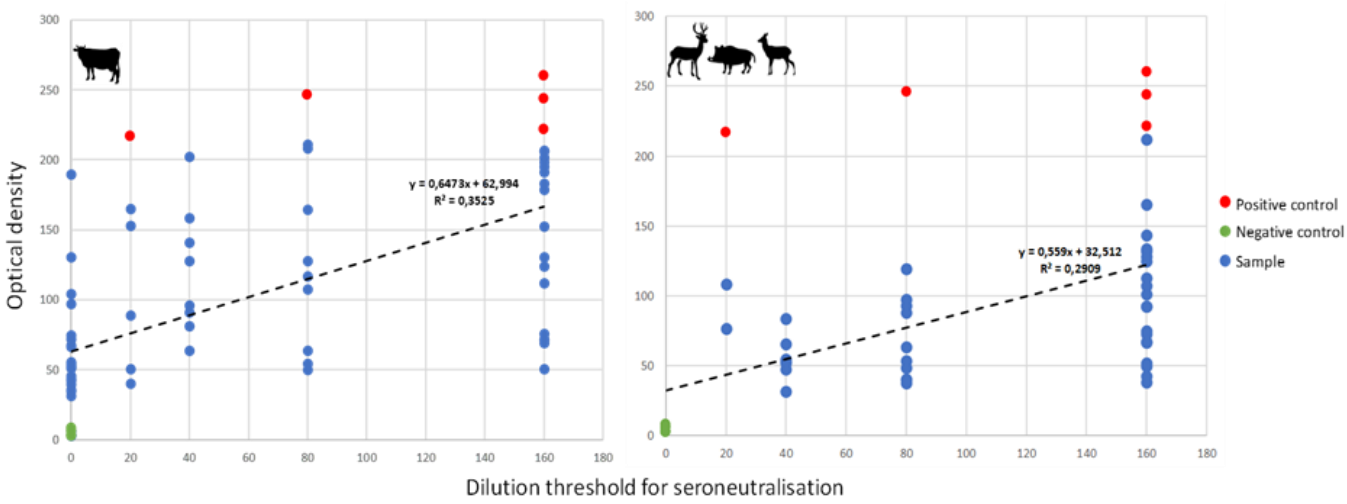


Figure 5: Correlation between the Optical Density (OD) of sera samples and the Dilution Threshold (DT) until which the neutralizing effect of antibodies in sera is still observed, in cattle (A) and wildlife (B). Reference positive controls (ELISA-positive Corsican sera) are indicated in red points and negative ones (ELISA-negative sera from Corsica and Netherlands) in green points.

Factors explaining seropositivity in animals: results of the analysis

For each host category (cattle and wildlife) we informed a multivariate logistic regression model with the locality of sampling as random effect. The optimal model was chosen using a combination of evaluation criteria. The AIC was employed to gauge the overall quality of the model, the percentage of explained variance to assess its ability to account for data variability, the Somers Dxy rank correlation test to evaluate its predictive capability, and the AUC to assess its explanatory capacity. Taking into consideration these various measures, the model that demonstrated the best balance between data fit, predictive ability, and explanatory power was selected as the top choice.

Table 3: Data results for both models, domestic and wildlife, with all factors retained in the fnal model.

	Domestic fauna			**Wildlife**		
Predictors	*Estimate*	*CI(+/-)*	*p*	*Estimate*	*CI(+/-)*	*P*
(Intercept)	-12.620	1.090	**< 0.001**	-6.749	1.241	**< 0.001**
Sex [M]	-0.224	0.390	0.57	0.982	0.400	**< 0.05**
Age	0.110	0.031	**< 0.001**			
Dim_3				0.127	0.093	0.17
Closed coniferous forest	0.036	0.021	0.09			
Open forest				0.040	0.096	0.69
Natural open environment	0.041	0.018	**< 0.05**			

Cattle

The study has yielded compelling results concerning the influence of cattle age (Age) on seropositivity (SERO). The data unveiled a noteworthy association with an impressively low p-value (< 0.001), underscoring that older animals are notably more likely to exhibit seropositivity. In alignment with this, the analysis also unveiled a significative relation between the variable "Natural Open Environment" (0.04, *P*-value = 0.0266) and seropositivity. This implies that cattle grazing in areas with a higher proportion of natural open spaces tend to have an increased likelihood of being seropositive. Conversely, the variable "Closed Coniferous Forest" does not appear to significantly influence seropositivity probability (0.036, *P*-value = 0.0926). These findings suggest that the presence of closed coniferous forests in cattle grazing zones is not statistically linked to significant variations in

seropositivity. Lastly, the analysis has established that cattle gender does not exert a significant effect on their probability of exhibiting a positive serological status (-0.224, *P*-value = 0.5656).

Wildlife

The model includes the following explanatory variables: "Dim_3" representing a climatic dimension linked to autumn precipitation, "Open_forest" describing the proportion of open forest in the communes where the animals were hunted, and "SEXE" capturing the sex of the animals. The analysis also took into account random effects for the "DEP" group, reflecting the dependency of the data within this group.

The results reveal several important conclusions. Firstly, climate, and particularly autumn precipitation, represented by the "Dim_3" variable, did not show a significant effect on seropositivity (0.127, *P*-value = 0.1749). Similarly, the proportion of "Open_Forest" in grazing areas showed no significant effect (0.04, *P*-value = 0.6783), suggesting that this variable is not statistically significantly associated with seropositivity. However, the "SEX" variable, representing the sex of wild animals, showed a significant effect on the probability of seropositivity (0.982, *P*-value = 0.0141). Male animals were more seropositive than females (*P*-value < 0.05).

Discussion

This work has led to the first detection of antibodies against CCHFV on mainland France, in cattle and wildlife, which suggests CCHFV circulation at least within an enzootic transmission cycle. However, until now, CCHFV has never been detected in French ticks (Bernard *et al.*, in press; (24), which remains the only reliable method for identifying and characterizing CCHFV as ticks are the only reservoirs of the virus (13,14,35). Thus, we can question the specificity of the ID Screen® CCHF DA ELISA test we used in our study, which corresponds to the capacity of the test to only detect true positives. As mentioned before, by testing several sera samples from cattle, small ruminants and humans from CCHFV-free areas as well as sera from multiple animal species to confirm the absence of nonspecific reactions, a specificity of 100% (CI95%: 99.8%-100%) was determined (32). Despite this, one might wonder about potential cross-reactions with viruses genetically and antigenically close to CCHFV. This hypothesis seems to be unlikely as a previous PPRN test carried out on ELISA-positive Corsican cattle sera has shown typical neutralizing effect of antibodies against CCHFV culture whereas no effect was observed with Hazara and Dugbe viruses, which belong to the same serogroup of CCHFV or a very close one (namely, the Nairobi Sheep Disease virus serogroup), respectively (Grech-Angelini, 2020). Some of these Corsican sera were included in our study and gave

identical ELISA and PPRN results than the other tested sera from the mainland; the rest of ELISA-positive sera that could not be confirmed by PPRN might result from different target epitopes between both tests (i.e. ELISA measures total immunoglobulin, including neutralizing and non-neutralizing antibodies, while PPRN just functional neutralizing antibodies) (36). In addition, another study conducted on cattle in Nigeria did not show any correlation between results provided by the ID Screen® CCHF DAM ELISA test and the DUGV ELISA developed to detect specific antibodies against Dugbe virus, while cross-reactions were reported when using immunofluorescence (37). Also, a survey where one calf and one sheep were hyper immunized with inactivated Hazara virus demonstrated that the ID Screen® CCHF DAM ELISA was the only CCHFV serological test able to detect these animals as negative ones and thus to discriminate antibodies against Hazara virus and CCHFV (38). Similarly, a study showed that ruminants experimentally infected with Nairobi Sheep Disease virus were all negative for CCHFV antibodies when tested with the ID Screen® CCHF DAM ELISA (39). Regarding all these data, unless the existence of an unknown CCHF-like virus (sufficiently close to CCHFV to create cross-reaction in ELISA but sufficiently distinct to CCHFV to not be detected by CCHFV but also panNairovirus PCRs), our serological results suggest the circulation of CCHFV in the mainland France.

Under this reasonable assumption, different CCHF epidemiological patterns seem to occur among departments sampled in southern mainland France. In Tarn, Aveyron, Lozère and Bouches-du-Rhône, seroprevalences were very low, to such an extent that there was no or only one seropositive animal. OD values of positive animals were close to the threshold and this could be interpreted as a single infection resulting in seroconversion that might be old compared to the date of antibody detection, with a possible decline of antibody titer, at least for the IgM since IgG seem to persist for several months or years in ruminants (40,41). As the supposed tick vector *H. marginatum* is currently known to be absent in these departments, they were thus considered CCHFV-free areas. We can suspect that punctual seropositivity may result from either rare false positives with the ELISA test (see above), human-driven displacements of domestic or wild ungulates from an endemic area where they could be infected to these CCHFV-free areas (33,42), or the introduction of an infected *H. marginatum* tick vector at the immature stage through bird migrations or introductions of lagomorphs for hunting and then molting of this tick in an adult that is able to parasitize and infect a cattle, locally (43–45). Punctual introductions of *H. marginatum* via trans-mediterranean migratory birds used to be common in Europe and could explain most of single adult ticks found on horses at summer in northern countries, because of increasing temperatures allowing nymph to adult molting, but with no possibility for the tick to complete its entire development cycle and thus establish in these areas (34). In Gard and Hérault,

seroprevalences and OD values remained low, seropositive municipalities were sparse, and the number of seropositive animals per farm was still close to 1, suggesting a similar non-circulating epidemiological situation. However, in some farms, several animals were seropositive with high OD values, which may suggest local CCHFV circulation with regular or recent infection of animals leading to persistent high virus titers. In these departments, *H. marginatum* is known to be present (27,28) and can explain such transmission. In Hérault, the fact that we also found a few seropositive wild boars, which are possible hosts for the adults of *H. marginatum*, is an additional evidence to conclude on local foci of CCHFV circulation either in domestic and wild ungulates. Finally, in the Alpes-Maritimes and Pyrénées-Orientales, seroprevalences were greatly higher (7 and 9%, respectively) than in other departments and were grouped in spatial clusters centered on some municipalities, with many farms presenting a large amount of positive animals. Such seroprevalences are quite similar to those observed in cattle from regions with supposed comparable epidemiological systems, like the French Corsica island (13.3%, 95%CI 10.2%-17.3%) (22), in southern Italy (1.89%, 95%CI : 1.12–3.1) (21) or Central Macedonia in Greece (7%, 95%CI 5%-10%) where one CCHF autochthonous human case cured in 2009 and CCHFV was regularly isolated from ticks (46). However, these seroprevalences remain very low compared to those observed in cattle CCHF-endemic African countries such as Mauritania (69%) or Mali (66%) (47,48). Seroprevalence measured in wildlife of Hautes-Pyrénées (5.03% in wild boars and 8.16% in cervids) were slightly higher than those observed in same animals on the other side of the Spanish border, in Catalonia, but they remain lower than those detected in central Spain where CCHF human cases have been regularly reported since 2016 (19). In our study, OD values were medium to high in the Alpes-Maritimes, and they were very high in cattle from Pyrénées-Orientales and wildlife from Hautes-Pyrénées with similar patterns than observed in Corsican ruminants (22). All these results are in agreement with frequent and still active CCHFV transmission events between animal hosts and tick vectors in such departments of mainland France, further field studies should be conducted to confirm such epidemiological patterns.

Although *H. marginatum* is very abundant and largely distributed in Pyrénées-Orientales, in accordance with possible transmission in this department, it was not found in the Alpes-Maritimes during a tick collection campaign conducted on horses in 2017 (31). Similar discrepancy appears in Hautes-Pyrénées where seroprevalence in wildlife is high, whereas the tick *H. marginatum* is predicted to be absent in this department according to the distribution model developed by Bah (28). Several hypotheses may be proposed to explain these situations. First, as the invasion of new French areas by *H. marginatum* in France is still in progress under climate changes, we may assume that these zones have become suitable now and that the tick is able to establish, provided that it can spread from an

endemic area and create sufficiently abundant populations to be detected by sampling. Another alternative proposition would be the existence of another tick vector, not already identified within the autochthonous fauna of France but considered as a candidate vector for CCHFV. CCHF is a complex disease and, among its worldwide distribution range, its causative agent can be transmitted by various tick species belonging to the *Hyalomma* genus but also from other genera like *Rhipicephalus*, *Amblyomma*, and possibly *Dermacentor* (12,33). Recently reported as a likely vector of CCHFV in Spain (49), *Hyalomma lusitanicum* could be such a potential candidate for France. It was historically reported from France, in the western Atlantic region and Pyrénées-Orientales, which both surround Hautes-Pyrénées, and on the other side in Bouches-du-Rhône and Var near the Alpes-Maritimes (Rageau 1972, Morel). It seems to be much more selective for its vertebrate animal hosts than *H. marginatum*, with a likely preference at the immature stages for lagomorphs, especially wild rabbits (50,51). As rabbit populations have greatly declined in the South of France since the 1970s with the epizooty of myxomatosis and more recently with rabbit hemorrhagic disease (44,45), we assumed that this species may have disappeared from the territory. However, a recent survey detected a small population of *H. lusitanicum* in wild rabbit warrens in the Rhône estuary near Marseille in Bouches-du-Rhône (Stachurski, personal communication). This may be a residual population or a new population introduced via rabbit introductions from Spain (45), and the extent of this tick in France remains unknown until now. If *H. lusitanicum* is confirmed to be established in Hautes-Pyrénées, this might explain high CCHFV seroprevalences measured in roe deer and red deer, which are likely hosts for the adult stages of *H. lusitanicum*, instead of domestic ungulates like horses and cattle for *H. marginatum* (50,51). However, trophic preferences of both *H. lusitanicum* and *H. marginatum* remain unclear (Bah, in press) and should be detailed by either field surveys and experimental trials. In the Alpes-Maritimes, such cervids also exist in areas detected as CCHFV circulation hotspots, but further field investigations should be conducted both on tick distribution and serological survey in wild animals, in order to test such hypotheses.

As one of the main environmental factors driving CCHFV natural enzootic transmission, the presence of CCHFV tick vector, namely *H. marginatum* for France (33), was tested in our model to explain CCHF seropositivity in cattle and wildlife, under the assumption that when populations of *H. marginatum* are present, then individuals carrying the virus may also be present. By using predictions of *H. marginatum* presence from Bah *et al.* (28), our model did not detect any effect of tick presence or abundance. However, seropositivity in cattle was significantly higher in areas with a high proportion of natural open habitats (i.e. shrublands in Mediterranean regions) and coniferous forests. For seropositivity in wildlife, open forests, as well as autumn precipitation represented by the third climatic

principal component of Bah *et al.* (28), were kept in the best model although these variables were not significant. Whereas natural open habitats were already identified as suitable conditions for the presence of *H. marginatum*, the other environmental variables reported in our model were not (28). These variables may likely indicate optimal conditions for cattle of being infested by CCHFV tick vectors, perhaps because there is more than one tick vector species (e.g. *H. lusitanicum* in addition to *H. marginatum*) or because other parameters than tick vector distribution may influence the efficiency of CCHFV transmission (33). Indeed, these conditions may reflect optimal environments for tick vector presence, CCHFV-amplifying hosts, as well as spatio-temporal meeting occurrence between cattle and infected ticks. The fact that coniferous and open forests, in addition to natural open habitats, were pointed out by our models could reflect the importance of wild fauna, especially cervids, in the CCHFV enzootic transmission cycle, as these animal species mainly colonize forested areas and were suspected to highly replicate CCHFV and reinfect new tick vectors in Spain (49). However, broad-leaved forests that can be also greatly colonized by cervids were not retained by our models. If we exclude the fact that abundant populations of cervids could contribute to amplify populations of *H. lusitanicum*, according to its trophic preferences, such forested areas may also provide direct suitable conditions for the survival and development of this tick species, as proposed by Valcarcel (51). In this case, cattle in farms surrounded by such habitats would be likely to encounter infected tick vectors. Further research is therefore needed in these departments on the local determinants of CCHFV transmission, as well as on the ecological niche of *H. marginatum* and *H. lusitanicum*.

Apart from environmental conditions, anthropogenic factors related to farming practices were also tested in one of our models to explain cattle seropositivity. Regarding the type of cattle farming (dairy, suckling, mixed, or leisure cattle) that was assumed to influence the exposure of animals to tick vectors, it seemed to have no effect on seropositivity. Depending on their breed, cattle may be used for different production types, with peculiar farming practices. In the South of France, most cattle are intended for meat production, and in peculiar areas such as Camargue, some of them are also used for leisure activities, especially bullfighting (52). Consequently, we had an over-representation of suckling cattle compared to the other categories and it was sometimes complicated to attribute a breed to a category, especially for mixed uses. In addition, within the prophylaxis process as defined in France, dairy cattle are not blood sampled but a milk sample is preferred to be tested for regulated diseases. As a consequence, this category was even more under-represented compared to suckling cattle in our study. Under this current study design, we cannot really conclude on such an explanatory variable. Another anthropogenic factor that was tested in our model concerned contacts of cattle with other animal species, as these last ones may have different abilities for replicating CCHFV and contaminating tick

vectors. The presence of certain species in the vicinity of cattle could help maintain the virus in tick populations and thus increase the risk of transmission (53,54). Although the presence of other domestic species in cattle farms has not shown any significant effects in our model on the seropositivity, contact with wildlife may have an impact. Unfortunately, this information was not available from databases used in our study and this should be investigated through further field surveys by questioning farmers on their fencing practices or assessing wild fauna abundance around farms. Such questionnaires to farmers could also inform on other practices such as their use of anti-parasitic molecules (insecticides, acaracides, or anthelmintics with ivermectine that is also efficient against ectoparasites such as ticks), a parameter that could not be included in our study due to lack of data. All these treatments are supposed to reduce tick infestation and thus decrease the exposure of cattle to infected tick vectors. This phenomenon was reported in cattle from Pakistan (54) and was considered a reliable preventive strategy when animals from Sudan were introduced into Saudi Arabia (42). Although no anthropogenic factors tested in our model showed an effect on cattle seropositivity, the fact that a large part of data variance was explained by the farm, as a random effect, confirmed that heterogeneity exists between farms, within the same municipality, which could probably be explained either by the environment of farms or by farming practices. A last practice that is usual in the South of France, especially for suckling cattle, and should be further investigated is the temporary displacement of cattle towards spring and summer pastures during the activity period of the adult stages of *Hyalomma* ticks. As these pastures are usually far from farms and thus not described as the environment surrounding farms, this may be a limit of our current cattle model to identify habitats where cattle are more likely to become infested by CCHFV tick vectors. Studies conducted in Africa and Asia reported higher CCHFV seroprevalence in animals grazing in pastures than those fed on trough (53,54), and even higher prevalence in nomadic herds covering long distances (55).

Finally, individual factors were tested in our models for explaining seropositivity. For both cattle and wildlife, the sex of animals was retained in the best models, with males presenting higher seroprevalences than females. However, this effect was significant only for wild animals and not for cattle. Such observation is quite unusual and only two studies conducted on cattle from Malawi and South Africa reported higher seroprevalence in females than males (26,54), which is exactly the opposite of our study. For wildlife, another explanation could be the larger home range of males than females (56), especially during the reproduction period, and this may result in much more occasions to visit areas infested by CCHFV tick vectors. Concerning cattle, the over-representation of suckling cattle in our sampling design may have resulted in a correlative bias favoring females against males, as reproductive females are usually kept longer than males, which most of them are sold for fattening

or directly slaughtered after several months of life. Considering this limit, it seems we cannot conclude on a reliable effect of sex on the probability for cattle to be infected by CCHFV. Another individual factor tested was the age of animals and it was highly significant in the cattle model. As already demonstrated in many serological surveys on CCHF in domestic ungulates, animals that are older have a higher probability to be seropositive, as a result of their longer exposure to infected tick vectors along successive years and the persistence of CCHFV antibodies for several years in most of ungulates (57). Then, cattle breeds as well as wildlife animal species were also tested as random and fixed effects, respectively, on the seropositivity. None of these variables had a significant effect and was retained in our best models. This is interesting as some studies conducted in Africa confirmed the apparent resistance of some cattle breeds against tick infestation, and thus CCHFV transmission (58). Relative resistance of native breeds has often been described but significant differences were not systematically highlighted (25), and in some cases the tendency was just the opposite (53). In France, considering that the assumed tick vector *H. marginatum* has recently colonized the territory, it seems that no local breed had time to develop adaptive resistance to tick infestation and this is in agreement with our results. Regarding wildlife, the absence of animal species effect may likely reflect trophic preferences of tick vectors and seems to suggest that wild boar, roe deer and red deer were equally infested by CCHFV tick vectors, at least in Hautes-Pyrénées. This reinforces the importance of further surveys on tick vectors' distribution and trophic preferences, as well as large serological investigations on the different wildlife species in the other departments

Bibliography

1. Abudurexiti A, Adkins S, Alioto D, Alkhovsky SV, Avšič-Županc T, Ballinger MJ, *et al.* Taxonomy of the order Bunyavirales: update 2019. Arch Virol. 2019 Jul;164(7):1949–65.

2. Shayan S, Bokaean M, Shahrivar MR, Chinikar S. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. Lab Med. 2015 Aug 1;46(3):180–9.

3. Al-Abri SS, Abaidani IA, Fazlalipour M, Mostafavi E, Leblebicioglu H, Pshenichnaya N, *et al.* Current status of Crimean-Congo haemorrhagic fever in the World Health Organization Eastern Mediterranean Region: issues, challenges, and future directions. International Journal of Infectious Diseases. 2017 May;58:82–9.

4. Flusin O, Iseni F, Rodrigues R, Paranhos-Baccalà G, Crance JM, Marianneau P, *et al.* [Crimean-Congo hemorrhagic fever: basics for general practitioners]. Med Trop (Mars). 2010 Dec;70(5–6):429–38.

5. Messina JP, Pigott DM, Golding N, Duda KA, Brownstein JS, Weiss DJ, *et al.* The global distribution of Crimean-Congo hemorrhagic fever. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2015 Aug;109(8):503–13.

6. Papa A, Dalla V, Papadimitriou E, Kartalis GN, Antoniadis A. Emergence of Crimean–Congo haemorrhagic fever in Greece. Clinical Microbiology and Infection. 2010 Jul;16(7):843–7.

7. Ergonul O, Celikbas A, Baykam N, Eren S, Dokuzoguz B. Analysis of risk-factors among patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever virus infection: severity criteria revisited. Clinical Microbiology and Infection. 2006 Jun;12(6):551–4.

8. Hawman DW, Haddock E, Meade-White K, Williamson B, Hanley PW, Rosenke K, *et al.* Favipiravir (T-705) but not ribavirin is effective against two distinct strains of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in mice. Antiviral Research. 2018 Sep;157:18–26.

9. Spengler JR, Estrada-Peña A, Garrison AR, Schmaljohn C, Spiropoulou CF, Bergeron É, *et al.* A chronological review of experimental infection studies of the role of wild animals and livestock in the maintenance and transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. Antiviral Research. 2016 Nov;135:31–47.

10. Zeller HG, Cornet JP, Camicas JL. Experimental transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus by west African wild ground-feeding birds to Hyalomma marginatum rufipes ticks. Am J Trop Med Hyg. 1994 Jun 1;50(6):676–81.

11. Bente DA, Forrester NL, Watts DM, McAuley AJ, Whitehouse CA, Bray M. Crimean-Congo hemorrhagic fever: History, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. Antiviral Research. 2013 Oct;100(1):159–89.

12. Hoogstraal H. Review Article1: The Epidemiology of Tick-Borne Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Asia, Europe, and Africa23. Journal of Medical Entomology. 1979 May 22;15(4):307–417.

13. Hawman DW, Feldmann H. Crimean–Congo haemorrhagic fever virus. Nat Rev Microbiol. 2023 Jul;21(7):463–77.

14. Gargili A, Estrada-Peña A, Spengler JR, Lukashev A, Nuttall PA, Bente DA. The role of ticks in the maintenance and transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: A review of published field and laboratory studies. Antiviral Research. 2017 Aug;144:93–119.

15. WHO. Crimean-Congo haemorrhagic fever [Internet]. 2022 [cited 2023 May 4]. Available from: https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/crimean-congo-haemorrhagic-fever

16. Estrada-Peña A, Jameson L, Medlock J, Vatansever Z, Tishkova F. Unraveling the Ecological Complexities of Tick-Associated Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Transmission: A Gap Analysis for the Western Palearctic. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 2012 Sep;12(9):743–52.

17. Sánchez-Seco MP, Sierra MJ, Estrada-Peña A, Valcárcel F, Molina R, de Arellano ER, *et al.* Widespread Detection of Multiple Strains of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Ticks, Spain. Emerg Infect Dis. 2021 Feb;28(2):394–402.

18. Negredo A, Sánchez-Arroyo R, Díez-Fuertes F, de Ory F, Budiño MA, Vázquez A, *et al.* Fatal Case of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Caused by Reassortant Virus, Spain, 2018. Emerg Infect Dis. 2021 Apr;27(4):1211–5.

19. Espunyes J, Cabezón O, Pailler-García L, Dias-Alves A, Lobato-Bailón L, Marco I, *et al.* Hotspot of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Seropositivity in Wildlife, Northeastern Spain. Emerg Infect Dis. 2021 Sep;27(9):2480–4.

20. Carrera-Faja L, Cardells J, Pailler-García L, Lizana V, Alfaro-Deval G, Espunyes J, *et al.* Evidence of Prolonged Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Endemicity by Retrospective Serosurvey, Eastern Spain. Emerg Infect Dis. 2022 May;28(5):1031–4.

21. Fanelli A, Buonavoglia D, Lanave G, Monaco F, Quaranta V, Catanzariti R, *et al.* First serological evidence of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in transhumant bovines in Italy. Transbound Emerg Dis. 2022 Nov;69(6):4022–7.

22. Grech-Angelini S, Lancelot R, Ferraris O, Peyrefitte CN, Vachiery N, Pédarrieu A, *et al.* Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Antibodies among Livestock on Corsica, France, 2014–2016. Emerg Infect Dis. 2020 May;26(5):1041–4.

23. Grech-Angelini S, Stachurski F, Vayssier-Taussat M, Devillers E, Casabianca F, Lancelot R, *et al.* Tick-borne pathogens in ticks (Acari: Ixodidae) collected from various domestic and wild hosts in Corsica (France), a Mediterranean island environment. Transboundary and Emerging Diseases [Internet]. 2020 [cited 2023 Feb 15]; Available from: https://agritrop.cirad.fr/596343/

24. Cicculli V, Maitre A, Ayhan N, Mondoloni S, Paoli JC, Vial L, *et al.* Lack of Evidence for Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Ticks Collected from Animals, Corsica, France. Emerg Infect Dis. 2022 May;28(5):1035–8.

25. Ibrahim AM, Adam IA, Osman BT, Aradaib IE. Epidemiological survey of Crimean Congo hemorrhagic fever virus in cattle in East Darfur State, Sudan. Ticks and Tick-borne Diseases. 2015 Jun;6(4):439–44.

26. Phonera MC, Simuunza MC, Kainga H, Ndebe J, Chembensofu M, Chatanga E, *et al.* Seroprevalence and Risk Factors of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Cattle of Smallholder Farmers in Central Malawi. Pathogens. 2021 Dec 10;10(12):1613.

27. Vial L, Stachurski F, Leblond A, Huber K, Vourc'h G, René-Martellet M, *et al.* Strong evidence for the presence of the tick Hyalomma marginatum Koch, 1844 in southern continental France. Ticks and Tick-borne Diseases. 2016 Oct;7(6):1162–7.

28. Bah MT, Grosbois V, Stachurski F, Muñoz F, Duhayon M, Rakotoarivony I, *et al.* The Crimean-Congo haemorrhagic fever tick vector Hyalomma marginatum in the south of France: Modelling its distribution and determination of factors influencing its establishment in a newly invaded area. Transbound Emerg Dis. 2022 Sep;69(5):e2351–65.

29. Lorenzo Juanes HM, Carbonell C, Sendra BF, López-Bernus A, Bahamonde A, Orfao A, *et al.* Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, Spain, 2013–2021. Emerg Infect Dis. 2023 Feb;29(2):252–9.

30. Grech-Angelini S, Stachurski F, Lancelot R, Boissier J, Allienne JF, Marco S, *et al.* Ticks (Acari: Ixodidae) infesting cattle and some other domestic and wild hosts on the French Mediterranean island of Corsica. Parasites Vectors. 2016 Dec;9(1):582.

31. Stachurski F, Vial L. Santé animale - alimentation. 2018;

32. Sas MA, Comtet L, Donnet F, Mertens M, Vatansever Z, Tordo N, *et al.* A novel double-antigen sandwich ELISA for the species-independent detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus-specific antibodies. Antiviral Research. 2018 Mar;151:24–6.

33. Bernard C, Holzmuller P, Bah MT, Bastien M, Combes B, Jori F, *et al.* Systematic Review on Crimean–Congo Hemorrhagic Fever Enzootic Cycle and Factors Favoring Virus Transmission: Special Focus on France, an Apparently Free-Disease Area in Europe. Front Vet Sci. 2022 Jul 19;9:932304.

34. Estrada-Peña A. The climate niche of the invasive tick species Hyalomma marginatum and Hyalomma rufipes (Ixodidae) with recommendations for modeling exercises. Exp Appl Acarol. 2023;89(2):231–50.

35. Papa A, Velo E, Kadiaj P, Tsioka K, Kontana A, Kota M, *et al.* Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks collected from livestock in Albania. Infection, Genetics and Evolution. 2017 Oct;54:496–500.

36. Freedman MS, Hunter P, Ault K, Kroger A. Advisory Committee on Immunization Practices Recommended Immunization Schedule for Adults Aged 19 Years or Older - United States, 2020. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2020 Feb 7;69(5):133–5.

37. Hartlaub J, von Arnim F, Fast C, Mirazimi A, Keller M, Groschup MH. Experimental Challenge of Sheep and Cattle with Dugbe Orthonairovirus, a Neglected African Arbovirus Distantly Related to CCHFV. Viruses. 2021 Feb 26;13(3):372.

38. Hartlaub J, von Arnim F, Fast C, Somova M, Mirazimi A, Groschup MH, *et al.* Sheep and Cattle Are Not Susceptible to Experimental Inoculation with Hazara Orthonairovirus, a Tick-Borne Arbovirus Closely Related to CCHFV. Microorganisms. 2020 Dec 4;8(12):1927.

39. Hartlaub J, Gutjahr B, Fast C, Mirazimi A, Keller M, Groschup MH. Diagnosis and Pathogenesis of Nairobi Sheep Disease Orthonairovirus Infections in Sheep and Cattle. Viruses. 2021 Jun 27;13(7):1250.

40. Burt FJ, Swanepoel R, Braack LEO. Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibody to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in the sera of livestock and wild vertebrates. Epidemiol Infect. 1993 Dec;111(3):547–58.

41. Rodriguez SE, Hawman DW, Sorvillo TE, O'Neal TJ, Bird BH, Rodriguez LL, *et al.* Immunobiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. Antiviral Res. 2022 Mar;199:105244.

42. Hassanein KM, El-Azazy OME, Yousef HM. Detection of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus antibodies in humans and imported livestock in Saudi Arabia. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1997 Sep;91(5):536–7.

43. Mancuso E, Toma L, Polci A, d'Alessio SG, Di Luca M, Orsini M, *et al.* Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Genome in Tick from Migratory Bird, Italy. Emerg Infect Dis. 2019 Jul;25(7):1418–20.

44. González-Redondo P, Sánchez-Martínez R. Characterisation of wild rabbit commercial game farms in Spain. World Rabbit Science. 2014 Mar 28;22(1):51–8.

45. Letty. Lièvre France. 2021.

46. Schuster I, Chaintoutis SC, Dovas CI, Groschup MH, Mertens M. Detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus-specific IgG antibodies in ruminants residing in Central and Western Macedonia, Greece. Ticks and Tick-borne Diseases. 2017 Jun;8(4):494–8.

47. Kamissoko B, Traore A, Feldmann H, Groschup MH, Safronetz D, Maiga HM, *et al.* Serosurvey of Crimean–Congo Hemorrhagic Fever Virus in Cattle, Mali, West Africa. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2017 Jun 7;96(6):1341–5.

48. Schulz A, Barry Y, Stoek F, Pickin MJ, Ba A, Chitimia-Dobler L, *et al.* Detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in blood-fed Hyalomma ticks collected from Mauritanian livestock. Parasites & Vectors. 2021 Jun 29;14(1):342.

49. Moraga-Fernández A, Ruiz-Fons F, Habela MA, Royo-Hernández L, Calero-Bernal R, Gortazar C, *et al.* Detection of new Crimean–Congo haemorrhagic fever virus genotypes in ticks feeding on deer and wild boar, Spain. Transboundary and Emerging Diseases. 2021;68(3):993–1000.

50. Morel PC. Les *Hyalomma* (Acariens, *Ixodidæ*) de France. Ann Parasitol Hum Comp. 1959;34(4):552–5.

51. Valcárcel F, González J, González MG, Sánchez M, Tercero JM, Elhachimi L, *et al.* Comparative Ecology of Hyalomma lusitanicum and Hyalomma marginatum Koch, 1844 (Acarina: Ixodidae). Insects. 2020 May;11(5):303.

52. Pete S, Crocker A. Cultural identity, tradition, and the ritual killing of bulls - a note on a recent decision of the French Constitutional Council on the legality of bullfighting : note. Obiter. 2013 Jan;34(2):305–15.

53. Kasi KK, Arnim F, Schulz A, Rehman A, Chudhary A, Oneeb M, *et al.* Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in ticks collected from livestock in Balochistan, Pakistan. Transbound Emerg Dis. 2020 Jul;67(4):1543–52.

54. Msimang V, Weyer J, le Roux C, Kemp A, Burt FJ, Tempia S, *et al.* Risk factors associated with exposure to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in animal workers and cattle, and molecular detection in ticks, South Africa. Holbrook MR, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2021 May 28;15(5):e0009384.

55. Adam IA, Mahmoud MA, Aradaib IE. A seroepidemiological survey of Crimean Congo hemorrhagic fever among Cattle in North Kordufan State, Sudan. Virology Journal. 2013 Jun 5;10(1):178.

56. Laguna E, Barasona JA, Vicente J, Keuling O, Acevedo P. Differences in wild boar spatial behaviour among land uses and management scenarios in Mediterranean ecosystems. Science of The Total Environment. 2021 Nov 20;796:148966.

57. Shahbazi N, Firouz S, Karimi M, Mostafavi E. Seroepidemiological survey of Crimean-Congo haemorrhagic fever among high-risk groups in the west of Iran. J Vector Borne Dis. 2019;56(2):174.

58. Yessinou RE, Adoligbe C, Akpo Y, Adinci J, Youssao Abdou Karim I, Farougou S. Sensitivity of Different Cattle Breeds to the Infestation of Cattle Ticks Amblyomma variegatum, Rhipicephalus microplus, and Hyalomma spp. on the Natural Pastures of Opkara Farm, Benin. J Parasitol Res. 2018;2018:2570940.

Supplementary data 1 :

CODE	Dep	Species	OD	PPRNT
AM1	Alpes-maritimes	Cattle	69,00	160
AM10	Alpes-maritimes	Cattle	71,00	160
AM11	Alpes-maritimes	Cattle	66,00	<20
AM12	Alpes-maritimes	Cattle	75,00	160
AM13	Alpes-maritimes	Cattle	104,00	<20
AM14	Alpes-maritimes	Cattle	89,00	20
AM15	Alpes-maritimes	Cattle	40,00	20
AM16	Alpes-maritimes	Cattle	52,00	<20
AM17	Alpes-maritimes	Cattle	70,00	160
AM2	Alpes-maritimes	Cattle	74,00	<20
AM3	Alpes-maritimes	Cattle	81,00	40
AM4	Alpes-maritimes	Cattle	91,00	40
AM5	Alpes-maritimes	Cattle	43,00	<20
AM6	Alpes-maritimes	Cattle	50,00	80
AM7	Alpes-maritimes	Cattle	67,00	<20
AM8	Alpes-maritimes	Cattle	50,00	160
AM9	Alpes-maritimes	Cattle	123,00	160
BDR1	Bouches-du-Rhône	Cattle	31,00	<20
BDR2	Bouches-du-Rhône	Cattle	97,00	<20
BDR3	Bouches-du-Rhône	Cattle	45,00	<20

G1	Gard	Cattle	42,00	<20
G10	Gard	Cattle	34,00	<20
G11	Gard	Cattle	39,00	<20
G12	Gard	Cattle	55,00	<20
G13	Gard	Cattle	63,00	80
G3	Gard	Cattle	51,00	<20
G4	Gard	Cattle	54,00	<20
G5	Gard	Cattle	52,00	<20
G6	Gard	Cattle	71,00	<20
G9	Gard	Cattle	50,00	20
H10	Hérault	Cattle	211,00	80
H11	Hérault	Cattle	153,00	20
H12	Hérault	Cattle	63,00	40
H13	Hérault	Cattle	191,00	160
H14	Hérault	Cattle	158,00	40
H15	Hérault	Cattle	206,00	160
H16	Hérault	Cattle	206,00	160
H17	Hérault	Cattle	208,00	80
H18	Hérault	Cattle	201,00	160
H19	Hérault	Cattle	202,00	40
H2	Hérault	Cattle	116,00	80
H20	Hérault	Cattle	195,00	160
H22	Hérault	Cattle	130,00	<20
H3	Hérault	Cattle	198,00	160
H4	Hérault	Cattle	183,00	160
H5	Hérault	Cattle	178,00	160
H6	Hérault	Cattle	164,00	80
H7	Hérault	Cattle	164,00	20
H8	Hérault	Cattle	35,00	<20
H9	Hérault	Cattle	189,00	<20
PO1	Pyrénées-Orientales	Cattle	127,00	80
PO2	Pyrénées-Orientales	Cattle	112,00	160
PO3	Pyrénées-Orientales	Cattle	96,00	40
PO4	Pyrénées-Orientales	Cattle	107,00	80
PO5	Pyrénées-Orientales	Cattle	130,00	160
PO6	Pyrénées-Orientales	Cattle	152,00	160
PO7	Pyrénées-Orientales	Cattle	54,00	80
PO8	Pyrénées-Orientales	Cattle	140,00	40
PO9	Pyrénées-Orientales	Cattle	127,00	40
SR21	Hautes-Pyrénées	Red deer	65,33	40
SR22	Hautes-Pyrénées	Red deer	93,09	80
SR23	Hautes-Pyrénées	Red deer	112,85	160
SR24	Hautes-Pyrénées	Red deer	51,84	40

SR25	Hautes-Pyrénées	Red deer	37,26	80
SR26	Hautes-Pyrénées	Red deer	83,37	40
SR27	Hautes-Pyrénées	Roe deer	37,90	160
SR28	Hautes-Pyrénées	Roe deer	40,39	80
SR29	Hautes-Pyrénées	Roe deer	47,59	40
SR210	Hautes-Pyrénées	Red deer	39,79	<20
SR211	Hautes-Pyrénées	Roe deer	63,50	80
SR212	Hautes-Pyrénées	Roe deer	42,39	160
SR213	Hautes-Pyrénées	Red deer	66,87	160
SR214	Hautes-Pyrénées	Wildboar	52,95	40
SR215	Hautes-Pyrénées	Roe deer	108,38	<20
SR216	Hautes-Pyrénées	Wildboar	72,79	160
SR217	Hautes-Pyrénées	Roe deer	143,07	160
SR218	Hautes-Pyrénées	Wildboar	31,43	40
SR219	Hautes-Pyrénées	Red deer	101,11	160
SR220	Hautes-Pyrénées	Wildboar	87,77	80
SR221	Hautes-Pyrénées	Wildboar	54,71	40
SR222	Hautes-Pyrénées	Roe deer	76,37	20
SR223	Hautes-Pyrénées	Red deer	106,78	<20
SR224	Hautes-Pyrénées	Roe deer	106,87	160
SR225	Hautes-Pyrénées	Red deer	53,57	80
SR226	Hautes-Pyrénées	Wildboar	48,53	80
SR227	Hautes-Pyrénées	Red deer	97,39	80
SR228	Hautes-Pyrénées	Wildboar	74,90	160
SR229	Hautes-Pyrénées	Wildboar	124,46	160
SR230	Hautes-Pyrénées	Roe deer	51,76	160
SR231	Hautes-Pyrénées	Red deer	165,16	160
SR232	Hautes-Pyrénées	Red deer	92,60	160
SR233	Hautes-Pyrénées	Red deer	66,39	160
SR234	Hautes-Pyrénées	Red deer	92,23	160
SR235	Hautes-Pyrénées	Roe deer	133,52	160
SR236	Hautes-Pyrénées	Red deer	49,44	160
SR237	Hautes-Pyrénées	Roe deer	152,62	<20
SR238	Hautes-Pyrénées	Red deer	108,15	20
SR239	Hautes-Pyrénées	Roe deer	128,18	160
SR243	Lozère	Mouflon	39,45	80

Conclusion du chapitre 2 :

Comme présentés en première partie de ce chapitre, les résultats de sérologie obtenus en Corse confirment bien la présence et la circulation continue du VFHCC sur l'île, cinq ans après les premières preuves de détection sérologiques rapportées par Grech-Angelini *et al.* (2020). Cette étude confirme l'existence d'une zone de plus forte circulation du virus dans le Nord-Ouest de l'île, comme en 2014-2016. La séroprévalence bovine globale sur l'ensemble de l'île demeure pratiquement inchangée, bien qu'en légère hausse, et ce même avec une couverture géographique plus étendue. Cependant, une évolution est observée au niveau de certaines communes, pour la majorité passant du statut négatif à positif, ce qui suggère soit des différences dans d'échantillonnage des sérums entre les périodes 2014-2016 et 2019-2020 (non vérifiable du fait de l'anonymisation des élevages réalisée en 2014-2016), soit plus probablement une séroconversion récente de certains animaux entre 2014-2016 et 2019-2020 et donc une extension possible des zones de transmission virale. La présence de la tique *H. marginatum* en Corse remonte à plusieurs décennies, et elle y est abondante. En considérant l'éventualité d'une croissance continue des populations de tiques, il est envisageable d'observer une augmentation de la quantité de tiques porteuses du virus, même si les taux d'infection au sein de ces tiques restent faibles, au point qu'il n'a pas encore été possible d'amplifier des séquences génomiques du VFHCC. En conséquence, le risque de piqûre infectieuse, entraînant parfois des réactions immunitaires marquées, pourrait augmenter mais cette information serait corrélée à la détection physique du virus dans les tiques. Le fait que les séroprévalences bovines restent fortes (plus que chez les petits ruminants) au cours des deux campagnes, contrastées entre communes et entre élevages, et que les valeurs de DO sont bien distinctes entre animaux séronégatifs et séropositifs, vérifie la validité de la sérologie bovine comme outil de surveillance de la CCHF, en particulier pour la détection précoce et locale de circulation du VFHCC.

Concernant les résultats de sérologie sur le continent (**article 3**), ils ont permis pour la première fois la détection d'anticorps dirigés contre le VFHCC dans des élevages bovins du Sud, dans sept départements du pourtour méditerranéen. Cette découverte indique une propagation du virus dans le Sud de la France continentale. Toutefois, cette circulation varie selon les zones géographiques, présentant des profils diversifiés. Certains départements tels que l'Aveyron, le Tarn ou les Bouches-du-Rhône, présentent un nombre très limité d'échantillons séropositifs, malgré un effort d'échantillonnage conséquent, avec seulement un animal par élevage voire un animal par département présentant des anticorps, et des valeurs de DO relativement faibles, proches du seuil de détection. Cette occurrence témoigne probablement d'une exposition ponctuelle de ces animaux au VFHCC, soit par

la piqûre d'une tique infectée importée au stade immature via les oiseaux, soit de séjours antérieurs de ces animaux dans des zones à plus forte circulation avant leur arrivée dans les exploitations où ils ont été prélevés. Étant donné l'absence avérée ou prédite de *H. marginatum*, ces trois départements sont supposés indemnes de VFHCC, statut qu'il sera toutefois nécessaire de confirmer. Dans le Gard et l'Hérault, une situation intermédiaire se dessine, avec quelques communes séropositives éparpillées sur ces départements, et des élevages présentant pour la majorité un seul animal séropositif et seulement quelques élevages à séroprévalence intra-élevage élevée. Les valeurs de DO s'avèrent hétérogènes, mais certaines valeurs laissent peu de doute quant à la présence d'anticorps dirigés contre un virus potentiellement identifié comme le VFHCC. Enfin, dans les Pyrénées-Orientales et les Alpes-Maritimes, les séroprévalences sont bien plus fortes que dans les autres départements, et les valeurs de DO reflètent une exposition régulière des bovins à des tiques infectées. Comme en Corse, des foyers de circulation virale se concentrent autour de quelques communes, avec certains élevages atteignant 80% voire 100% d'animaux séropositifs mais d'autres élevages pourtant proches restant négatifs. Le cas des Alpes-Maritimes questionne pourtant, puisque la tique *H. marginatum* n'y a pour l'instant jamais été trouvée et la distribution des valeurs de DO des animaux séropositifs est assez étonnante, avec une large gamme de valeurs et deux pics dont un proche du seuil de détection. D'autres investigations entomologiques et sérologiques s'avèrent nécessaires dans ce département. Le modèle développé dans mon **article 3** confirme d'ailleurs l'absence d'effet de la présence de *H. marginatum* sur la séropositivité des bovins du continent, mais indique une séropositivité significativement plus élevée chez les bovins paissant dans des zones riches en milieux ouverts naturels. Ces derniers constituent un milieu favorable à *H. marginatum*, mais aussi à d'autres tiques xérophiles des genres *Hyalomma* ou *Rhipicephalus*, ainsi qu'à certains hôtes sauvages comme les sangliers ou les lièvres. L'habitat ne joue peut-être pas que sur l'exposition des bovins aux tiques mais aussi sur la présence d'hôtes vertébrés plus ou moins bons amplificateurs viraux, impactant tous deux le niveau de transmission du VFHCC. Bien que non significative, la forte proportion de forêts de conifères était conservée comme variable explicative de la séropositivité des bovins dans le modèle final, facteur qu'il faudra plus avant étudier. Concernant les variables liées aux pratiques d'élevage (type de production bovine, et mixité d'espèces animales dans les élevages) testées dans mon modèle, aucune n'a été retenue et n'a montré d'effet significatif. La typologie que nous avons conduite des élevages est d'ailleurs discutable, puisque réalisée à partir des races de vaches et de leur utilisation supposée, et pourrait être revue. Toutefois, le fait que l'exploitation d'origine des bovins mis en variable aléatoire expliquait une grande partie de la variance des données confirme bien l'effet notable des pratiques

d'élevages sur la séropositivité des bovins et l'importance de mieux les décrire pour comprendre leur rôle sur la transmission du VFHCC.

L'enquête sérologique en France continentale a également permis d'identifier la présence d'anticorps dirigés contre le VFHCC au sein de la faune sauvage (**article 3**). Des sérums positifs ont ainsi été détectés dans deux départements (Hautes-Pyrénées et Hérault) des six testés. Alors que seulement quelques sangliers ont été trouvés séropositifs dans l'Hérault (comme cela était le cas aussi pour la Corse), zone où *H. marginatum* est connue et abondante et où des bovins sont aussi séropositifs, la majorité des animaux sauvages trouvés séropositifs avaient été chassés dans les Hautes-Pyrénées, département où *H. marginatum* est supposée absente. Ce résultat questionne d'autant plus qu'outre des sangliers connus pour être des hôtes potentiels de *H. marginatum*, de nombreux chevreuils et cerfs y ont été trouvés séropositifs alors que ces derniers ne constituent a priori pas des hôtes classiques de *H. marginatum*. Ils sont par contre les hôtes préférentiels des stades adultes de *H. lusitanicum*, vecteur supposé majeur pour la transmission du VFHCC en Espagne et dont de petites populations ont été très récemment retrouvées dans les Bouches-du-Rhône près de l'étang-de-Berre alors qu'on la croyait disparue de France (Stachurski, communication personnelle). L'étude des communautés de tiques et d'hôtes présentes dans les Hautes-Pyrénées est donc essentielle, de même que dans les Alpes-Maritimes où des résultats similaires (fortes séroprévalences sans présence de tique *H. marginatum*) ont été obtenus chez les bovins. L'application du même type de modèle aux données de sérologie sur la faune sauvage n'a permis de mettre en évidence que l'effet du sexe des animaux, les mâles présentant des taux de séropositivité plus élevés que les femelles. Cette observation peut s'expliquer par le fait que les mâles ont tendance à explorer davantage de milieux et à avoir des domaines vitaux plus vastes, ce qui pourrait accroître leurs opportunités de contact avec les tiques vectrices et potentiellement infectées.

Enfin, tous ces résultats sérologiques produits sur faune domestique et sauvage, en Corse et sur le continent, ont été confirmés, pour partie des sérums, par séroneutralisation au laboratoire P4 de Lyon. Ainsi, la présence d'anticorps neutralisant spécifiquement l'effet pathogénique du VFHCC est confirmée, et le risque de réaction croisée en ELISA avec d'autres virus (proches du VFHCC tels que les virus Hazara et Dugbe et testés en séroneutralisation) écarté. De plus, outre les très bons résultats de sensibilité et spécificité produits par le fabricant, des études complémentaires ont montré qu'il n'y avait pas de corrélation entre les résultats de l'ELISA ID Screen® CCHF DAM utilisé dans mes études et ceux d'un ELISA dirigé contre le virus Dugbe, et que l'ELISA ID Screen® CCHF DAM était le seul test ELISA capable de discriminer les anticorps dirigés contre le VFHCC par rapport à deux virus proches (Hazara et Nairobi Sheep Disease) (Hartlaub *et al.*, 2020 et 2021). Au vu de ces informations,

nous pouvons raisonnablement considérer que les résultats sérologiques produits dans ma thèse révèlent la détection d'anticorps dirigés spécifiquement contre le VFHCC et donc que ce dernier circule en France, à moins qu'il ne s'agisse d'un VFHCC-*like*, très proche antigéniquement et pour l'instant inconnu. Seule la détection du virus dans les tiques, considérées comme les uniques réservoirs du VFHCC, pourrait permettre de définitivement confirmer la circulation de VFHCC chez les ongulés domestiques et sauvages en France. Pour cela une recherche des micro-organismes présents dans les tiques *H. marginatum* du Sud de la France, et notamment de VFHCC, a été réalisée et les résultats seront présentés dans le chapitre 3.

Chapitre 3 : Micro-organismes, agents infectieux et symbiotiques, portés par *Hyalomma marginatum*

Ce troisième chapitre se focalise sur l'identification de la communauté microbienne (agents infectieux tels que le VFHCC et/ou micro-organismes commensaux ou symbiotiques) portée par la tique *H. marginatum*, dans le but d'évaluer le rôle potentiel de cette tique exotique dans la transmission d'agents infectieux en France. Ailleurs dans le monde, *H. marginatum* est connue pour jouer un rôle crucial dans la transmission et l'émergence de divers agents infectieux et zoonotiques. En dehors du VFHCC, *H. marginatum* est suspectée pour transmettre la bactérie *Rickettsia aeschlimannii* à l'homme, les protozoaires *Theileria annulata* aux équidés, et possiblement aux bovins, ainsi que les virus Bhanja, Thogoto, Dhori ou Batken aux ruminants domestiques (de l'ARN de ces virus ayant été détecté chez cette espèce)(Bakheit *et al.* 2012 ; Bonnet *et al.* 2023). Malgré cela, la situation épidémiologique dans le sud de la France en ce qui concerne les agents infectieux transmis par *H. marginatum* et les maladies associées, demeure peu documentée, particulièrement sur le continent. Des recherches sur le terrain, menées en Corse, ont toutefois permis l'identification d'agents infectieux tels que des bactéries des genres *Rickettsia*, *Anaplasma* et *Bartonella* dans des tiques *H. marginatum* collectées principalement sur bovins (Grech-Angelini *et al.* 2020). D'autres analyses de qPCR n'ont pas mis en lumière la présence de VFHCC mais ont, en revanche, permis la détection d'un parapoxvirus sans savoir pour l'instant s'il est transmis ou simplement porté par les tiques et quelle pathogénicité il peut avoir (Cicculli *et al.* 2022b). Sous l'hypothèse que *H. marginatum* est nouvellement installée en France, avec des populations maintenant stables en Corse mais encore en cours d'installation sur le continent, on peut supposer soit que cette tique est arrivée avec son cortège d'agents infectieux exotiques et les a possiblement introduits en France, soit qu'elle a pu s'adapter et devenir vecteur d'agents infectieux autochtones et dans ce cas elle a peut-être modifié leur dynamique de transmission du fait de préférences trophiques et saisons d'activité différentes des autres espèces de tiques. Avoir une première idée de la communauté microbienne portée par *H. marginatum* en France permettra déjà de savoir si actuellement elle constitue un risque d'introduction de nouveaux agents infectieux, ou seulement de transmission d'agents existants. Bien que seules disponibles parfois, les données de portage d'agent infectieux par des tiques collectées dans la nature ne permettent pas de valider la compétence vectorielle de ces dernières, en particulier lorsque ces tiques ont été collectées sur animaux. En effet, dans ce cas précis, le portage de microorganismes pourrait être le simple reflet du dernier repas sanguin pris sur un animal et donc du statut infectieux de l'animal. Toutefois, croisé à d'autres types d'informations comme les modes de transmission (transovarienne ou transstadial) connus par d'autre espèces de tiques pour tel ou tel agent infectieux, ou encore la sensibilité respective des espèces animales portant la tique d'intérêt à un agent infectieux, le portage de microorganismes peut devenir une indication de la potentielle compétence vectorielle. Ainsi, pour qu'une tique puisse

agir en tant que vecteur pour un agent infectieux, il est impératif que cet agent se maintienne à travers les différentes étapes de développement de la tique, afin que cette dernière s'infecte et puisse retransmettre l'agent au cours de sa vie, ce qui est connu sous le nom de transmission transstadiale (Moutailler et al. 2017). De plus, pour qu'une transmission puisse se produire dès les stades immatures, une transmission préalable de l'agent infectieux à la descendance via l'infection des ovaires de la femelle doit avoir eu lieu, une notion appelée transmission transovarienne (Rodhain *et al.* 1985). Ainsi, on peut prédire que détecter un agent infectieux chez une *H. marginatum* adulte collectée sur un hôte qui n'est pas sensible à cet agent peut être le signe d'une infection de la tique aux stades immatures et d'une transmission transstadiale. Si l'hôte des stades immatures n'y est pas non plus sensible, cela peut alors suggérer une contamination du stade adulte précédent qui se sera gorgé sur une espèce animale sensible infectée et d'une transmission transovarienne de l'agent infectieux par la femelle à ses descendants, d'autant plus si ce mode de transmission a déjà été décrit pour cet agent chez d'autres espèces de tiques.

La première partie de ce chapitre expose les résultats obtenus grâce à une approche génomique ciblée, qui vise à détecter, par amplification PCR (réaction de polymérisation en chaîne) microfluidique en temps réel à haut débit, la présence de bactéries, de parasites protozoaires et de virus dans les tiques *H. marginatum* du sud de la France. Ces découvertes ont été compilées dans un article, dont je suis le premier auteur, intitulé "Tick-borne pathogens identified in *Hyalomma marginatum* (Acari: Ixodidae) collected from various vertebrate hosts in the South of France", et qui est présenté ci-dessous (**article 4**), prêt à être soumis à la revue "PCI Infection" (après dépôt complet des séquences). Ces travaux ont été présentés à l'oral lors du congrès « Tick and Tick-borne Patogens » en Roumanie en Août 2022. L'UMR BIPAR (Biologie moléculaire et Immunologie Parasitaire) INRAE/ANSES/Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort, a mis au point un outil de détection PCR microfluidique à haut débit spécifiquement conçu pour identifier les agents infectieux transmis par les tiques (Michelet et al. 2014). Cette technique novatrice repose sur l'utilisation d'une puce à ADN, élaborée en utilisant la technologie BioMark^{TM} dynamic arrays développée par la société Fluidigm Corporation (Standard Biotools). Elle permet d'effectuer des réactions de PCR en temps réel en utilisant des volumes extrêmement réduits, de l'ordre du nano-litre par un système de microfluidique. Cette approche autorise la détection simultanée de 48 à 96 cibles spécifiques de genre ou d'espèce de micro-organismes, au sein d'autant d'échantillons distincts (tiques individuelles ou échantillons regroupés sous forme de pools de tiques). En d'autres termes, une puce peut contenir jusqu'à 2 304 (48 x 48) voire 9 216 (96 x 96) réactions de PCR distinctes et simultanées, le tout réalisé en un laps de temps très court.

La seconde partie de ce chapitre présente les résultats obtenus par une approche complémentaire de métaprotéomique, laquelle vise à détecter sans a priori les micro-organismes des tiques. Elle a été appliquée sur un petit sous-échantillon de tiques (aussi testé en Fluidigm) provenant d'un des sites où les tiques analysées avec la méthode précédente avaient été collectées, ce qui permet de comparer les méthodes et apporter une preuve de concept sur cette technique pionnière. Afin d'être plus précis sur la localisation des micro-organismes détectés dans les tiques et donc sur la potentielle compétence vectorielle de ces dernières, cette technique a été appliquée non pas à des tiques entières mais aux organes disséqués. Ces travaux, dont je suis second auteur, ont été présentés sous forme de poster intitulé "First insights into the organ microbiome of *Hyalomma marginatum* ticks assessed by next-generation metaproteomics" au 5th International Metaproteomics Symposium à Avignon en Avril 2023 (poster 1 ci-dessous). Le travail expérimental de dissection et analyse des échantillons a été réalisé par Julien Sabardeil, étudiant en Master 2 Eco-Épidémiologie en 2021 que j'ai co-encadré, et le travail bioinformatique d'identification des micro-organismes par Nourredine Dahmani, étudiant de Master 2 Bioinformatique en 2022. Cette étude métaprotéomique repose sur l'utilisation d'une combinaison de techniques biochimiques visant à purifier et séparer les protéines, puis à les digérer en peptides caractéristiques. Les peptides ainsi générés sont ensuite séparés par nano-chromatographie et soumis à une analyse par spectrométrie de masse en tandem permettant de les identifier dans des bases de données telles que UniProtKB (Universal Protein Resource Knowledge Base) ou NCBI protein (National Center for Biotechnology Information). La métaprotéomique s'attache à identifier et quantifier les protéines d'échantillons biologiques complexes comme, par exemple, le microbiote intestinal humain (Lynch et Pedersen 2016). Les méthodes et protocoles utilisés en métaprotéomique ont évolué ces dernières années pour être adaptés à des études de grande ampleur, ou à des organismes dont le génome n'est pas encore séquencé et annoté, comme certains arthropodes utilisés en écotoxicologie (Gouveia et al. 2020). Nous avons appliqué ces approches analytiques pour décrire pour la première fois microbiome de certains organes de *H. marginatum*, comme les glandes salivaires et l'intestin, impliqués dans l'acquisition et la transmission d'agents infectieux et hébergeant des micro-organismes commensaux ou symbiotiques.

I. Partie 1 : Détection, à travers une méthode génomique ciblée, des agents infectieux présents dans les tiques *H. marginatum* du Sud de la France.

Article 4 :

Tick-borne pathogens identified in Hyalomma marginatum (Acari: Ixodidae) collected from various vertebrate hosts in the South of France.

Bernard Célia[1,2,3,*], Galon Clémence[4], Joly Kukla Charlotte[1,2,4], Cicculli Vincent[5], Falchi Alessandra[5], Grech-Angelini Sebastien[6], Poli Paul-Eric[7], Bastien Matthieu[3], Combes Benoit[3], Pollet Thomas[1,2], Moutailler Sara[4], Holzmuller Philippe[1,2,§], Vial Laurence[1,2,§]

CIRAD, UMR ASTRE, F-34398 Montpellier, France

[2] ASTRE, Univ Montpellier, CIRAD, INRAE, Montpellier, France

[3] French Establishment for Fighting Zoonoses (ELIZ), 54220 Malzéville, France

[4] ANSES, INRAE, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR BIPAR, Laboratoire de Santé Animale, Maisons-Alfort, F-94700, France ; clemence.galon@anses.fr ; sara.moutailler@anses.fr

[5] Bioscope Corse Méditerranée unit UR7310, Faculté de Sciences, Campus Grimaldi, Université de Corse, 20250 Corte, France

[6] Groupement Technique Vétérinaire of Corse

[7] INRAE, LRDE, Corte, France

Citation: Bernard C, Galon C, Joly Kukla C, Cicculli V, Falchi A, Grech-Angelini S, Poli PE, Bastien M, Combes B, Pollet T, Moutailler S, Holzmuller P and Vial L (submitted). Tick-borne pathogens identified in Hyalomma marginatum (Acari: Ixodidae) collected from various vertebrate hosts in the South of France.

ABSTRACT
Hyalomma marginatum is a common ectoparasitic tick of ungulates, lagomorphs, insectivores, ground-foraging birds, observed in Corsica for decades, but whose permanent establishment in mainland France is very recent. This species is known to be one of the main vectors of the Crimean-Congo Hemorrhagic Fever virus, but also of various parasitic, bacterial or viral pathogens. In this study, we investigated the molecular infection rates of numerous tick-borne pathogens in ticks mainly sampled on horses, and occasionally on other animal species, from the French Mediterranean rim and Corsica between 2016 and 2020. In total, 1, 195 DNA and RNA purified from individual tick or pools of ticks were screened for 26 microbial genera or species (viruses, bacteria and parasites), using a high-throughput microfluidic real-time PCR system (BioMark™ dynamic array system, Standard Biotools). For individuals ticks and pooled one, respectively, the most prevalent tick-borne microorganisms were Francisella-like endosymbionts at 97.0% and 96.8%, followed by Rickettsia aeschlimannii (76.4% and 96.4%), Theileria spp. and Theileria equi (3,5% and 0%; 1,9% and 5,8%), Anaplasma phagocytophilum (3.7% and 6.7%), and West Nile virus (0.1% and 0.4%). Babesia occultans (0.9%), Ehrlichia minasensis (0.3%), while Coxiella-like endosymbionts (0.1%) were only detected in ticks from mainland France. Our study provides a rapid overview of the diversity of microorganisms and tick-borne pathogens detected in the invasive tick H. marginatum in Mediterranean France. Our results question the possible distribution of tick-borne pathogens in Corsica and the continental departments of the Mediterranean rim. Our study opens up new research perspectives on the epidemiology of tick-borne pathogens carried by H. marginatum and on the associated public and veterinary health risks.

Keywords: Ticks; Hyalomma marginatum; tick-borne pathogens; endosymbionts, microfluidic PCR

Introduction

Worldwide, ticks are considered to be the first vectors of pathogens responsible for animal diseases and second behind mosquitoes for those affecting humans (Jongejan et Uilenberg 2004; Colwell, Dantas-Torres, et Otranto 2011). In France, about forty species of ticks are listed on the territory, most of them transmitting pathogens responsible for important public and veterinary health problems (Boulanger et McCoy 2017; PÉREZ-EID 2007). In particular, this includes *Ixodes ricinus* which is the main vector of the agents of Lyme borreliosis, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, or ticks from the genera *Dermacentor* or *Rhipicephalus* responsible for the transmission of equine piroplasmosis (Gray 1991; Nadal, Bonnet, et Marsot 2022). Recently, Vial et al. (2016) provided strong evidence for the presence of reproducing populations of the exotic tick *Hyalomma marginatum* in parts of southern France. While this tick species has been present in Corsica (a Mediterranean island of southern France) for several decades, it seems to be now established on the Mediterranean coastline of mainland in many areas such as Pyrénées-Orientales, Aude, Hérault, Gard, Var, Ardèche and Drôme (Bah et al. 2022). This tick has been also detected since many years in Spain (Palomar et al. 2016) and Italy (Satta et al. 2011), showing a possible continuum for the sanitary risks associated to *H. marginatum* in southwestern Europe. As a "generalist" tick, *H. marginatum* presents a large panel of vertebrate hosts, ranging from lagomorphs and birds for the immature stages to large domestic and wild ungulates for the adult ones (ref). This is a two-host tick, meaning that larvae and nymphs feed on the same individual, while the nymph detaches and moults into an adult that seeks out a new host for blood feeding. This diversity of hosts multiplies pathways for tick introduction through natural or human-driven animal movements and supposedly, increases occasions of pathogen transmission and possible spillover. Ticks of the genus *Hyalomma* are involved in the transmission of many human and animal pathogens in Eurasia and Africa (Bonnet et al. 2023). They can in particular carry parasites and bacteria such as *Theileria* spp., *Babesia* spp. and *Anaplasma* spp., responsible for piroplasmosis or other clinical signs (e.g. hyperthermia, asthenia, abortion...) in cattle or sheep (15, 16,17). Other infectious bacteria such as *Coxiella burnetii*, and *Rickettsia* spp. including *Ri. aeschlimannii* (Bakheit et al. 2012; Kilicoglu et al. 2020; Orkun 2022), as well as Bhanja and the West Nile virus (Formosinho et Santos-Silva 2006; Kolodziejek et al. 2014), can be carried by *H. marginatum*. Additionally, Orthonairoviruses such as the emerging and highly contagious Crimean Congo Hemorrhagic Fever virus (CCHFV) (Bakheit et al. 2012) can be transmitted by this tick spcies.,In the Mediterranean basin, two species of *Hyalomma* (*H. marginatum* and *H. anatolicum*) are used to be considered as the main vectors of CCHFV (Perveen et Khan 2022). However, viral RNA has been recently detected in *H. lusitanicum* collected from deer and wild boar in Spain, in higher proportion than in *H. marginatum*, suggesting major role of this additional tick in CCHFV transmission in this country (Moraga-Fernández et al. 2021). In France, based on our knowledge on local tick communities, we considered *H. marginatum* as the main candidate tick species likely to transmit CCHFV (Bernard et al. 2022). Considering the large geographic distribution of *H. marginatum*, from Spain to India and North Africa (Fernández-Ruiz et Estrada-Peña 2021), this questions about local adaptations in the abilities developed by this tick species to maintain and transmit all, or part of these pre-cited pathogens.

The objective of this study was thus to describe the panel of pathogens and/or endosymbiotic microorganisms in *H. marginatum* ticks locally in the South of France, especially the continent, through the detection of several targeted Tick-Borne Pathogens (TBPs) using a high-throughput microfluidic real-time PCR system (BioMark™ dynamic array system, Standard Biotools) in field tick specimens collected from different French areas, mainly on horses that are preferred hosts of adult stages. This work was part of a national surveillance program developed a few years ago to assess the risk of emergence of exotic diseases including tick-borne diseases in France, under the aegis of the French Ministry of Agriculture. In Corsica, first investigations were recently conducted on tick species collected from different hosts, especially cattle, and reported in *H. marginatum* high prevalence of *Francisella*-like endosymbionts, *Ri. aeschlimannii* and in a less extend *Candidatus Ri. Barberiae*, as well as the presence of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophylum* (V. Cicculli et al. 2019; Grech-Angelini et al. 2020). These studies also allowed the detection of new viruses in *H. marginatum*, for example a Pseudocowpox virus of which the zoonotic potential remains unknown (V. Cicculli et al. 2019). On the mainland where *H. marginatum* was not yet established only 15 years ago, such investigation has never been done. Keeping in mind that genomic detection of pathogens does not imply a mandatory vector competence of the tick for the considered microorganisms (Bonnet et al. 2023), the aim of this study was to know whether this tick arrived with its native associated pathogens usually described in endemic Mediterranean areas including Corsica, and may result in the introduction of new pathogens. Another alternative would be that *H. marginatum* can become a new vector for local French tick-borne pathogens

already present on the territory, with the risk of changing the local transmission dynamics of such pathogens due to its distinct seasonal activity from other local tick species.

Methods

Study area, period and hosts for tick collection

Among all the *H. marginatum* ticks analyzed in this study, 1,711 came from a large-scale tick sampling that was conducted on horses (the likely host of *H. marginatum* adult stages), at spring (the activity period of *H. marginatum* adult stages), in southern France (mainland and Corsica), between 2016 and 2020. This was carried out to determine and explain the distribution of the newly established tick *H. marginatum* on the French territory (Bah et al. 2022). Fourteen French departments forming a link from Spain to Italy, which are two countries where *H. marginatum* is known to be already present, plus the two departments from Corsica were sampled. *H. marginatum* ticks were detected in 56 and 38 equestrian structures in mainland France and in Corsica, respectively. On the mainland, a reference site in Pompignan, where *H. marginatum* is abundant and monitored for its dynamics of infestation on horses, was also sampled each year and 173 ticks from this site were finally included in this study. In Corsica, each year, the whole island was visited whereas on the mainland, most of *H. marginatum* were obtained in 2017, except for northern Gard and Ardèche that were investigated in 2019 (Figure 1). Among the 1,711 ticks, 900 collected in Corsica in 2019 and 2020 were grouped into 222 pools of 1 to 10 individuals according to different parameters of sex or hosts (Cicculli et al., 2022) and 811 were treated individually.

In Corsica, 118 ticks were also collected from cattle examined in three farms located in the northern part of the island, in 2019, and completing the tick monitoring carried out in slaughterhouses for tick-borne disease surveillance (V. Cicculli et al. 2019; Vincent Cicculli et al. 2022). Additionally, 7 and 37 *H. marginatum* ticks were obtained by punctual samplings in Hérault and Gard on wild boar in 2016 and birds in 2017, respectively. Ticks from birds were all immature stages, and were mostly associated to the resident avian fauna of Pompignan (Vial et al. 2016). Thus, taking all host species together, we worked on 973 ticks treated individually and 222 tick pools (1,195 samples)

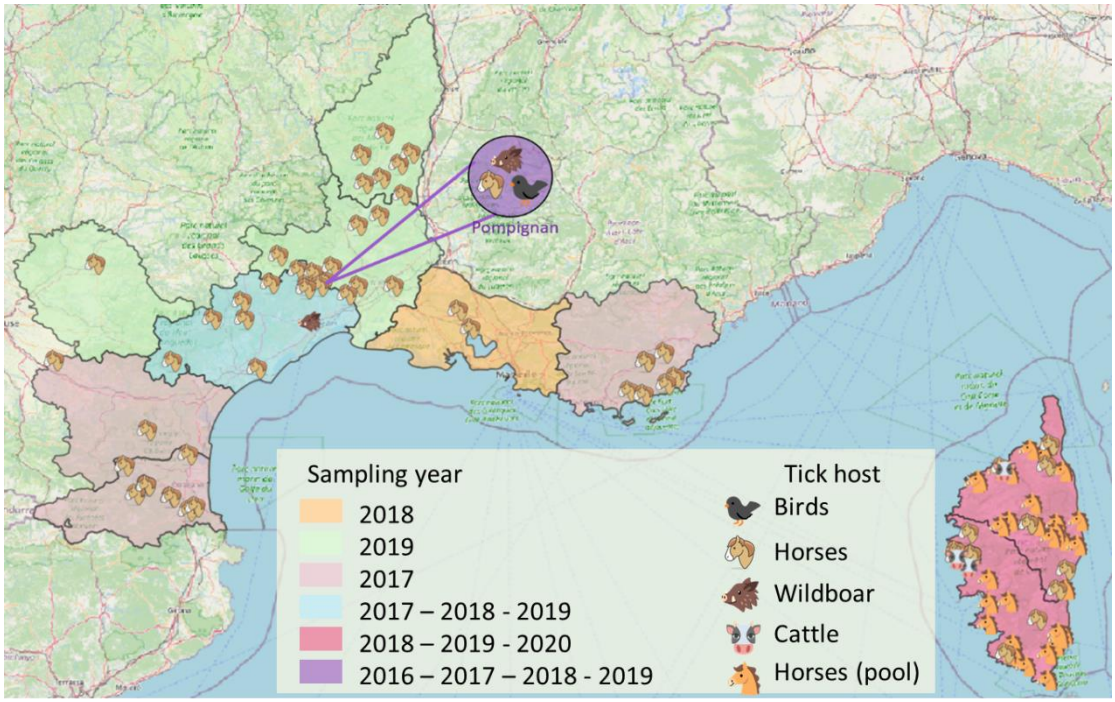


Figure 1: Study area overview : geographical scope of research. On this map, sites are represented by the host species from which the ticks were collected (horses, cattle, wild boar and birds)

During any tick samplings, animals were examined on the whole body and all ticks were collected. Back from the field, they were determined using morphological identification keys (PÉREZ-EID 2007), and sorted according to species, locality, host, gender (male/female), developmental stage (larva/nymph/adult), and engorgement status.

They were then frozen at -80°C for later molecular analysis. As this study focused on sanitary risks associated to the newly established *H. marginatum*, only specimens from this species were screened for microorganisms.

DNA and RNA extraction

As we looked for DNA and RNA of microorganisms in all tick samples, their treatment for molecular analysis was the same.

After a first washing in bleach for 30 sec followed by three times in distilled water for 1 min, ticks were crushed individually with three steel beads (2.8mm, OZYME, France) in 300µL DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, using the homogenizer Precellys® 24 Dual (Bertin, France) at 5500 rpm for 40s. The processing was different for samples of horses coming from Corsica as, prior to be crushed, ticks were pooled by up to 10 individuals per pool, according to locality and developmental stage (Vincent Cicculli et al. 2022).

DNA was extracted using 100µl of the homogenate of crushed ticks according to the Genomic DNA from tissue kit (Macherey-Nagel, Germany) following the manufacturer's instructions. Total DNA per sample was eluted in 50 µl of rehydration solution and stored at −20◦C until further use (Michelet et al, 2014).

Total RNA was extracted from 100µl of the homogenate of crushed ticks using the NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel, Germany) according to the manufacturer's instructions. Total RNA per sample was eluted in 50 µl of RNA free water and stored at −80◦C until further use (Gondard et al., 2018).

Detection of tick-borne microorganisms' DNA or RNA

The Reverse Transcription Master Mix kit (Standard Biotools, USA) was used on all samples to obtain cDNAs from RNA viruses. The reaction was performed in 5µL of final volume, including 1µL of Reverse Transcription Master Mix, 3µL of RNase-free ultrapure water, and 1µL of extracted RNA. A thermal cycler (Eppendorf, Germany) performed the RT cycles following the program: 25°C for 5 min, 42°C for 30 min and a final step at 85°C for 5 min for a total duration of 40 min.

A pre-amplification step was performed to pre-amplify the DNA/cDNA to increase the signal of the genetic material of the microorganisms compared to those of the tick. The PreAmp Master Mix kit (Standard Biotools, USA) was used. A 0.2X pool containing the primer pairs of the targeted pathogens was made upstream, to obtain a final primer concentration of 200 nM. For one sample, the mix was composed of 1 µL of PreAmp Master mix, 1.25 µl of the 0.2X pool, and 1.5 µl of ultra-pure water. Then 1.25µL of sample (DNA/cDNA mix) was added. A negative control (ultra-pure water) was added to each plate. PCR was then performed using a thermal cycler with the following program: 95°C for 2min, 14 cycles of two steps of 95°C for 15s and a final step of 4min at 60°C.

Then, for the real time microfluidic PCR, twenty-four sets of primers and probes were used to detect predefined microorganisms specifically targeted for this study (Table 1) (Michelet et al. 2014; Gondard et al. 2018). The BioMark™ real-time PCR system (Standard Biotools, USA) was used for high throughput microfluidic real-time PCR amplification using 48.48 dynamic arrays (Standard Biotools). These chips dispense 48 PCR mixes and 48 samples into individual wells, after which on-chip microfluidics assemble PCR reactions in individual chambers prior to thermal cycling resulting in 2,304 individual reactions (Michelet et al. 2014). In a single experiment, 47 ticks or tick pools (and one negative control) can be tested.

In order to develop the a priori approach to detect pathogens in ticks, we first generated a list of microorganisms (TBPs and endosymbionts) (Table 2) with the highest probability of being transmitted or carried by *H. marginatum*, according to data mining of the available literature. From two studies *(Bakheit et al. 2012; Bonnet et al. 2022)*, we identified several potentially *H. marginatum*-borne pathogens: protozoa such as *B. caballi* or *T. annulata*, bacteria like *Ri. aechlimannii* and finally viruses such as Thogoto, Dhori and Bhanja viruses (RNA for these viruses has already been detected in ticks), in addition to CCHFV. We then identified microorganisms from scientific literature that mentioned the detection of pathogens in *H. marginatum*, which could be transmitted by this tick or just reflect the infectious status of the animal host on which the tick was collected, as shown in Corsica or other regions of the world: *A. phagocytophilum*, *A. marginale (Grech-Angelini et al. 2020)*, *E. minasensis (Vincent Cicculli et al. 2019)*, *T. equi (Rocafort-Ferrer et al. 2022)*, the West Nile Virus *(Formosinho et Santos-Silva 2006; Kolodziejek et al. 2014)*, the symbiotic form of *Coxiella burnetii* and *Francisella tularensis* : *Coxiella*-like endosymbiont CLE and *Francisella-*

like endosymbiont FLE *(Kilicoglu et al. 2020; Selmi et al. 2019; Buysse et al. 2021; Demir et al. 2020)*. Then, some pathogens known to be transmitted by ticks of the genus *Hyalomma* but not necessarily *H. marginatum*, or even by other tick genera but with a likelihood to replicate in Hyalomma ticks, were also added to the chip: Alkhurma virus transmitted by *H. rufipes (Horton et al. 2016; Hoffman et al. 2018)*, as well as Nairobi sheep disease and Hazara viruses that are genetically close to CCHFV (35), *Borrelia miyamotoi* and *Bartonella henselae* that circulate in France in other tick species or even other arthropoda such as fleas *(Cosson et al. 2014; Grech-Angelini et al. 2020)*.

Table 1: Tick-borne pathogens and endosymbionts targeted by the chip of the high-throughput microfluidic real-time PCR system developed specifically for the study

Genus / Family	Species
Bacteria	
Anaplasma	*A. marginale, A. phagocytophilum, Anaplasma* spp.
Bartonella	*B. henselae, Bartonella* spp.
Borrelia	*B. miyamotoi, Borrelia* spp.
Coxiella	*Coxiella burnetii and Coxiella-like endosymbionts*
Ehrlichia	*Ehrlichia* spp.
Francisella	*F. tularensis, Francisella-like endosymbionts*
Rickettsia	*R. aeschlimannii, Rickettsia* spp.
Protozoan	
Babesia	*B. caballi*
Theileria	*T. equi, T. annulata, Theileria* spp.
Viruses	
Bunyaviridae	Nairobi sheep disease virus
Flaviviridae	West Nile Virus, Alkhurma virus
Nairoviridae	Hazara virus, CCHFV
Orthomyxoviridae	Thogoto virus, Dhori virus
Phenuiviridae	Bhanja virus

To confirm our results of detection in field samples, specific PCRs were performed individually from the chip results with the following primers (Table 2). Conventional PCRs using primers targeting genes or regions other than those of the BioMark™ system were used. Amplicons were sequenced by Eurofins MWG Operon (Germany), and then assembled using BioEdit software (Ibis Biosciences, Carlsbad). An online BLAST (National Center for Biotechnology Information) was used to compare results with published sequences listed in GenBank sequence databases.

Table 2: Primers used to confirm each pathogen through conventional and/or nested PCR.

Pathogen	Name	PCR type		Amorce name	Sequence
Anaplasma / Ehrlichia sp.	EHR	Nested	PCR1	EHR1	GAACGAACGCTGGCGGCAAGC
				EHR2	AGT AYC GRA CCA GAT AGC CGC
			PCR2	EHR3	TGCATAGGAATCTACCTAGTAG
				EHR2	AGT AYC GRA CCA GAT AGC CGC
	msp4	Conventionnal		MSP4AP5	ATG AAT TAC AGA GAA TTG CTT GTA GG
				MSP4AP3	TTA ATT GAA AGC AAA TCT TGC TCC TAT
Babesia / Theileria sp.	BTH	Nested	PCR1	BTH 18S 1st F	GTGAAACTGCGAATGGCTCATTAC
				BTH 18S 1st R	AAGTGATAAGGTTCACAAAACTTCCC
			PCR2	BTH 18S 2nd F	GGCTCATTACAACAGTTATAGTTTATTTG
				BTH 18S 2nd R	CGGTCCGAATAATTCACCGGAT
	babG	Conventionnal		BABGF2	GYY TTG TAA TTG GAA TGA TGG
				BABGR2	CCA AAG ACT TTG ATT TCT CTC
Borrelia sp.	FlaB	Nested	PCR1	FlaB280F	GCAGTTCARTCAGGTAACGG
				FlaRL	GCAATCATAGCCATTGCAGATTGT
			PCR2	flaB	GCATCAACTGTRGTTGTAACATTAACAGG
				FlaLL	ACATATTCAGATGCAGACAGAGGT
Rickettsia sp.	rsfg	Conventionnal		Rsfg877	GGGGGCCTGCTCACGGCGG
				Rsfg1258	ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA
	rc.rompB	Nested	PCR1	Rc.rompB.4362p	GTCAGCGTTACTTCTTCGATGC
				Rc.rompB.4,836n	CCGTACTCCATCTTAGCATCAG
			PCR2	Rc.rompB.4,496p	CCAATGGCAGGACTTAGCTACT
				Rc.rompB.4,762n	AGGCTGGCTGATACACGGAGTAA

Statistical analysis

The statistical analysis was conducted using R software (version 4.2.1, R Core Team).

In order to investigate the potential difference in the presence of *Rickettsia* between male and female ticks, a chi-square test was performed. The chi-square test is a statistical method commonly used to assess associations between categorical variables. The variables of interest were the presence of *Rickettsia* (1,0) and the gender (male or female), and the test was conducted to determine if there was a statistically significant association between gender and the presence of *Rickettsia*.

Then, in order to assess a spatial difference in the presence of each pathogen, we performed Kruskal-Wallis tests. The raw data consisted of two variables, the presence of each pathogen (1,0) and geographical cluster of ticks (A, B, or C). The data were imported into R and checked for accuracy and integrity. As the data did not meet the assumptions of independent observations, normality, and homogeneity of variances, a Kruskal-Wallis test was performed to compare the effect of geographical cluster of ticks (A, B, C) on the presence of each pathogen. The results of the Kruskal-Wallis test were reported, including the chi-squared test statistic, degrees of freedom, and p-value. Since the Kruskal-Wallis test detected a significant difference among the groups, additional post-hoc tests were performed to determine which specific groups differed significantly from each other. The post-hoc tests used were multiple comparisons of Mann-Whitney. The p-values of the post-hoc tests were adjusted for multiple comparisons using the Bonferroni method.

Results

1. Identification of microorganisms detected in H. marginatum

DNA and RNA of ten of the targeted tick-borne microorganisms were identified in 1195 *H. marginatum* ticks (973 individual ticks and 222 pools of 1 to 10 ticks) collected mainly on horses in the South of France, especially from continental areas, using the microfluidic real-time PCR system as a first screening method and then specific confirmation with dedicated conventional PCRs and sequencing. Using the Fluidigm method, we detected 2 ticks positive for *Borrelia* spp, 3 for *A. marginale*, 33 for *A. phagocytophilum*, 201 for *Anaplasma* spp, 3 for *Ehrlichia* spp,

878 for *Ri. aeschlimannii*, 957 for *Rickettsia* spp, 8 for *B. henselae*, 4 for *Bartonella* spp., 68 for *Theileria* spp, 22 for *T. equi*, 13 for West Nile Virus, 1 for CLE and 1 160 FLE for individual tick analysis. In terms of tick pools, the same method identified 19 positive pools for *Anaplasma* spp., 215 pools for *Ri. aeschlimannii*, 214 for *Rickettsia*. spp., 10 for *Theileria*. spp., 5 for *T. equi*, 216 for FLE and 3 in WNV Except for the well-known CLE and FLE (and because the pathogenic forms *C. burnettii* and *F. tularensis* were never detected in this study), any other amplified microorganisms suspected to be pathogenic were sequenced to be confirmed, at least for some amplicons.

For *Rickettsia* spp*.,* most of samples amplified specifically for *Ri. aeschlimannii* were also amplified in *Rickettsia spp.*, using the microfluigdim method. 18 amplicons (5 combining the two targets, 3 amplifying only *Ri. aeschlimannii* and 10 amplifying only *Rickettsia* spp.) were sequenced. Of the 10 readable sequences, all sequences confirmed the presence of *Ri. Aeschlimannii,* but formed two genetic groups. The first one showed the same sequence that was deposited on GenBank (AN: XXXXXXX) and presented 99% homology with the reference sequence of a *Ri. aeschlimannii* strain isolated from *H. marginatum* in the Crimean Peninsula of Russia in 2016 (AN: KU961544.1). 98.46% of this sequence was similar to that detected by Matsumoto *et al*. (Matsumoto et al. 2004) in an *H. marginatum* from Corsica. The second group, one of whose sequences has been deposited on GenBank (AN: XXXXXX), showed 98.77% homology with a strain isolated from an *H. marginatum* found in England in 2019 (AN: MT365092) and 97.85% homology with another strain detected in Corsica in 2019 (AN: MK732478) in a *Rhipicephalus bursa* tick.

For *Anaplasma* spp., all samples amplifying *A. marginale* were also positive for *Anaplasma* spp., which was not necessarily the case for *A. phagocytophilum* where samples were positive for *A. phagocytophilum* but not *Anaplasma* spp., and many samples were only amplified using primers targeting *Anaplasma* spp. 19 amplicons representative of the four cases (*A. marginale* + *Anaplasma* spp. / *A. phagocytophilum* only / *A. phagocytophilum* + *Anaplasma* spp. / *Anaplasma* spp. only) were sequenced, and only confirmed samples that combined the amplification of both specific and generic targets. The samples positive for *Anaplasma* spp. also identified *Devosia* spp by sequencing confirmation PCR products which is an ubiquitous soil bacteria that is considered as a PCR cross contaminant. Finally, two *Anaplasma* species were confirmed: *A. phagocytophilum* and *A. marginale*. The sequence of *A. phagocytophilum* obtained (GenBank, AN: XXXXXXX) showed 99% homology with the reference sequence from an *A. phagocytophilum* strain isolated in a *Rhipicephalus microplus* tick collected on a cow in Taiwan in 2021 (AN: OL690562.1) and 99.12% with a sequence from an *Ixodes ricinus*, in Hérault, France in 2010 (AN : OR426543). For *A. marginale*, the sequence obtained (GenBank, AN : XXXXX) showed 96% homology with reference sequence from an *A. marginale* strain isolated in a *H. schulzei* tick collected in Iran in 2019 (AN: MK310488) and 95,27 % from a strain isolated in cattle in 2017 in spain (AN: MT664983).

For *Ehrlichia spp.,* two amplicons were sequenced and were confirmed as *E. minasensis*. The resulting sequence deposited in GenBank (AN: XXXXXXX) showed 99% homology with the reference sequence NR_*148800.1* of a strain*,* which was isolated from the hemolymph of a *Riphicephalus microplus* tick from Brazil in 2019. Moreover, the sequence detected shows 98% homology with AN : JX629805 detected in xxx when of which the sequence detected in Corsica was 100% identical (Vincent Cicculli et al. 2019).

For *Theileria spp*., most of samples that were amplified specifically for *T. equi*, were also amplified for *Theileria spp*, except two samples only for *T.equi*, whereas other samples were only amplified for *Theileria* spp. No sample was amplified for *T. annulata*. 66 amplicons combing these three cases (*T. equi* only / *T. equi + Theileria spp.* / *Theileria spp.* only) were sequenced and confirmed the presence of *T. equi* for samples amplified for both targets as well as those amplified only for *T. equi*. All amplicons for *Theileria* spp. only produced sequences that could not allow species-specific identification despite repeated sequencing (unreadable sequence). For *T. equi,* the same sequence (GenBank, AN: XXXXXX) was obtained and showed 99% homology with the reference sequence from a *T. equi* strain isolated in Chile (AN: MT463613.1) in 2020 and 99,81% homology with a sequence from *Rhipicephalus bursa* in Corsica in 2019 (AN: MK732476.1).

Nine ticks detected positive for *Theileria* spp. only were finally confirmed by sequencing as infected by *Babesia occultans*. This ticks were only collected from cattle. The sequence was deposited in Genbank (AN: XXXXXX) and showed 99% homology with a sequence of *B. occultans* isolated from a *H. excavatum* tick collected on cattle in Turkey in 2022 (AN : OM066180.1).

One individual tick and one pool of ticks from Corsica were positive for the West Nile Virus. The amplification product was sequenced and deposited in Genbank (AN: XXXXXX) and showed 100% homology with the corresponding sequence in the complete genome detected from snowy owl in 2019 in Germany (AN : LR743458.1).

3. Prevalence of microorganisms in H. marginatum, host origin and spatial distribution

Results of individual and pooling detections are presented in Table 3.

FLE was the most prevalent microorganism, as detected in more than 95% of individual ticks and pools of ticks of *H. marginatum*. *Ri. aechlimannii* was detected in more than 75% of the analyzed individual ticks and 95% of pools of *H. marginatum*. Conversely, we only identified a CLE in one tick collected on a horse in Var. Then, prevalences of infection due to all the other targeted tick-borne pathogens ranged from 0.1 to 3.5% (up to 6.7% in pools). If we remove the associations between *Ri. aeschlimannii* that was highly prevalent and the other pathogens, the likelihood of coinfections in *H. marginatum* ticks seemed to be very low. In fact, only 3 coinfections were observed, two ticks carried both *B. occultans* and *A. marginale* and one tick carried both *E. minasensis* and *A. marginale*.

Although equine piroplasmosis is commonly reported in horses from the South of France (Rocafort-Ferrer et al. 2022) and ticks were mainly collected on horses, *T. equi* was detected in a very small number of ticks, 17 individual ticks from mainland France and 9 pools from Corsica, and no *B. caballi* was detected in the analyzed ticks. However, *B. occultans* was detected in nine individual ticks collected on cattle from Corsica. For bacteria, we evidenced two species of *Anaplasma* and one of *Erhlichia. A. marginale* was only detected in ticks collected on cattle in Corsica, while *A. phagocytophilum* was mainly found in ticks collected from horses but also on cattle and to a lesser extent in ticks collected on birds (n = 2/37). Birds were mainly infected by *Ri. aeschlimannii* (n = 15/37) (Table 2). *E. minasensis* was detected in four ticks, three from Corsican cattle and one from a horse on the mainland. Only one virus, the West Nile virus, was detected in one tick collected from a cow and one pool of ticks collected from a horse, both in Corsica (Table 2). *H. marginatum* ticks were all negative for CCHFV. No specific pathogens, except *Ri. aeschlimannii*, were found in wild boar ticks (n = 6/7). Except differences observed between ticks from horses versus cattle, and although *H. marginatum* ticks from other vertebrate hosts were highly underrepresented, their panel of microorganisms seemed to be quite similar to what was observed in horses.

Table 3: Microorganisms detected and confirmed in *H. marginatum* ticks, tested individually or by pools. The currently known or assumed pathogens are in black and the endosymbionts in grey

	Individual ticks (N=973)			Pools of ticks (N=222)		
	Nb. detected	Proportion (%)	Host	Nb. detected	Proportion (%)	Host
Rickettsia aeschlimannii	743	76,4	B, C, H, W	214	95,1	H
Francisella-like endosymbiots	944	97,0	B, C, H, W	216	97,3	H
Anaplasma phagocytophilum	33	3,4	B, C, H	15	6,7	H
Anaplasma marginale	3	0,3	C	0	0	H
Ehrlichia minasensis	3	0,3	C, H	0	0	H
Coxiella-like endosymbiots	1	0,1	H	0	0	H
Theileria spp.	34	3,5	H	0	0	H
Theileria equi	17	1,8	H	13	5,8	H
Babesia occultans	9	0,9	C	0	0	H
West Nile Virus	1	0,1	C	1	0,4	H

B: birds, C: cattle, H: horses, W: wild boars

Using Chi-square test, except for *Ri. aeschlimannii* and *B. occultans* we did not observe a significant difference in the presence of each pathogen between males and females ticks (*Ri. aeschlimannii* : χ^2 = 10.28 , df = 1, *P* = 0.001 ; *A. phagocytophilum* : χ^2 = 0.46 df = 1, *P* = 0.49 ; *A. marginale* : χ^2 = 1.37, df = 1, *P* = 0.24 ; *E. minasensis* : χ^2 = 1.37,

df = 1, P = 0.24 ; *Theileria* spp. : χ^2 = 1.37, df = 1, P = 0.24 ; *T. equi* : χ^2= 0.001, df = 1, P= 0.97 ; *B. occultans* : χ^2 = 4.14, df = 1, P = 0.04). *Ri. aeschlimannii* seemed to be much more present in male than female ticks (n(M) = 388 ; n(F) = 340) and *B. occultans* in females (n(M) = 1 ; n(F) = 8). As explained in Material and methods, looking for differences between development stages or hosts on which ticks were collected was not applicable, due to misrepresentation of some categories.

By mapping results of tick infections (Figures 2), we did not observe spatial differences for most of the detected pathogens. This was confirmed statistically on data collected in 2017 only, which constituted the main part of the sampling. However, and keeping in mind that some host species such as cattle were not sampled in all areas, some pathogens were only detected in Corsica, such as *A. marginale* and *B. occultans*, as well as WNV. In addition, although *Ri. aechlimannii* was widely represented in ticks from the South of France, we noticed significant differences between geographical areas. Considering the geographical clusters previously described for the distribution of *H. marginatum* in southern continental France (Bah et al. 2022) the prevalence of *Ri. aeschlimannii* was significantly higher in Pyrénées-Orientales and Aude than in Hérault and Gard (Kruskal-Wallis, χ^2 = 8.6102, df = 1, P = 0,01).

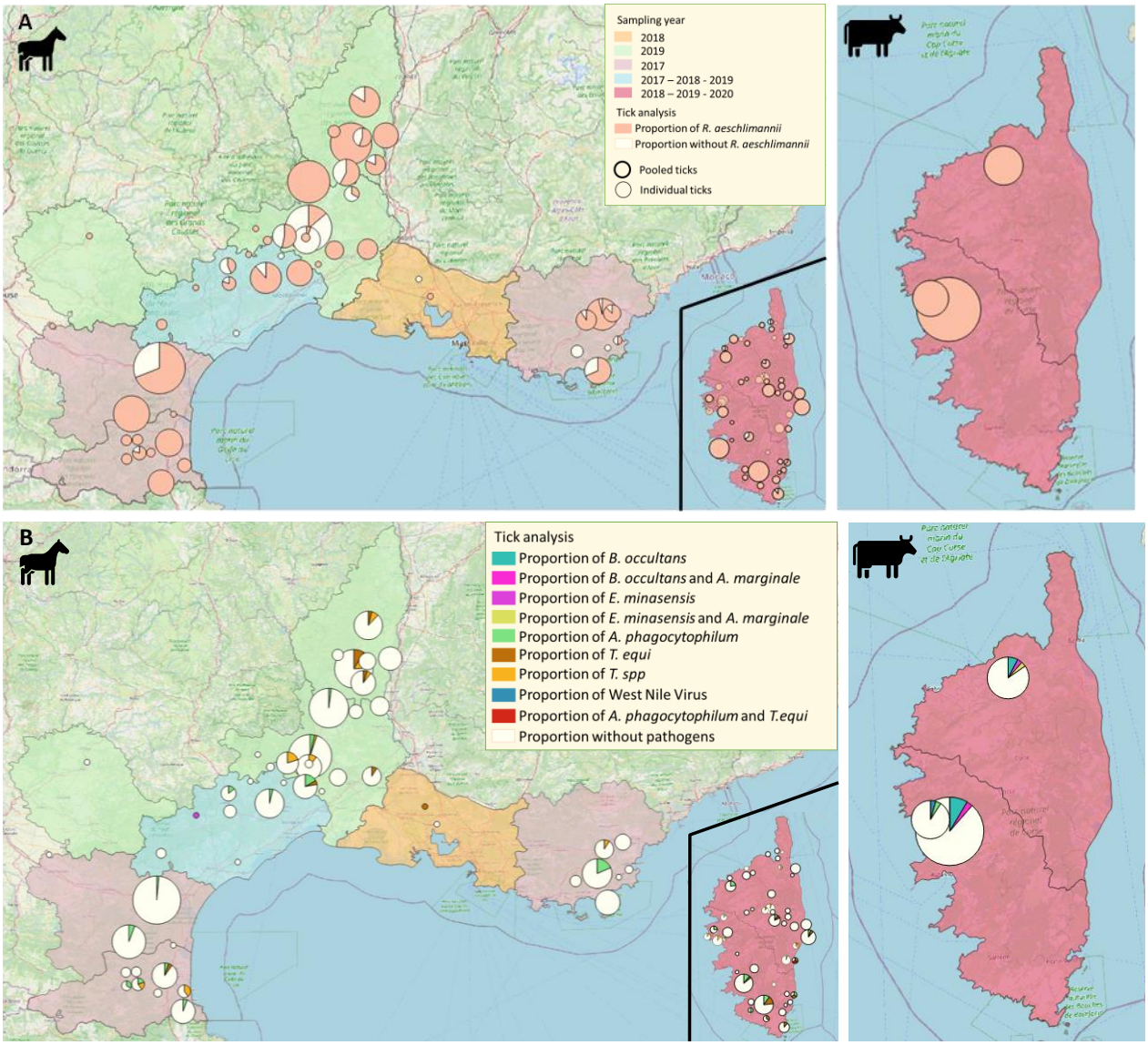


Figure 2: Distribution of *Rickettsia aeschlimannii (A)* in Ticks Among Horses (Left) and Cattle (Right), and prevalence of various pathogens (B) Among Horses (Left) and Cattle (Right) in each sampling site. The size of the circles is proportional to the number of ticks per site, the color of the department (in A and B) correspond to the samplig year.

Discussion

In this study, the microfluidic real time PCR technology was used for the detection of tick-borne microorganisms, including pathogens but also endosymbionts, in *H. marginatum* ticks collected mostly on horses and in a less extend on other animal species, in Corsica but also in the Mediterranean rim of mainland France where this species has recently settled (2016). The microfluidic method allowed the detection of eight known or suspected pathogens genera and species (namely *Ri. aeschlimannii*, *A. phagocytophilum*, *A. marginale*, *E. minasensis*, *Theileria* spp., *T. equi*, *B. occultans* and West Nile Virus) and two endosymbionts species (FLE and CLE) already known to circulate in France. Actually, the most abundant microorganisms detected were FLE and *Ri. aechlimannii*, whereas the prevalence of other microorganisms was low (0.1-6.7%).

The microfluidic method allows the high throughput targeted detection of defined parasites, bacteria and viruses, but may miss unexpected or new microorganisms that are present in the sample but not pre-listed as targeted candidates. This is questionable when investigating the panel of microorganisms that could be introduced by an invasive exotic tick species such as *H. marginatum*. This implies to identify, as comprehensively as possible, the range of microorganisms that are usually transmitted by, or at least detected in, such tick species in its original geographical areas, as it was done to develop and adapt the microfluidic array in this study. Our choice to target microorganism species but also larger genera and to confirm by sequencing allowed broadening our detection capacity, as it was the case for *B. occultans* confirmed in samples firstly positive for *Theileria* spp. However, confirmation of the amplifications using sequencing were carried out only on a small part of samples, resulting in extrapolations for samples showing similar amplification pattern. This was the case of *Anaplasma* spp. and *A. phagocytophilum* for which, out of 19 samples sent for sequencing, only two sequences confirmed the presence of *A. phagocytophilum*. The other sequences obtained corresponded to *Devosia* spp., which is an ubiquitous soil bacterium, contaminating numerous samples and probably co-amplified by our PCR primers targeting Anaplasma spp. In this case, the samples that were positive for *A. phagocytophilum* on the chip were all confirmed by extrapolation compared with the sequences obtained for the two samples (which had the same profile on the chip). Nevertheless, the main advantage of this high-throughput method is its capacity to screen a large number of tick samples, for different microorganisms in parallel, with a very small amount of material allowing detection at the individual scale. In our case, this permitted to provide for the first time the panel of microorganisms encountered in 973 individual and 900 in the 222 pools *H. marginatum* ticks collected in 9 French departments, from Spain to Italian borders and Corsica island, and no spatial heterogeneity for most pathogens. This method also generated first prevalence estimates of microorganisms (including TBPs) carried by *H. marginatum,* depending on the animal hosts on which they were collected. In some cases, by crossing ecological and epidemiological information on tick-host-pathogen associations considered in our study, this allowed to provide first hypotheses on the role of *H. marginatum* as a vector for local pathogens. However, as *H. marginatum* is a hunting tick, all the ticks included in our study were collected on animals during their blood feeding. This consequently questions on the origin of microorganisms' DNA or RNA detected in ticks, namely the ticks as arthropod reservoirs or the infected animal hosts via the remaining blood meal in the tick midgut, which may change our conclusions on tick vector competence. Although experimental studies are scarce, especially for some microorganisms requiring high biosafety levels, only the experimental validation of the ability of a tick species to acquire a pathogen on an infected host, to allow its replication or persistence, and to transmit it to a new naïve host is a formal evidence of vector competence for a given pathogen.

Francisella-like and *Coxiella*-like endosymbionts detected in our study are non-pathogenic mutualistic and/or commensal microbes, which play a key role in the tick's developmental process and pathogen transmission (Buysse et al. 2021; Hussain et al. 2022). In our study, about 97% of *H. marginatum* were infected by FLE, and only one tick was positive for CLE, which is coherent with previous observations that FLE outcompetes CLE in ixodid ticks (Kumar et al. 2022). High prevalence of FLE in *H. marginatum* ticks was previously observed, as it seems to be an ancestral primary endosymbiotic organism (mandatory to tick survival), being involved in nutritional symbiotic interactions including folate and riboflavin biosynthesis pathways plus biotin biosynthesis that are crucial for tick metabolism (Buysse et al. 2021)**.** Deprivation of their nutritional symbionts induced in ticks a complete stop of growth and moulting together with lethal physical abnormalities, which can be fully restored by exogenous supplementation with B vitamins. B vitamins are present at low concentrations in the blood compared to the amount required for arthropods development (Zhong, Jasinskas, et Barbour 2007; Duron et al. 2018; Serrato-Salas et Gendrin 2023), resulting in the need of production by endosymbionts.

The second most abundant bacterium carried by *H. marginatum* ticks was, *Ri. aeschlimannii,* detected in 75% of individual ticks and 95% of tick pools. It was reported that *Ri. aeschlimannii* infections in humans can cause spotted fever, in North Africa and South Africa, and in 2010 a first case occurred in Southern Europe, in a Greek patient (Germanakis et al. 2013), and two other cases were reported in Italy in 2016 and in Germany in 2019 (44; https://www.vidal.fr/actualites/23772-cas-suspect-de-fievre-tachetee-a-rickettsia-aeschlimannii-en-allemagne.html). *Ri. aeschlimannii* was first isolated from *H. marginatum* in 1997 from Morocco (Beati et al. 1997), and is now regularly reported in ticks from the whole Mediterranean area (Parola et al. 2014) as in Corsica, where Grech-Angelini et al (2020) have detected 100% of the pools of *H. marginatum* positive to *Ri. aeschlimannii*. In the latter case, the pool analysis was able to increase the estimated prevalence of infection compared with our analyses of individual ticks, which showed 76.4% prevalence of infection. For the analysis of pooled samples in our study, two were negative, and each contained a single tick. Given the high infestation rate of this pathogen in continental or Corsican ticks, and the pathogenicity of this bacterium, the risk of human exposure to *Ri. aeschlimannii* could be very high. In Corsica, it has been hypothesized that the strong presence of this bacterium could explain human cases of tick-borne spotted fever (Grech-Angelini et al. 2020). On the other hand, in mainland France, human cases of tick-borne spotted fever have not been reported so far, and this questions about the pathogenic potential of *Ri. aeschlimanii* found in *H. marginatum* ticks. *Ri. aeschlimannii* can be transovarially transmitted from *H. marginatum* ticks to their offspring, what strengthens the notion that *H. marginatum* may act as a reservoir for this bacterium (Matsumoto et al. 2004; Azagi et al. 2017). Considering the very high prevalence of *Ri. aeschlimannii* compared to any other pathogenic bacteria detected in *H. marginatum*, an alternative hypothesis could be its role as a secondary symbiont of *H. marginatum* ticks, which could regulate development of other infectious *Rickettsia* similarly to *Rickettsia peacockii* in *Dermacentor andersoni* (Baldridge et al. 2004). Contrary to a primary symbiont that is virtually fixed in the tick population because it is vital to them, secondary symbionts are not essential and may just give to ticks a higher selective value. At this stage, it is impossible to conclude on the role of *Ri. aeschlimannii* and further investigations are necessary, such as its detection specifically in tick salivary glands to conclude on its ability to be horizontally transmitted through tick bite and experimental trials of removal to describe its potential role for the tick metabolism.

Apart from *Ri. aeschlimannii*, bacterial DNA detected in *H. marginatum* was mostly represented by the genus *Anaplasma*, namely *A. phagocytophilum* and *A. marginale, remaining* both at low levels (3,7% in individual ticks, 6,7 % in pools for *A. phagocytophilum* and less than 1% of individual ticks for *A. marginale*). *A. phagocytophilum* is a zoonotic obligate intracellular bacterium causing Tick-Borne Fever in cattle and sheep, Human Granulocytic Anaplasmosis (HGA) in humans, and equine ehrlichiosis (Rikihisa 2011). This TBP has been reported in several countries in Europe (Matsumoto et al. 2006). There have been HGA cases reported in mainland France, with a first case identified in 2003 and others reported later but infrequently (Edouard et al. 2012). Human cases have also occurred in continental Italy (Ruscio et Cinco 2003). A recent study showed that in the French Pays Basque, 22.4% of collected *Rhipicephalus bursa* ticks contained *A. phagocytophilum* DNA (Dahmani et al. 2017). This is not the first time that this bacterium has been identified in *H. marginatum*, as one tick was found infected in Israel in 2007 (Keysary et al. 2007), and three in Tunisia in 2012 (M'ghirbi et al. 2012). As observed in our study, prevalence in ticks was always low (inferior to 3,5%), while the bacterium was highly present in cattle (Woldehiwet 2006) and horses (67% of positive horses, (M'ghirbi et al. 2012)), which are the likely hosts of *H. marginatum* adult stages. If ticks contracted the bacterium during their blood meal, there would supposedly be a larger proportion of positive ticks, and this allows us to assume a potential role of *H. marginatum* as vector, a hypothesis that needs to be further investigated. Some tick species (*Dermacentor albipictus, Rh. annulatus*) transmit this pathogen trans-ovarially. This transmission has been estimated between 10 and 40% in *D. albipictus*. In the absence of information on the vector competence of *H. marginatum* for *A. phagocytophilum* and in view of our results, we can say that *H. marginatum* may be involved in the transmission of this bacterium. Additionally to A. phagocytophilum, *A. marginale* DNA was found in three *H. marginatum* ticks collected from cattle in Corsica, which is consistent with its etiologic role in the erythrocytic bovine anaplasmosis that can affect various species of domestic and wild ruminants, including cattle (Aubry et Geale 2011), and that is largely distributed in France. This bacterium has been already reported in ticks from Corsica (Dahmani et al. 2017; V. Cicculli et al. 2019), including *H. marginatum* (Grech-Angelini et al. 2020). Although not considered as a primary vector of this bacterium (Atif 2015), and because we only found infected ticks when they were collected from cattle, it appears that the presence of this pathogen in our ticks could be the reflect of their host's infection. Another bacterium detected in *H. marginatum* was *E. minasensis.* In 2014, it was found to naturally infect cattle in Brazil and cause clinical ehrlichiosis in an experimentally infected calf (Aguiar et al. 2014). The distribution of *E. minasensis* is not restricted to the American continent (Gajadhar et al. 2010; Cruz et al. 2012;

Aguiar et al. 2014), and this bacterium was reported recently in Corsica island (Vincent Cicculli et al. 2019), in Pakistan (Rehman et al. 2019), Ethiopia (Hailemariam et al. 2017), South Africa (Iweriebor et al. 2017) and Israel (Thomson et al. 2018). *E. minasensis* infects not only bovines (Gajadhar et al. 2010; Aguiar et al. 2014; Hailemariam et al. 2017), cervids (Lobanov et al. 2012) or dogs (Thomson et al. 2018), but also horses (Muraro et al. 2021). Although the vector competence of ticks for this microorganism remains to be tested, *E. minasensis* has already been identified in several tick species including *R. microplus* (Cruz et al. 2012; Carvalho et al. 2016), *R. appendiculatus* (Iweriebor et al. 2017) and *H. anatolicum* (Rehman et al. 2019). In 2019, Cicculli et al (2019) identified this bacterium in 3.7% of *H. marginatum* collected from cattle in Corsica. In our study, *E. minasensis* was detected in few ticks, two from cattle in Corsica and one from a horse in mainland France (Hérault department). The three ticks were collected fully engorged and still attached to their host. The role of *H. marginatum* in the transmission of *E. minasensis* remains unknown. Nevertheless, despite very low observed prevalence, we cannot exclude but only hypothesize a vertical transmission to immature stages of *H. marginatum* or horizontal transmission from infected hosts or through co-feeding with other ticks, insuring possible maintenance and transmission of the bacterium.

Concerning protozoan microorganisms, DNA detected in *H. marginatum* was mostly represented by the genus *Theileria*. On the one hand, there is *T. equi* which is a causative agent of equine piroplasmosis (EP) which can also be due to *B. caballi* (not detected in this study) (Wise et al. 2013). *T. equi* infects wild and domestic equines worldwide, and are enzootic in many countries including several European countries bordering the Mediterranean sea such as France (Tirosh-Levy et al. 2020). The parasite is transmitted by hard tick species belonging to several genera including *Hyalomma, Dermacentor, Rhipicephalus, Amblyomma,* and *Haemaphysalis* (Scoles et Ueti 2015; Tirosh-Levy et al. 2020). This is not the first time that this apicomplexan parasite has been identified in *H. marginatum* in France, as 43% of ticks collected previously on horses in Camargue were found positive in 2022 (Rocafort-Ferrer et al. 2022). EP is known to be widely distributed in France, particularly in the South (Rocafort-Ferrer et al. 2022). If the majority of horses on which ticks engorged were positive and ticks could be infected *via* the blood meal, then they would have been almost all positive. However, we detected a few *T. equi* positive samples, despite the fact that many horses in the South of France are asymptomatic carriers of this parasite (Rocafort-Ferrer et al. 2022). This result may be explained by the fact that the areas sampled are not of high parasite circulation contrary to Camargue where the prevalence of *T. equi* is high (Rocafort-Ferrer et al. 2022), or by the fact that the primers used are not those that enable this parasite to be detected more widely or that *H. marginatum* is not a vector for this parasite. This avenue remains to be explored, and we will need to test again our samples with new primers to find out whether the prevalence of infection is increasing. However, this is not the only case where the prevalence of infection in horses was high although the prevalence of infection in ticks remained low. This was shown by Nadal (Nadal 2019), who found 50% infected horses and only 3% positive ticks. Addsq<itionally, as we did not detect any ticks positive for *B. caballi*, we can assume that whether this pathogen is not circulating or no longer circulating in the South of France, or that the primers used for PCR amplification also failed to detect it. We thus assume that few to no horses were actually infected by *B. caballi* in our sampling areas, which is commonly observed (Rocafort-Ferrer et al. 2022). About 5% of our collected ticks were positive for the genus *Theileria*, suggesting a low circulation in horses and therefore a very low transmission to ticks. While the risk of introduction of some pathogens belonging to the genus *Theileria* causing tropical theileriosis was questioned with the arrival of *H. marginatum* in France*, T. annulata* DNA has not been detected in the collected ticks of this study, neither *T. buffeli*, a benign cattle pathogen, previously detected in Corsica (ICTTD, 2000). Curiously, in two third of the cases, we were not able to identify the species of *Theileria* because of unsuccessful sequencing. In these cases, we can make several hypotheses. For ticks collected from cattle, we can wonder if it is *T. annulata* or *T. buffeli* because they are both present in cattle, despite no other species than *T. equi* was characterized. It could also be *T. equi*, as five different genotypes are known in the world and cannot be all amplified using the same primers, or *T. haneyi*, detected since 2018 in USA (Knowles et al. 2018), that may also potentially be considered as an agent of EP (Knowles et al. 2018; Sears et al. 2019). We have finally detected *B. occultans* in cattle ticks from Corsica. Some studies have detected *B. occultans* in *H. rufipes*, *H. marginatum*, *R. turanicus*, and *H. excavatum* ticks (Aktas, Vatansever, et Ozubek 2014; Ros-García et al. 2011; Orkun 2019; Orkun et al. 2020). So far, only *H. rufipes* has been confirmed as a vector of *B. occultans* (Ozubek et al. 2020) and *H. marginatum* is not described as a potential vector of this pathogen. In our study, it can be assumed that ticks engorged on cows carrying this parasite and got infected during their blood feeding. Nevertheless, it cannot be ruled out that an evolutive adaptation could lead to *H. marginatum*-borne transmission of *B. occultans* in southern Europe. This deserves further investigations in *H. marginatum* ticks collected on cattle populations, as recently done in Morocco (Elhachimi et al. 2021).

One virus was detected in this study and it was the WNV in one individual tick, which was collected from a Corsican cow in 2019 and one pool of ticks from a Corsican horse in the south part of the island. Since cattle do not appear to be involved in the WNV natural cycle, it can be assumed that the tick has been infected by the virus during its previous blood meal at immature stage, which probably took place on a bird. Birds, unlike cattle, are involved in the WNV cycle and are even considered as reservoirs of the virus as they are able of re-infecting vectors (usually mosquitoes) (Vaughan, Newman, et Turell 2022), and therefore possibly ticks feeding on them. For the tick pool of 10 males from a horse, considering that horse is an epidemiological dead-end for WNV as it does not produce a sufficient viremia to infect vectors and therefore ticks (David et Abraham 2016), and that adult males engorged much less than females even not at all, the transmission of the virus from the horse to the ticks did probably not occur. This raises the hypothesis that *H. marginatum* would be able at least of transstadial transmission of WNV, which is not a sufficient evidence to confirm its full vector competence. However, the horizontal transmission of WNV to an uninfected vertebrate host by *H. marginatum* at immature and adult stages was experimentally demonstrated in Portugal (Formosinho et Santos-Silva 2006). Because the WNV can cause neurological disease and death in people, our results encourage to intensify monitoring of the WNV in *H. marginatum* and consolidate information on the potential transmission of the virus by this tick species.

With the exception of known or suspected endosymbiont, infection prevalence for endemic pathogens remain very low in the tick *H. marginatum*. Its vector competence can be suspected for *T.equi* and *A. phagocytophilum*. Finally, we did not detect any new exotic pathogens that might have been brought in with *H. marginatum* from its original distribution area. On the basis of all this information, and keeping in mind that this epidemiological situation may change in the future, we can conclude that *H. marginatum* does not currently present a major health risk for humans or animals in France, but must remain highly monitored due to its ability to spread on long distances via bird migrations and terrestrial animal trade and to transmit CCHFV as it was already confirmed in surrounding countries.

Acknowledgements

This is your acknowledgments.

Data, scripts and codes availability

Data are available online: XXXXDOI of the webpage hosting the data https://doi.org/10.5802/fake.doi
The DOI hyperlink should be active

Conflict of interest disclosure

The authors of this preprint declare that they have no financial conflict of interest with the content of this article. XXXXif some of the authors are recommenders of a PCI, indicate it here. XXXX and XXXX are recommenders for PCI XXXX.

Funding

Funding sources should be listed here

References

Aguiar, Daniel M., Thayza F. Ziliani, Xiaofeng Zhang, Andreia L. T. Melo, Ísis A. Braga, Rute Witter, Leodil C. Freitas, et al. 2014. « A Novel Ehrlichia Genotype Strain Distinguished by the TRP36 Gene Naturally Infects Cattle in Brazil and Causes Clinical Manifestations Associated with Ehrlichiosis ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 5 (5): 537-44. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.03.010.

Aktas, Munir, Zati Vatansever, et Sezayi Ozubek. 2014. « Molecular Evidence for Trans-Stadial and Transovarial Transmission of Babesia Occultans in Hyalomma Marginatum and Rhipicephalus Turanicus in Turkey ». *Veterinary Parasitology* 204 (3-4): 369-71. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.05.037.

Atif, Farhan Ahmad. 2015. « Anaplasma Marginale and Anaplasma Phagocytophilum: Rickettsiales Pathogens of Veterinary and Public Health Significance ». *Parasitology Research* 114 (11): 3941-57. https://doi.org/10.1007/s00436-015-4698-2.

Aubry, P., et D. W. Geale. 2011. « A Review of Bovine Anaplasmosis ». *Transboundary and Emerging Diseases* 58 (1): 1-30. https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x.

Azagi, Tal, Eyal Klement, Gidon Perlman, Yaniv Lustig, Kosta Y. Mumcuoglu, Dmitry A. Apanaskevich, et Yuval Gottlieb. 2017. « Francisella-Like Endosymbionts and Rickettsia Species in Local and Imported Hyalomma Ticks ». *Applied and Environmental Microbiology* 83 (18): e01302-17. https://doi.org/10.1128/AEM.01302-17.

Bah, Madiou Thierno, Vladimir Grosbois, Frédéric Stachurski, Facundo Muñoz, Maxime Duhayon, Ignace Rakotoarivony, Anaïs Appelgren, et al. 2022. « The Crimean-Congo haemorrhagic fever tick vector Hyalomma marginatum in the south of France: Modelling its distribution and determination of factors influencing its establishment in a newly invaded area ». *Transboundary and Emerging Diseases* 69 (5): e2351-65. https://doi.org/10.1111/tbed.14578.

Bakheit, M, A Latif, Z Vatansever, U Seitzer, et J Ahmed. 2012. « The Huge Risks Due to Hyalomma Ticks ». https://doi.org/10.1007/978-3-642-28842-5_8.

Baldridge, Gerald D., Nicole Y. Burkhardt, Jason A. Simser, Timothy J. Kurtti, et Ulrike G. Munderloh. 2004. « Sequence and Expression Analysis of the ompA Gene of Rickettsia Peacockii, an Endosymbiont of the Rocky Mountain Wood Tick, Dermacentor Andersoni ». *Applied and Environmental Microbiology* 70 (11): 6628-36. https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6628-6636.2004.

Beati, L., M. Meskini, B. Thiers, et D. Raoult. 1997. « Rickettsia Aeschlimannii Sp. Nov., a New Spotted Fever Group Rickettsia Associated with Hyalomma Marginatum Ticks ». *International Journal of Systematic Bacteriology* 47 (2): 548-54. https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-548.

Bernard, Célia, Philippe Holzmuller, Madiou Thierno Bah, Matthieu Bastien, Benoit Combes, Ferran Jori, Vladimir Grosbois, et Laurence Vial. 2022. « Systematic Review on Crimean–Congo Hemorrhagic Fever Enzootic Cycle and Factors Favoring Virus Transmission: Special Focus on France, an Apparently Free-Disease Area in Europe ». *Frontiers in Veterinary Science* 9. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.932304.

Bonnet, Sarah I., Stéphane Bertagnoli, Alessandra Falchi, Julie Figoni, Johanna Fite, Thierry Hoch, Elsa Quillery, et al. 2023. « An Update of Evidence for Pathogen Transmission by Ticks of the Genus Hyalomma ». *Pathogens* 12 (4): 513. https://doi.org/10.3390/pathogens12040513.

Bonnet, Sarah I., Gwenaël Vourc'h, Alice Raffetin, Alessandra Falchi, Julie Figoni, Johanna Fite, Thierry Hoch, Sara Moutailler, et Elsa Quillery. 2022. « The Control of Hyalomma Ticks, Vectors of the Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus: Where Are We Now and Where Are We Going? » *PLoS Neglected Tropical Diseases* 16 (11): e0010846. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010846.

Boulanger, Nathalie, et Karen D. McCoy, éd. 2017. *Tiques et maladies à tiques : Biologie, écologie évolutive, épidémiologie*. *Tiques et maladies à tiques : Biologie, écologie évolutive, épidémiologie*. Didactiques. Marseille: IRD Éditions. https://doi.org/10.4000/books.irdeditions.9001.

Buysse, Marie, Anna Maria Floriano, Yuval Gottlieb, Tiago Nardi, Francesco Comandatore, Emanuela Olivieri, Alessia Giannetto, et al. 2021. « A dual endosymbiosis supports nutritional adaptation to hematophagy

in the invasive tick Hyalomma marginatum ». Édité par Bruno Lemaître, Patricia J Wittkopp, Bruno Lemaître, Sukanya Narasimhan, et Alejandro Manzano-Marin. *eLife* 10 (décembre): e72747. https://doi.org/10.7554/eLife.72747.

Carvalho, Izabelle T. S., Andréia L. T. Melo, Leodil C. Freitas, Rodolfo V. Verçoza, Alvair S. Alves, Jackeliny S. Costa, Cristiane S. Chitarra, et al. 2016. « Minimum Infection Rate of Ehrlichia Minasensis in Rhipicephalus Microplus and Amblyomma Sculptum Ticks in Brazil ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 7 (5): 849-52. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.04.004.

Cicculli, V., L. Capai, Y. Quilichini, S. Masse, A. Fernández-Alvarez, L. Minodier, P. Bompard, R. Charrel, et A. Falchi. 2019. « Molecular Investigation of Tick-Borne Pathogens in Ixodid Ticks Infesting Domestic Animals (Cattle and Sheep) and Small Rodents (Black Rats) of Corsica, France ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 10 (3): 606-13. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.02.007.

Cicculli, Vincent, Apolline Maitre, Nazli Ayhan, Stevan Mondoloni, Jean-Christophe Paoli, Laurence Vial, Xavier N. de Lamballerie, Remi Charrel, et Alessandra Falchi. 2022. « Lack of Evidence for Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Ticks Collected from Animals, Corsica, France ». *Emerging Infectious Diseases* 28 (5): 1035-38. https://doi.org/10.3201/eid2805.211996.

Cicculli, Vincent, Shirley Masse, Lisandru Capai, Xavier de Lamballerie, Remi Charrel, et Alessandra Falchi. 2019. « First detection of Ehrlichia minasensis in Hyalomma marginatum ticks collected from cattle in Corsica, France ». *Veterinary Medicine and Science* 5 (2): 243-48. https://doi.org/10.1002/vms3.140.

Colwell, Douglas D., Filipe Dantas-Torres, et Domenico Otranto. 2011. « Vector-Borne Parasitic Zoonoses: Emerging Scenarios and New Perspectives ». *Veterinary Parasitology* 182 (1): 14-21. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.012.

Cosson, Jean-François, Lorraine Michelet, Julien Chotte, Evelyne Le Naour, Martine Cote, Elodie Devillers, Marie-Lazarine Poulle, et al. 2014. « Genetic Characterization of the Human Relapsing Fever Spirochete Borrelia Miyamotoi in Vectors and Animal Reservoirs of Lyme Disease Spirochetes in France ». *Parasites & Vectors* 7 (1): 233. https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-233.

Cruz, Alejandro Cabezas, Erich Zweygarth, Mucio Flavio Barbosa Ribeiro, Julia Angelica Gonçalves da Silveira, Jose de la Fuente, Libor Grubhoffer, James J. Valdés, et Lygia Maria Friche Passos. 2012. « New species of Ehrlichia isolated from Rhipicephalus (Boophilus) microplus shows an ortholog of the E. canis major immunogenic glycoprotein gp36 with a new sequence of tandem repeats ». *Parasites & Vectors* 5 (1): 291. https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-291.

Dahmani, Mustapha, Bernard Davoust, Frédéric Rousseau, Didier Raoult, Florence Fenollar, et Oleg Mediannikov. 2017. « Natural Anaplasmataceae Infection in Rhipicephalus Bursa Ticks Collected from Sheep in the French Basque Country ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 8 (1): 18-24. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.09.009.

David, Shoba, et Asha Mary Abraham. 2016. « Epidemiological and Clinical Aspects on West Nile Virus, a Globally Emerging Pathogen ». *Infectious Diseases (London, England)* 48 (8): 571-86. https://doi.org/10.3109/23744235.2016.1164890.

Demir, Samiye, Sedef Erkunt Alak, Ahmet Efe Köseoğlu, Cemal Ün, Muhammed Nalçacı, et Hüseyin Can. 2020. « Molecular Investigation of Rickettsia Spp. and Francisella Tularensis in Ticks from Three Provinces of Turkey ». *Experimental & Applied Acarology* 81 (2): 239-53. https://doi.org/10.1007/s10493-020-00498-y.

Duron, Olivier, Olivier Morel, Valérie Noël, Marie Buysse, Florian Binetruy, Renaud Lancelot, Etienne Loire, et al. 2018. « Tick-Bacteria Mutualism Depends on B Vitamin Synthesis Pathways ». *Current Biology* 28 (12): 1896-1902.e5. https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.04.038.

Edouard, Sophie, Christelle Koebel, François Goehringer, Cristina Socolovschi, Benoit Jaulhac, Didier Raoult, et Philippe Brouqui. 2012. « Emergence of Human Granulocytic Anaplasmosis in France ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 3 (5): 403-5. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.10.002.

Elhachimi, Latifa, Carolien Rogiers, Stijn Casaert, Siham Fellahi, Thomas Van Leeuwen, Wannes Dermauw, Félix Valcárcel, et al. 2021. « Ticks and Tick-Borne Pathogens Abound in the Cattle Population of the Rabat-Sale Kenitra Region, Morocco ». *Pathogens (Basel, Switzerland)* 10 (12): 1594. https://doi.org/10.3390/pathogens10121594.

Fernández-Ruiz, Natalia, et Agustín Estrada-Peña. 2021. « Towards New Horizons: Climate Trends in Europe Increase the Environmental Suitability for Permanent Populations of Hyalomma Marginatum (Ixodidae) ». *Pathogens (Basel, Switzerland)* 10 (2): 95. https://doi.org/10.3390/pathogens10020095.

Formosinho, P., et M. M. Santos-Silva. 2006. « Experimental Infection of Hyalomma Marginatum Ticks with West Nile Virus ». *Acta Virologica* 50 (3): 175-80.

Gajadhar, Alvin A., Vladislav Lobanov, W. Brad Scandrett, John Campbell, et Batol Al-Adhami. 2010. « A Novel Ehrlichia Genotype Detected in Naturally Infected Cattle in North America ». *Veterinary Parasitology* 173 (3): 324-29. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.034.

Germanakis, Antonis, Dimosthenis Chochlakis, Emmanouil Angelakis, Yannis Tselentis, et Anna Psaroulaki. 2013. « Rickettsia Aeschlimannii Infection in a Man, Greece ». *Emerging Infectious Diseases* 19 (7): 1176-77. https://doi.org/10.3201/eid1907.130232.

Gondard, Mathilde, Lorraine Michelet, Athinna Nisavanh, Elodie Devillers, Sabine Delannoy, Patrick Fach, Anna Aspan, et al. 2018. « Prevalence of tick-borne viruses in Ixodes ricinus assessed by high-throughput real-time PCR ». *Pathogens and Disease* 76 (8): fty083. https://doi.org/10.1093/femspd/fty083.

Gray, J. S. 1991. « The Development and Seasonal Activity of the Tick Ixodes Ricinus: A Vector of Lyme Borreliosis. » *Review of Medical and Veterinary Entomology* 79 (6): 323-33.

Grech-Angelini, Sébastien, Frédéric Stachurski, Muriel Vayssier-Taussat, Elodie Devillers, François Casabianca, Renaud Lancelot, Gerrit Uilenberg, et Sara Moutailler. 2020. « Tick-Borne Pathogens in Ticks (Acari: Ixodidae) Collected from Various Domestic and Wild Hosts in Corsica (France), a Mediterranean Island Environment ». *Transboundary and Emerging Diseases*. https://doi.org/10.1111/tbed.13393.

Hailemariam, Zerihun, Jürgen Krücken, Maximilian Baumann, Jabbar S. Ahmed, Peter-Henning Clausen, et Ard M. Nijhof. 2017. « Molecular Detection of Tick-Borne Pathogens in Cattle from Southwestern Ethiopia ». *PLOS ONE* 12 (11): e0188248. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188248.

Hoffman, Tove, Mats Lindeborg, Christos Barboutis, Kiraz Erciyas-Yavuz, Magnus Evander, Thord Fransson, Jordi Figuerola, et al. 2018. « Alkhurma Hemorrhagic Fever Virus RNA in Hyalomma rufipes Ticks Infesting Migratory Birds, Europe and Asia Minor ». *Emerging Infectious Diseases* 24 (5): 879-82. https://doi.org/10.3201/eid2405.171369.

Horton, Katherine C., Nermeen T. Fahmy, Noha Watany, Alia Zayed, Abro Mohamed, Ammar Abdo Ahmed, Pierre E. Rollin, et Erica L. Dueger. 2016. « Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus and Alkhurma

(Alkhumra) Virus in Ticks in Djibouti ». *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 16 (10): 680-82. https://doi.org/10.1089/vbz.2016.1951.

Hussain, Sabir, Nighat Perveen, Abrar Hussain, Baolin Song, Muhammad Umair Aziz, Jehan Zeb, Jun Li, David George, Alejandro Cabezas-Cruz, et Olivier Sparagano. 2022. « The Symbiotic Continuum Within Ticks: Opportunities for Disease Control ». *Frontiers in Microbiology* 13. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.854803.

Iweriebor, Benson C., Elia J. Mmbaga, Abiodun Adegborioye, Aboi Igwaran, Larry C. Obi, et Anthony I. Okoh. 2017. « Genetic profiling for Anaplasma and Ehrlichia species in ticks collected in the Eastern Cape Province of South Africa ». *BMC Microbiology* 17 (1): 45. https://doi.org/10.1186/s12866-017-0955-0.

Jongejan, F., et G. Uilenberg. 2004. « The Global Importance of Ticks ». *Parasitology* 129 Suppl: S3-14. https://doi.org/10.1017/s0031182004005967.

Keysary, Avi, Robert F. Massung, Moshe Inbar, Arian D. Wallach, Uri Shanas, Kosta Y. Mumcuoglu, et Trevor Waner. 2007. « Molecular Evidence for Anaplasma phagocytophilum in Israel ». *Emerging Infectious Diseases* 13 (9): 1411-12. https://doi.org/10.3201/eid1309.070455.

Kilicoglu, Yunus, Abdurrahman Anil Cagirgan, Gulnur Serdar, Selma Kaya, Yuksel Durmaz, et Yunus Gur. 2020. « Molecular Investigation, Isolation and Phylogenetic Analsysis of Coxiella Burnetii from Aborted Fetus and Ticks ». *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 73 (décembre): 101571. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101571.

Knowles, Donald P., Lowell S. Kappmeyer, Darrell Haney, David R. Herndon, Lindsay M. Fry, James B. Munro, Kelly Sears, et al. 2018. « Discovery of a Novel Species, Theileria Haneyi n. Sp., Infective to Equids, Highlights Exceptional Genomic Diversity within the Genus Theileria: Implications for Apicomplexan Parasite Surveillance ». *International Journal for Parasitology* 48 (9): 679-90. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.03.010.

Kolodziejek, Jolanta, Mihai Marinov, Botond J. Kiss, Vasile Alexe, et Norbert Nowotny. 2014. « The Complete Sequence of a West Nile Virus Lineage 2 Strain Detected in a Hyalomma Marginatum Marginatum Tick Collected from a Song Thrush (Turdus Philomelos) in Eastern Romania in 2013 Revealed Closest Genetic Relationship to Strain Volgograd 2007 ». *PLOS ONE* 9 (10): e109905. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109905.

Kumar, Deepak, Surendra Raj Sharma, Abdulsalam Adegoke, Ashley Kennedy, Holly C. Tuten, Andrew Y. Li, et Shahid Karim. 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 ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12: 787209. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.787209.

Lobanov, V. A., A. A. Gajadhar, B. Al-Adhami, et H. M. Schwantje. 2012. « Molecular Study of Free-Ranging Mule Deer and White-Tailed Deer from British Columbia, Canada, for Evidence of Anaplasma Spp. and Ehrlichia Spp. » *Transboundary and Emerging Diseases* 59 (3): 233-43. https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01259.x.

Matsumoto, K., G. Joncour, B. Davoust, Pierre-Hugues Pitel, A. Chauzy, E. Collin, H. Morvan, N. Vassallo, et P. Brouqui. 2006. « Anaplasma Phagocytophilum Infection in Cattle in France ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1078 (1): 491. https://doi.org/10.1196/annals.1374.092.

Matsumoto, K., P. Parola, P. Brouqui, et D. Raoult. 2004. « Rickettsia Aeschlimannii in Hyalomma Ticks from Corsica ». *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 23 (9): 732-34. https://doi.org/10.1007/s10096-004-1190-9.

M'ghirbi, Youmna, Hèla Yaïch, Abderazek Ghorbel, et Ali Bouattour. 2012. « Anaplasma phagocytophilum in horses and ticks in Tunisia ». *Parasites & Vectors* 5 (août): 180. https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-180.

Michelet, Lorraine, Sabine Delannoy, Elodie Devillers, Gérald Umhang, Anna Aspan, Mikael Juremalm, Jan Chirico, et al. 2014. « High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2014.00103.

Moraga-Fernández, Alberto, Francisco Ruiz-Fons, Miguel A. Habela, Lara Royo-Hernández, Rafael Calero-Bernal, Christian Gortazar, José de la Fuente, et Isabel G. Fernández de Mera. 2021. « Detection of New Crimean–Congo Haemorrhagic Fever Virus Genotypes in Ticks Feeding on Deer and Wild Boar, Spain ». *Transboundary and Emerging Diseases* 68 (3): 993-1000. https://doi.org/10.1111/tbed.13756.

Muraro, Lívia S., Aneliza de O. Souza, Tamyres N. S. Leite, Stefhano L. Cândido, Andréia L. T. Melo, Hugo S. Toma, Mariana B. Carvalho, et al. 2021. « First Evidence of Ehrlichia Minasensis Infection in Horses from Brazil ». *Pathogens* 10 (3): 265. https://doi.org/10.3390/pathogens10030265.

Nadal, Clémence. 2019. « Eco-épidémiologie de la piroplasmose équine et des vecteurs impliqués en France ». These en préparation, Paris 12. https://www.theses.fr/s233615.

Nadal, Clémence, Sarah I. Bonnet, et Maud Marsot. 2022. « Eco-Epidemiology of Equine Piroplasmosis and Its Associated Tick Vectors in Europe: A Systematic Literature Review and a Meta-Analysis of Prevalence ». *Transboundary and Emerging Diseases* 69 (5): 2474-98. https://doi.org/10.1111/tbed.14261.

Orkun, Ömer. 2019. « Molecular Investigation of the Natural Transovarial Transmission of Tick-Borne Pathogens in Turkey ». *Veterinary Parasitology* 273 (septembre): 97-104. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.08.013.

Orkun, Ömer. 2022. « Comprehensive Screening of Tick-Borne Microorganisms Indicates That a Great Variety of Pathogens Are Circulating between Hard Ticks (Ixodoidea: Ixodidae) and Domestic Ruminants in Natural Foci of Anatolia ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 13 (6): 102027. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102027.

Orkun, Ömer, Ayşe Çakmak, Serpil Nalbantoğlu, et Zafer Karaer. 2020. « Turkey Tick News: A Molecular Investigation into the Presence of Tick-Borne Pathogens in Host-Seeking Ticks in Anatolia; Initial Evidence of Putative Vectors and Pathogens, and Footsteps of a Secretly Rising Vector Tick, Haemaphysalis Parva ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 11 (3): 101373. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101373.

Ozubek, Sezayi, Reginaldo G. Bastos, Heba F. Alzan, Abdullah Inci, Munir Aktas, et Carlos E. Suarez. 2020. « Bovine Babesiosis in Turkey: Impact, Current Gaps, and Opportunities for Intervention ». *Pathogens* 9 (12): 1041. https://doi.org/10.3390/pathogens9121041.

Palomar, Ana M., Aránzazu Portillo, David Mazuelas, Lidia Roncero, Juan Arizaga, Ariñe Crespo, Óscar Gutiérrez, et al. 2016. « Molecular Analysis of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus and Rickettsia in Hyalomma Marginatum Ticks Removed from Patients (Spain) and Birds (Spain and Morocco), 2009–2015 ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 7 (5): 983-87. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.05.004.

Parola, Philippe, Christopher D. Paddock, Cristina Socolovschi, Marcelo B. Labruna, Oleg Mediannikov, Tahar Kernif, Mohammad Yazid Abdad, et al. 2014. « Update on Tick-Borne Rickettsioses around the World: a Geographic Approach ». *Clinical Microbiology Reviews* 27 (1): 166. https://doi.org/10.1128/CMR.00104-13.

PÉREZ-EID, Claudine. 2007. *Les tiques : identification, biologie, importance médicale et vétérinaire*. Lavoisier.

Perveen, Nighat, et Gulfaraz Khan. 2022. « Crimean–Congo hemorrhagic fever in the Arab world: A systematic review ». *Frontiers in Veterinary Science* 9 (septembre): 938601. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.938601.

Rehman, Abdul, Franz J. Conraths, Carola Sauter-Louis, Jürgen Krücken, et Ard M. Nijhof. 2019. « Epidemiology of Tick-Borne Pathogens in the Semi-Arid and the Arid Agro-Ecological Zones of Punjab Province, Pakistan ». *Transboundary and Emerging Diseases* 66 (1): 526-36. https://doi.org/10.1111/tbed.13059.

Rikihisa, Yasuko. 2011. « Mechanisms of Obligatory Intracellular Infection with Anaplasma phagocytophilum ». *Clinical Microbiology Reviews* 24 (3): 469-89. https://doi.org/10.1128/CMR.00064-10.

Ristic, Miodrag. 1981. « Anaplasmosis ». In *Diseases of Cattle in the Tropics: Economic and Zoonotic Relevance*, édité par Miodrag Ristic et Ian McIntyre, 327-44. Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-015-6895-1_27.

Rocafort-Ferrer, Gloria, Agnès Leblond, Aurélien Joulié, Magalie René-Martellet, Alain Sandoz, Valérie Poux, Sophie Pradier, Séverine Barry, Laurence Vial, et Loïc Legrand. 2022. « Molecular Assessment of Theileria Equi and Babesia Caballi Prevalence in Horses and Ticks on Horses in Southeastern France ». *Parasitology Research* 121 (3): 999-1008. https://doi.org/10.1007/s00436-022-07441-7.

Ros-García, A., Y. M'ghirbi, A. Bouattour, et A. Hurtado. 2011. « First Detection of Babesia Occultans in Hyalomma Ticks from Tunisia ». *Parasitology* 138 (5): 578-82. https://doi.org/10.1017/S0031182011000060.

Rothschild, Chantal M. 2013. « Equine Piroplasmosis ». *Journal of Equine Veterinary Science* 33 (7): 497-508. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.03.189.

Ruscio, M., et M. Cinco. 2003. « Human granulocytic ehrlichiosis in Italy: first report on two confirmed cases. » *Annals of the New York Academy of Sciences*. https://www.semanticscholar.org/paper/Human-granulocytic-ehrlichiosis-in-Italy%3A-first-on-Ruscio-Cinco/b5b6d8ff69ae6c5dff525b35b7a3f4f7048af442.

Satta, Giuseppe, Valentina Chisu, Pierangela Cabras, Francesco Fois, et Giovanna Masala. 2011. « Pathogens and symbionts in ticks: a survey on tick species distribution and presence of tick-transmitted micro-organisms in Sardinia, Italy ». *Journal of Medical Microbiology* 60 (1): 63-68. https://doi.org/10.1099/jmm.0.021543-0.

Scoles, Glen A., et Massaro W. Ueti. 2015. « Vector Ecology of Equine Piroplasmosis ». *Annual Review of Entomology* 60 (janvier): 561-80. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-021110.

Sears, Kelly P., Lowell S. Kappmeyer, Lauren N. Wise, Marta Silva, Massaro W. Ueti, Stephen White, Kathryn E. Reif, et Donald P. Knowles. 2019. « Infection Dynamics of Theileria Equi and Theileria Haneyi, a Newly Discovered Apicomplexan of the Horse ». *Veterinary Parasitology* 271 (juillet): 68-75. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.06.009.

Selmi, Rachid, Mourad Ben Said, Aymen Mamlouk, Houcine Ben Yahia, et Lilia Messadi. 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 (novembre): 103655. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103655.

Serrato-Salas, Javier, et Mathilde Gendrin. 2023. « Involvement of Microbiota in Insect Physiology: Focus on B Vitamins ». Édité par Brian Weiss et Jacob Yount. *mBio* 14 (1): e02225-22. https://doi.org/10.1128/mbio.02225-22.

Thomson, Kirsty, Tal Yaaran, Alex Belshaw, Lucia Curson, Laurence Tisi, Sarah Maurice, et Guy Kiddle. 2018. « A New TaqMan Method for the Reliable Diagnosis of Ehrlichia Spp. in Canine Whole Blood ». *Parasites & Vectors* 11 (1): 350. https://doi.org/10.1186/s13071-018-2914-5.

Tirosh-Levy, Sharon, Yuval Gottlieb, Monica L. Mazuz, Igor Savitsky, et Amir Steinman. 2020. « Infection Dynamics of Theileria Equi in Carrier Horses Is Associated with Management and Tick Exposure ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 11 (6): 101508. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101508.

Tosoni, A., A. Mirijello, A. Ciervo, F. Mancini, G. Rezza, F. Damiano, R. Cauda, A. Gasbarrini, G. Addolorato, et Internal Medicine Sepsis Study Group. 2016. « Human Rickettsia Aeschlimannii Infection: First Case with Acute Hepatitis and Review of the Literature ». *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 20 (12): 2630-33.

Vaughan, Jefferson A., Robert A. Newman, et Michael J. Turell. 2022. « Bird Species Define the Relationship between West Nile Viremia and Infectiousness to Culex Pipiens Mosquitoes ». *PLOS Neglected Tropical Diseases* 16 (10): e0010835. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010835.

Vial, Laurence, Frédéric Stachurski, Agnès Leblond, Karine Huber, Gwenaël Vourc'h, Magalie René-Martellet, Isabelle Desjardins, et al. 2016. « Strong Evidence for the Presence of the Tick Hyalomma Marginatum Koch, 1844 in Southern Continental France ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 7 (6): 1162-67. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.08.002.

Wise, L.n., L.s. Kappmeyer, R.h. Mealey, et D.p. Knowles. 2013. « Review of Equine Piroplasmosis ». *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27 (6): 1334-46. https://doi.org/10.1111/jvim.12168.

Woldehiwet, Zerai. 2006. « Anaplasma Phagocytophilum in Ruminants in Europe ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1078 (1): 446-60. https://doi.org/10.1196/annals.1374.084.

Zhong, Jianmin, Algimantas Jasinskas, et Alan G. Barbour. 2007. « Antibiotic Treatment of the Tick Vector Amblyomma Americanum Reduced Reproductive Fitness ». *PloS One* 2 (5): e405. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000405.

II. Partie 2 : Détection, par métaprotéomique, des micro-organismes (agents infectieux et commensaux/symbiontes) présents dans les organes des tiques *H. marginatum* du Sud de la France.

Matériel et Méthodes

Matériel biologique et site d'étude

En ce qui concerne le matériel biologique afin de décrire le microbiote, les tiques *H. marginatum* sont issues de deux écotopes. D'une part la moitié des tiques provient de l'insectarium du CIRAD ; elles proviennent de Pompignan dans le Gard et y sont élevées depuis au moins 3 générations, et sont exemptes de VFHCC (les femelles ayant pondu les œufs qui ont permis de générer les colonies ont été testés par PCR pour s'assurer de l'absence des principaux agents transmis par cette tique). L'autre moitié provient du terrain ; elles ont été prélevées sur des chevaux (hôte privilégié des stades adultes de *H. marginatum* en Méditerranée) dans des structures équestres proches de Pompignan. Ces tiques sont prélevées au niveau des paturons des chevaux avant de commencer leur gorgement (pour éviter de diluer le signal peptidique microbien avec celui du repas de sang et car la dissection de tiques gorgées est impossible).

Après dissection des tiques, les organes sont lavés 3 fois dans du PBS stérile et regroupés par pools de 5 individus de même sexe et provenant de la même origine géographique. Cette procédure a pour but d'obtenir une quantité suffisante de matériel biologique (surtout pour les micro-organismes) afin d'avoir un bon signal lors de l'analyse par spectrométrie de masse. Deux organes ont été analysés pour chaque tique : les glandes salivaires (GS) et le tube digestif (TD). Ces organes sont sélectionnés car ils représentent les voies d'entrée et de sortie des agents infectieux dans les tiques et qu'ils contiennent d'autres micro-organismes pouvant faciliter, par la suite, la transmission de ces agents. L'isolement de ces organes permet d'identifier les différents micro-organismes contenus dans chaque organe et ainsi avoir une première distribution spatiale de ces micro-organismes dans les tiques. Les organes sont broyés mécaniquement dans 1 ml de PBS stérile additionné d'antiprotéases (cocktail d'inhibiteurs de protéases cOmpleteTM, Roche, France) avec des billes de silice de 1 mm (Ozyme, France) dans un

broyeur orbital (Precellys® 24 Dual, Bertin, France) à 5000 rpm pendant 15s et l'homogénat est stocké pour les futures analyses.

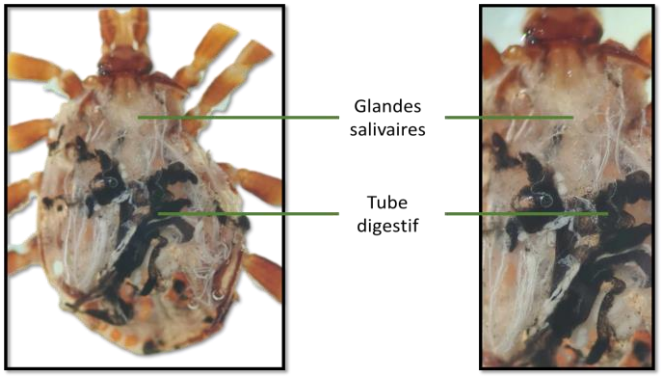


Figure 28 : Dissection d'une tique mâle *H. marginatum* sous loupe binoculaire.

Extraction de protéines

Les protéines ont été extraites d'un homogénat par précipitation au TCA (acide trichloroacétique), suivie d'une centrifugation (10 000g pendant 2h), et reprise du culot dans un tampon de réhydratation qui conserve leur configuration native (8M d'urée, 2M de thiourée, 4% CHAPS, 1% Triton-X-100, cocktail d'inhibiteurs de protéases cOmpleteTM). Au total, 104 échantillons ont été analysés, comprenant 2 écotopes (insectarium versus terrain), 2 sexes (mâle versus femelle), 2 types d'organes (tube digestif versus glandes salivaires), 3 réplicas pour chaque combinaison et 4 fractions analytiques,

cce qui équivaut en tout à 96 échantillons analysés, auxquels il faut ajouter les 2 contrôles de l'environnement de dissection (des morceaux de steak disséqués comme les tiques) (Figure 29).

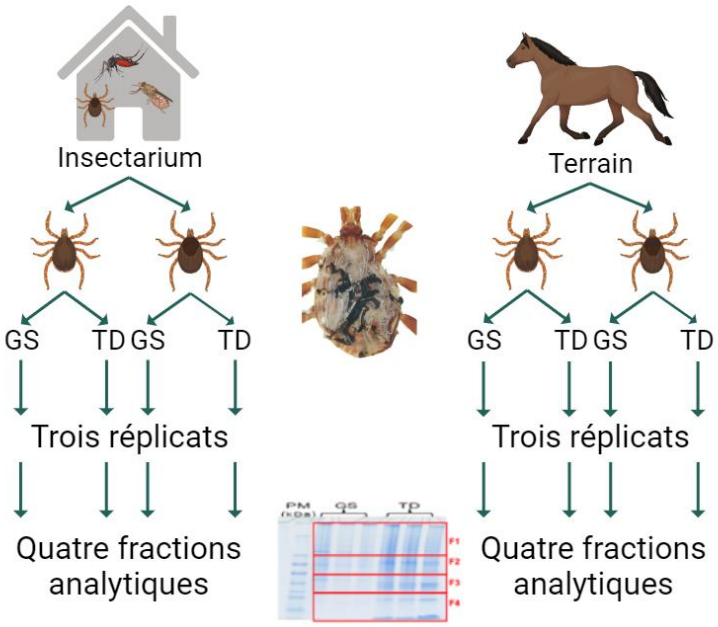


Figure 29 : Plan d'échantillonnage des protéines des organes (glandes salivaires GS et tube digestif TD) de *Hyalomma marginatum*.

Les échantillons protéiques ont été envoyés pour analyse à la plateforme de protéomique Li2D du CEA à Marcoule. Ils ont subi une étape de migration électrophorétique SDS-PAGE, suivie d'une extraction des bandes de protéines majoritaires et minoritaires présentes sur le gel (4 fractions, Figure 29). Ce fractionnement de l'échantillon a été réalisé pour optimiser la détection des micro-organismes qui sont faiblement représentés. Ensuite, une protéolyse a été effectuée en utilisant de la trypsine Gold (Mass Spectrometry Grade, Promega) pour générer les peptides qui ont ensuite été analysés par spectrométrie de masse (Orbitrap Exploris 480, Thermo Scientific).

Identification des peptides par spectrométrie de masse

Les peptides issus de la digestion trypsique sont injectés dans le spectromètre de masse (Orbitrap Exploris 480, Thermo Scientific), où ils suivent une première séparation par nano-chromatographie (UltiMate 3000, Dionex-LC Packings), avant d'être électropulvérisés pour une mesure de leurs masses moléculaires et la détermination de leur composition chimique. Cette méthode se déroule généralement en trois étapes :

- Ionisation et fragmentation : les peptides sont convertis en ions dans une phase gazeuse, puis, après une première analyse en masse (MS1), ils subissent une fragmentation par mécanique par collision en différents sous-fragments peptidiques ionisés (MS2).
- Séparation des fragments : les fragments ionisés sont ensuite séparés en utilisant un champ électromagnétique sous vide, ce qui permet de les différencier selon leur masse et leur niveau de charge ionique.
- Analyse des fragments : la masse moléculaire de chaque fragment chargé est analysée en utilisant le rapport masse/nombre de charge (m/z). Cette analyse permet d'obtenir des pics d'intensité, également appelés spectres de masse, qui correspondent aux séquences en acides aminés des peptides analysés, et qui sont ensuite utilisés pour identifier les protéines correspondantes et les taxons auxquels elles appartiennent dans les bases de données (Figure 30).

Les peptides ont été analysés le long d'un gradient de 90 minutes d'acétonitrile avec des cycles de balayage initiés par un balayage complet des ions peptidiques dans l'analyseur Orbitrap, suivi d'une dissociation collisionnelle à haute énergie et de balayages MS/MS des 20 ions précurseurs les plus abondants avec seulement des charges 2+ ou 3+. Des spectres de masse à balayage complet ont été acquis de 350 m/z à 1 800 à une résolution de 60 000. La sélection des ions pour la fragmentation et la mesure MS/MS a été effectuée en appliquant une exclusion dynamique pendant 10 s. Les spectres MS/MS ont été attribués aux séquences peptidiques par le moteur de recherche MASCOT Daemon 2.6.0 (Matrix Science), avec les paramètres suivants : trypsine en tant qu'enzyme, un clivage manqué au maximum, tolérance de masse de 5ppm sur l'ion précurseur et 0,02Da sur le spectre MS/MS, modification fixe de la cystéine carboxyamidométhylée (+57,0215), et méthionine oxydée (+15,9949) comme modification variable. Les fichiers DAT MASCOT ont été analysés à l'aide de la fonction “ms_peptidesummary” de Matrix Science msparser version 2.5.2. Les correspondances peptide-spectre (Peptide to Spectrum Match, PSM) avec des valeurs attendues inférieures à 0,05 ont été validées à l'aide du seuil d'homologie MASCOT. Plusieurs PSM par spectres MS/MS étaient autorisés en cas de scores ioniques supérieurs à 98% du score ionique supérieur. Les séquences peptidiques de chaque PSM ont été alignées (mappées) sur des accessions de protéines NCBI, qui ont été associées aux taxons correspondant (Taxid to Spectrum Match, TSM) dans les assemblages RefSeq (GCF) et aux assemblages GenBank (GCA). Une compilation d'informations a été effectuée en suivant l'arbre taxonomique du NCBI depuis l'assignation directe aux niveaux taxonomiques : espèce, genre, famille, ordre, classe, embranchement et règne. Pour chaque taxon à chaque niveau, une identification des

séquences peptidiques et des TSM correspondantes a été effectuée, ainsi qu'un décompte des séquences peptidiques spécifiques ou uniques, et des TSM spécifiques correspondants (Gouveia et al. 2020). Pour étudier le microbiote des organes de *H. marginatum*, nous avons analysé les fragments peptidiques en mode d'acquisition des spectres dépendant de données (DDA : Data-Dependent Acquisition, (Broeckling et al. 2018)), choisissant quel ion doit être fragmenté en fonction de l'intensité observée en MS1 car il s'agit du mode le plus adapté à une recherche approfondie d'identité dans les bases de données. Cette option a permis de lever un obstacle initial majeur qui était le déséquilibre entre la forte proportion de protéines provenant des tiques et la faible proportion de protéines des micro-organismes présents dans les échantillons. Les données sont présentées sous forme de tableaux, fournissant les Taxon-to-Spectrum Matches (TSM) obtenus pour chaque pool d'organes, chaque genre de tiques et chaque origine (insectarium versus terrain). Ces tableaux incluent également le décompte des peptides spécifiques pour chaque micro-organisme présent dans chaque pool d'organes de tiques (speTSM).

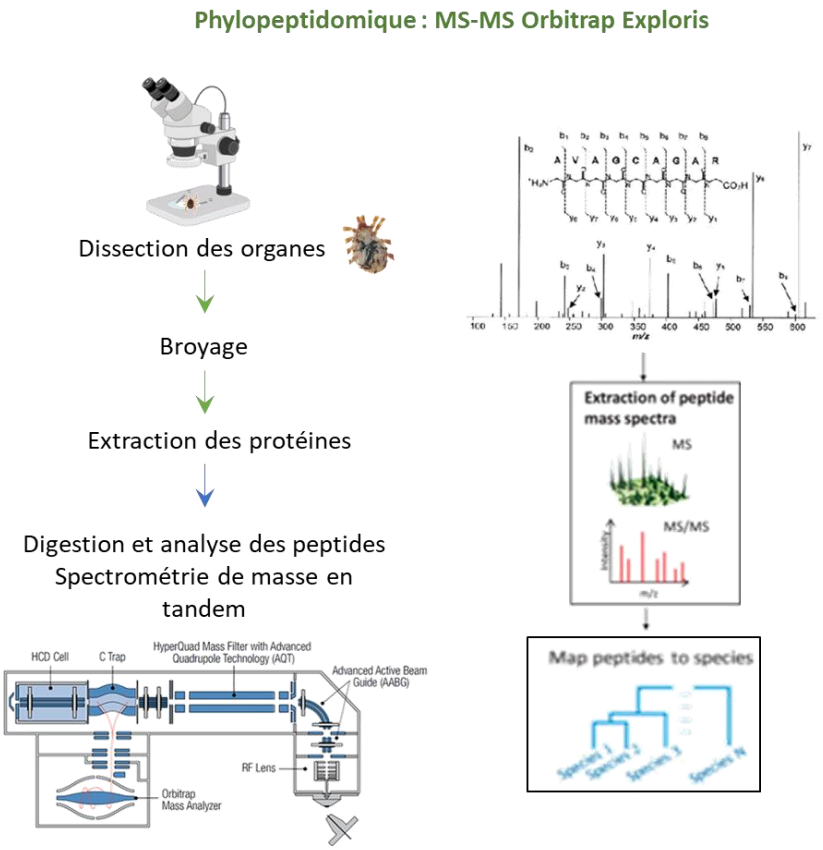


Figure 30 : Workflow analytique de métaprotéomique par phylopeptidomique. Les spectres de masse des peptides issus de la digestion trypsique des protéines extraites des organes de *Hyalomma marginatum* sont alignés sur les protéomes des espèces taxonomiques des bases de données protéiques (UniProtKB et NCBI protein).

Résultats

Un ensemble de données comprenant 389 017 spectres MS/MS à haute résolution a été acquis et 84 831 de ces spectres ont pu être attribués à des informations taxonomiques : taxon peptide-based specific matches (pepTSM). Sur la base de ces informations taxonomiques, 4 phyla ont été principalement identifiés parmi les eucaryotes (97% de la biomasse) avec les familles Ixodidae (91%) correspondant à la tique, et Hominidae (2%), Leporidae (3%), Bovidae (0,3%) à une contamination durant la manipulation ou un hôte nourricier potentiel. Des bactéries (2 % de la biomasse) et des archées (0,1 %) ont également été identifiées, les phylums les plus représentés étant Actinobacteria (0,7 %, dont le genre Mycobacterium), Proteobacteria (0,6 %, dont les genres *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Francisella* et *Rickettsia*), Firmicutes (0,5%, y compris le genre *Bacillus*) et Bacteroidetes (0,2%, y compris le genre *Prevotella*). Les genres cités comprennent des espèces endosymbiotiques et pathogènes déjà décrites dans le microbiote des tiques par métagénomique (Bernard et al., in prep).

Une analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée pour étudier la distribution spatiale des microbiotes des tiques en fonction de leurs organes d'origine. Les deux premières composantes principales, expliquent respectivement 61,1 % et 16 % de la variance totale (Figure 31). Les résultats de l'ACP ont révélé une séparation nette en fonction des deux organes analysés, à savoir les glandes salivaires (SG) et les tubes digestifs (DT) des tiques (Figure 31). Le premier groupe rassemble les échantillons provenant des glandes salivaires de chaque pool de tiques, tandis que le deuxième groupe est composé des échantillons provenant des tubes digestifs. Cette distinction claire entre les deux groupes d'organes indique que les microbiotes des tiques varient considérablement en fonction de l'organe d'origine, plutôt qu'en fonction du sexe de la tique ou de l'écotope.

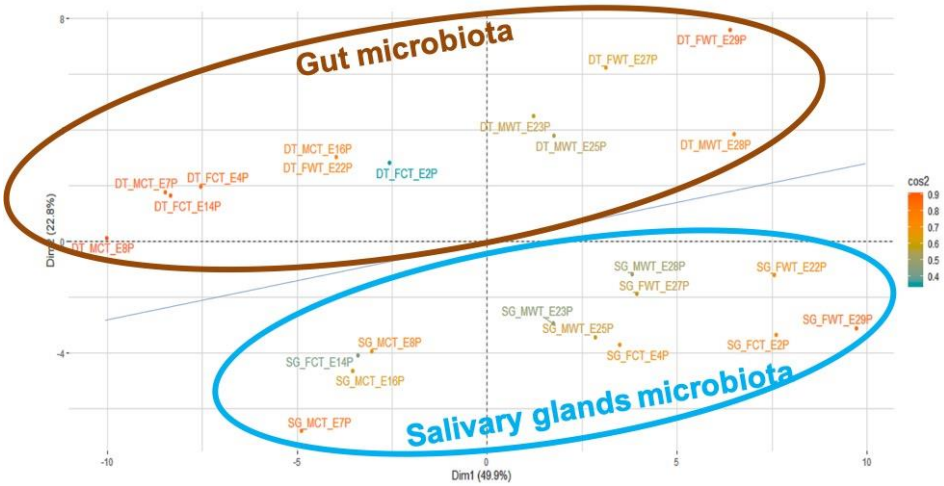


Figure 31 : ACP de la distribution des échantillons de *Hyalomma marginatum* sur les dimensions 1 et 2. Les microbiotes des 24 échantillons sont analysés comparativement en fonction des nombres de TSM

et speTSM pour chaque genre microbien. SG : glandes salivaires, DT : tube digestif, F : femelle, M : mâle, CT : insectarium, WT : terrain.

Dans une deuxième ACP, les regroupements selon l'organe sont toujours respectés, mais des profils distincts des microbiotes des organes des tiques émergent en fonction de leur provenance, que ce soit de l'insectarium ou du terrain (Figure 32).

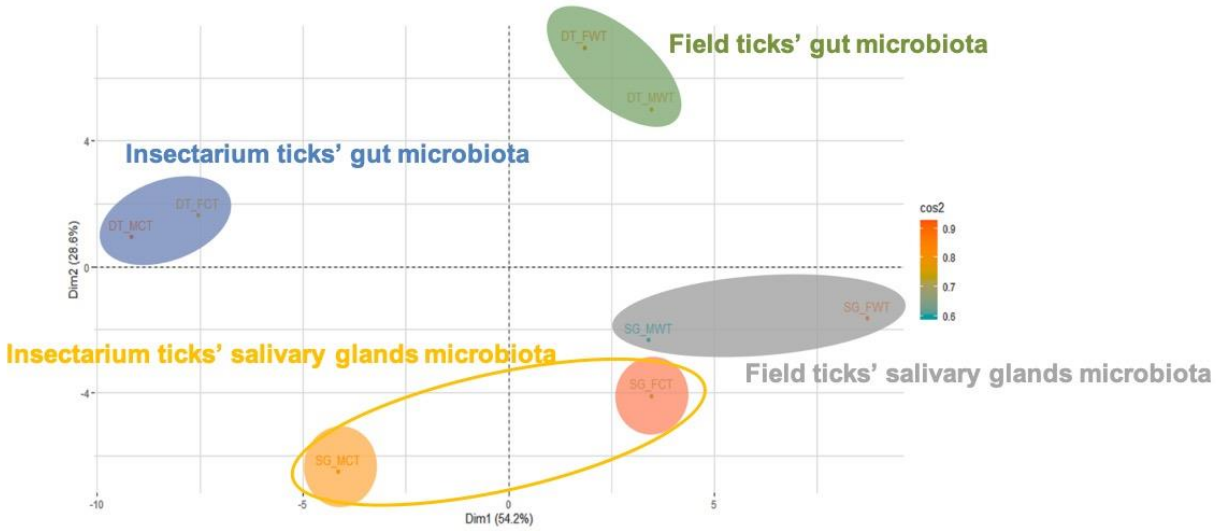


Figure 32 : ACP montrant la distribution des échantillons de *Hyalomma marginatum* sur les dimensions 1 et 2 selon l'organe et le lieu d'origine. Les échantillons ont été regroupés selon leurs origines (SG : glandes salivaires vs DT : et Control vs Wild Type). 63 genres ou espèces de micro-organismes ont été retenus dans l'analyse.

Afin de comparer qualitativement et quantitativement les microbiotes des organes de *Hyalomma marginatum*, nous avons effectué des calculs sur les sommes des Taxon-to-Spectrum Matches (TSM) spécifiques pour chaque micro-organisme, en tenant compte des différentes origines des échantillons (glandes salivaires vs tube digestif, insectarium vs terrain, mâle vs femelle). Le Volcano Plot (Figure 33 illustre la distribution des abondances relatives des micro-organismes dans les deux organes. Les micro-organismes qui dépassent les seuils que nous avons établis pour la p-value et le log2 du ratio (fold change) sont présentés sur le graphique (Figure 33). La valeur de p-value seuil pour assurer la robustesse de l'analyse a été fixée à 0,1. Les log2 des ratios des sommes des TSM de chaque groupe sont considérés à partir de 0,1.

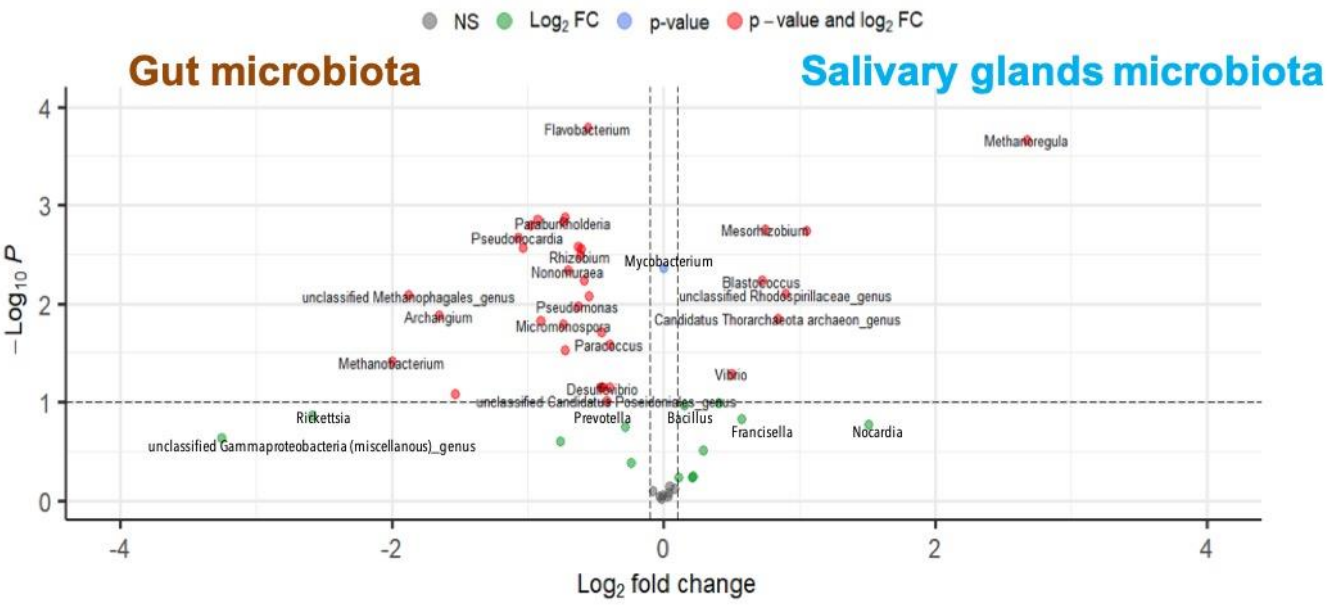


Figure 33 : Volcano plot des microorganismes significativement présents dans les glandes salivaires et le tube digestif des tiques *Hyalomma marginatum*.

Les micro-organismes sont globalement plus abondants dans le tube digestif que dans les glandes salivaires, avec 44 genres microbiens plus représentés dans le tube digestif, dont *Francisella* et *Rickettsia* qui sont également détectés avec la puce Fluidigm, et dont 2 sont exclusifs de cet organe : *Natronobacterium* et *Stigmatella*. Pour les glandes salivaires, 19 genres microbiens sont plus représentés. La table 1 indique la répartition des différents genres microbiens en fonction de leur abondance relative dans chaque organe (log2 des ratios des sommes des TSM).

Tableau 1 : Abondance relative des micro-organismes détectés dans le tube digestif (vert et marron) et les glandes salivaires (bleu) de *Hyalomma marginatum*

Microorganism GENUS	Most abundant SPECIES	log2 FoldChange_SG/Gut	P_value
Francisella	*Francisella tularensis*	-6,584962501	0,211253659
Rickettsia	*Rickettsia japonica*	-3,253215345	0,233115479
Halobellus	*Halobellus* sp. Atlit-31R	-2,584962501	0,137204764
Methanobacterium	*Methanobacterium veterum*	-2	0,038814092
unclassified Methanophagales_genus	*Methanophagales archaeon*	-1,874469118	0,008193999
unclassified *Gammaproteobacteria* (miscellaneous)_genus	*Gammaproteobacteria bacterium* TMED30	-1,679599375	3,43276E-06
Archangium	*Archangium gephyra*	-1,652076697	0,013282863
Microbacterium	*Microbacterium ginsengiterrae*	-1,597399604	8,98962E-07
unclassified *Myxococcales* (miscellaneous)_genus	*Myxococcales bacterium*	-1,5360529	0,08284601
Chitinophaga	*Chitinophaga* sp. YR573	-1,44107536	3,4657E-07
Variovorax	*Variovorax boronicumulans*	-1,421463768	1,18733E-05
Rhodococcus	*Rhodococcus* sp. AG1013	-1,371968777	1,63281E-05
Pseudonocardia	*Pseudonocardia thermophila*	-1,070389328	0,002127525
Roseomonas	*Roseomonas rhizosphaerae*	-1,03562391	0,002692029
unclassified *Thaumarchaeota* (miscellaneous)_genus	*Thaumarchaeota archaeon*	-0,977279923	0,001590788
Lysobacter	*Lysobacter* sp. UKS-15 *or Lysobacter* sp. URHA0019	-0,929610672	0,001391429
Methanobrevibacter	*Methanobrevibacter cuticularis*	-0,906890596	0,014981018
Natrinema	*Natrinema ejinorense*	-0,7589919	0,24959318
Paraburkholderia	*Paraburkholderia hospita*	-0,742612157	0,00148194
Micromonospora	*Micromonospora mirobrigensis*	-0,741081703	0,016385821
unclassified *Bacteroidetes* (miscellaneous)_genus	*Bacteroidetes bacterium* RIFCSPLOWO2_12_FULL_31_	-0,729038678	0,001327433
Mucilaginibacter	*Mucilaginibacter gotjawali*	-0,728326676	0,029672746
Nonomuraea	*Nonomuraea fuscirosea*	-0,705256734	0,004609065
Actinoplanes	*Actinoplanes xinjiangensis*	-0,632268215	0,002608654
Pseudomonas	*Pseudomonas viridiflava*	-0,632268215	0,010572612
Rhizobium	*Rhizobium oryzae*	-0,614108846	0,00329393
bacterium_genus	*unidentified bacterium*	-0,609853676	0,002764455
Mycoplasma	*Mycoplasma conjunctivae*	-0,584962501	0,005876072
Flavobacterium	*Flavobacterium* sp. 102	-0,56139403	0,000163125
Amycolatopsis	*Amycolatopsis taiwanensis*	-0,550814278	0,00840304
Thermococcus	*Thermococcus siculi*	-0,465663572	0,070803955
Marinobacter	*Marinobacter salarius*	-0,454565863	0,01954807
Desulfovibrio	*Desulfovibrio magneticus*	-0,448521345	0,071381316
unclassified *Candidatus Poseidoniales* _genus	*Candidatus Poseidoniales archaeon*	-0,420843121	0,096301322
Paracoccus	*Paracoccus litorisediminis*	-0,401740677	0,025666849
unclassified *Lachnospiraceae* _genus	*Lachnospiraceae bacterium* AC2028	-0,397963986	0,070214123
Actinomadura	*Actinomadura formosensis*	-0,285043027	0,17928486
unclassified *Desulfobacteraceae* _genus	*Desulfobacteraceae bacterium*	-0,237039197	0,412476232
Massilia	*Massilia lurida*	-0,078855421	0,80190913
Halomonas	*Halomonas* sp. KCTC 52281	-0,027656343	0,904925412
Bradyrhizobium	*Bradyrhizobium erythrophlei*	-0,012600037	0,964039615
Streptomyces	*Streptomyces scabrisporus*	-0,009978334	0,890044196
Natronobacterium	***Natronobacterium gregoryi***	**0**	**0,004345941**
Stigmatella	***Stigmatella aurantiaca***	**0**	**6,03747E-08**
unclassified *Planctomycetaceae* _genus	*Planctomycetaceae bacterium*	0,026655632	0,918261591
Pedobacter	*Pedobacter alluvionis*	0,032276403	0,83050319
Paenibacillus	*Paenibacillus* sp. JC52	0,041288208	0,707143218
Hymenobacter	*Hymenobacter terrenus*	0,075101455	0,751185586
Mycobacterium	*Mycobacterium malmoense*	0,109347396	0,585027437
Mycolicibacterium	*Mycolicibacterium chubuense*	0,151277939	0,10662215
unclassified *Archaea* (miscellaneous)_genus	*unidentified archaea*	0,206450877	0,575329228
Azospirillum	*Azospirillum thiophilum*	0,212993723	0,563946937
Halogeometricum	*Halogeometricum pallidum*	0,289506617	0,306386836
unclassified *Rhodobacteraceae* _genus	*Rhodobacteraceae bacterium* Alg231-30	0,402098444	0,101483146
Vibrio	*Vibrio mediterranei*	0,500898236	0,051137747
Methylobacterium	*Methylobacterium* sp. SCN 67-24	0,568660688	0,147694786
Blastococcus	*Blastococcus aggregatus*	0,724365557	0,005837908
Mesorhizobium	*Mesorhizobium* sp. ORS 3428	0,744958385	0,00176616
*Candidatus Thorarchaeota archaeon_* genus	*Candidatus Thorarchaeota archaeon*	0,841302254	0,014036888
unclassified *Rhodospirillaceae* _genus	*Rhodospirillaceae bacterium* R5959	0,899695094	0,008022649
unclassified *Calditrichaeota* _genus	*Calditrichaeota bacterium*	1,0489096	0,001819882
Spirosoma	*Spirosoma pollinicola*	1,502500341	0,168003249
Methanoregula	*Methanoregula* sp. PtaU1.Bin051	2,668378509	0,000213776

Discussion

L'analyse métaprotéomique par phylopeptidomique repose sur l'identification des peptides présents dans les échantillons analysés et leur attribution à une unité taxonomique. Contrairement à l'ADN, dont la détection peut persister longtemps après la disparition de l'organisme auquel il correspond, la dégradation rapide des protéines indique que les micro-organismes détectés sont toujours intègres dans les organes de tiques dont ils sont originaires. La métaprotéomique permet de fournir des informations complémentaires à la métagénomique sur la composition du microbiote et offre de nouvelles perspectives pour l'étude des interactions entre les tiques et les micro-organismes qu'elles portent. Les résultats obtenus montrent que la composition des micro-organismes varie en fonction des organes, concernant les glandes salivaires et le tube digestif. Les taxons identifiés nécessitent une étude fonctionnelle approfondie pour déterminer leur rôle dans la biologie de la tique. Par exemple, en ce qui concerne *Francisella*, son ratio élevé dans le tube digestif par rapport à sa quasi-absence dans les glandes salivaires semble indiquer qu'il s'agit d'un endosymbionte de la tique (*Francisella*-like endosymbiont, Buysse *et al.* 2021). De même, pour *Rickettsia*, qui présente un profil similaire à celui de *Francisella*, avec une présence beaucoup plus marquée dans le tube digestif que dans les glandes salivaires. On remarque également une particularité : Rickettsia est exclusivement présente chez les tiques de terrain, tandis qu'elle est non détectée chez les tiques d'élevage en insectarium. Cette séparation supplémentaire des groupes en fonction de leur origine suggère que les microbiotes des tiques peuvent être influencés par leur environnement d'origine, probablement par les hôtes sur lesquels elles se gorgent pour réaliser leur cycle de développement. Il est possible que l'infection par Rickettsia soit à un stade précoce et que la migration vers les glandes salivaires n'ait pas encore eu lieu, ou alors qu'il s'agisse d'une forme endosymbiotique de Rickettsia. Cette distribution spatiale des micro-organismes dans la tique peut refléter des processus fonctionnels physiologiques spécifiques, propres à chaque microbiote d'organe de la tique. Par exemple, certains micro-organismes peuvent avoir des fonctions de défense spécifiques dans le tube digestif ou d'immunomodulation dans les glandes salivaires (Aguilar-Díaz et al. 2021). Pour compléter ces résultats, une étude supplémentaire sur des tiques gorgées pourrait mettre en évidence les différences de composition du microbiote en fonction de l'alimentation ou de l'absence de repas. Cela permettrait de mieux comprendre comment l'alimentation influence la composition du microbiote dans ces tiques et de mieux appréhender les interactions complexes entre les tiques, les micro-organismes et leur environnement.

La combinaison des organes des tiques en un pool a permis d'amplifier le signal microbien, améliorant ainsi la détection de chaque micro-organisme lors de l'analyse. Cette approche permet également de compenser les variations dans les quantités de micro-organismes présents dans les tiques. Cependant,

il convient de noter qu'une forte diversité dans une ou plusieurs tiques incluses dans le pool peut potentiellement introduire un certain déséquilibre dans l'abondance relative des microorganismes composant le microbiote. Cela peut être dû au fait qu'une tique particulière dans le pool peut donner un profil légèrement différent par rapport aux autres pools analysés. Dans cette optique, il serait intéressant de suivre l'évolution des microbiotes au niveau individuel, comme pour la puce Fluidigm.

Certains taxons ne sont pas encore clairement différenciés au niveau de l'espèce, comme c'est le cas de Rickettsia, où l'identification du taxon nous donne l'espèce *Rickettsia japonica* comme espèces majoritairement détectée plutôt que *Rickettsia aeschlimannii* (confirmée par la puce Fluidigm). Cette situation est assez comparable à la détection de *Francisella tularensis* alors que l'on sait maintenant qu'il s'agit d'un FLE et non de *F. tularensis* en tant qu'agent pathogène (Buysse et al. 2021). Cette limitation dans la précision de l'identification des espèces microbiennes est probablement due au manque de complétude des bases de données auxquelles on se réfère et à des annotations incorrectes dans certaines de ces bases. Ce manque ponctuel de précision au niveau de l'espèce montre le besoin d'enrichir encore les bases de données, notamment par des approches de protéogénomique (Armengaud et al. 2014). Néanmoins, l'approche de protéotypage, dérivée de la métaprotéomique nous a permis de montrer la présence de bactéries symbiotiques, commensales, environnementales et possiblement pathogènes dans le microbiote de *H. marginatum*, avec des similitudes et des différences dans les communautés bactériennes décrites par les approches métagénomiques (notamment le Fluidigm car les échantillons dont on parle ici ont été testés avec les deux méthodes). L'idée étant d'utiliser la métaprotéomique pour comprendre le fonctionnement de ces microbiotes (Armengaud 2023). Cette étude métaprotéomique pionnière du microbiome de *H. marginatum* ouvre de nouvelles voies pour déchiffrer le rôle de ces communautés microbiennes et leur implication dans la biologie des tiques, avec un aperçu des interactions des tiques avec le microbiote, les agents pathogènes et les hôtes.

First insights into the organ microbiome of *Hyalomma marginatum* ticks assessed by next-generation metaproteomics

Philippe Holzmuller[1,*], Célia Bernard[1], Noureddine Dahmani[1], Julien Sabardeil[1], Bernard Fernandez[1], Guylaine Miotello[2], Olivier Pible[2], Frédéric Stachurski[1], Thomas Pollet[1], Jean Armengaud[2], Laurence Vial[1]

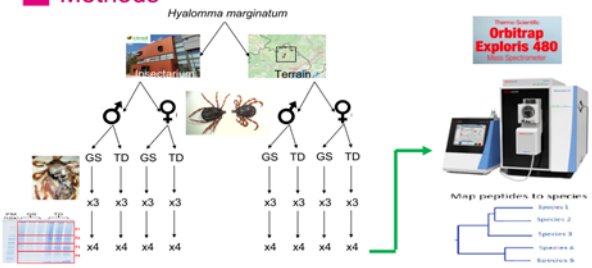
1. UMR ASTRE, CIRAD, INRAE, Université de Montpellier (I-MUSE), F-34398 Montpellier, France
2. Laboratoire innovations technologiques pour la Détection et le Diagnostic (Li2D), Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), Université Paris Saclay, CEA, INRAE, F-30207 Bagnols-sur-Cèze, France

Introduction

Ticks are the second main vectors of pathogens in the world, after mosquitoes. In Europe, they represent the main vectors of pathogens (parasites, bacteria and viruses) responsible for infectious diseases affecting humans and animals. *Hyalomma marginatum* (*Hm*) is a hard tick from the *Ixodidae* family, which installation in mainland France was confirmed in 2016 in the southern regions of the Mediterranean basin[1]. Independently of vector-borne pathogens, ticks carry diverse symbiotic and commensal microorganisms, which play a crucial role in many vital processes such as nutrition, reproduction, defence against environmental stresses, but that can also play a role in the installation and/or transmission of pathogens.

Currently, characterization of tick microbiomes is essentially based on metagenomics approaches, and first insights into the *Hm* microbiome have been recently revealed[2]. Here, we have investigated the *Hm* microbial composition via a metaproteomics-derived proteotyping approach, with a focus on the entry and exit organs involved in ticks nutrition.

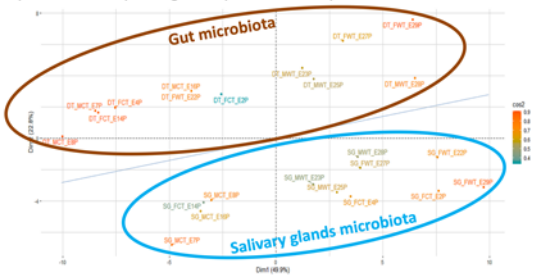
Methods

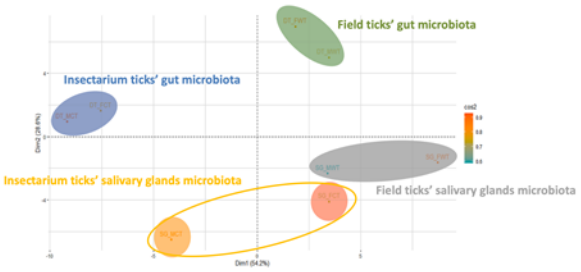


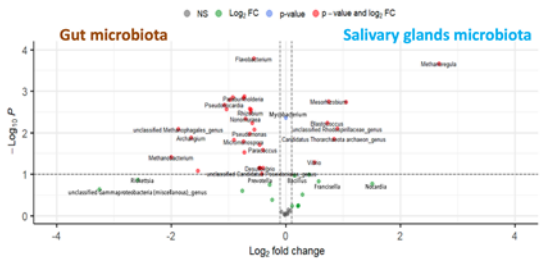
Hm ticks were either bred in our insectarium on rabbits or collected in the field on horses which are sentinel animals because privileged host of *Hm* in the Mediterranean region. The guts and salivary glands were removed by dissection of the washed and decontaminated ticks, then crushed in a lysis buffer for protein extraction. For the 8 biological conditions plus dissection controls, protein extracts of 3 replicates have been fractionated in SDS-PAGE into 4 fractions and trypsin-digested in gel. Peptides were analysed with a Thermo Scientific Orbitrap Exploris 480 tandem mass spectrometer. We recorded a large nanoLC-MS/MS dataset on protein extracts from the 2 types of organs sampled from 2 genders and 2 ecotopes.

Results

A dataset comprising about 389,017 high-resolution MS/MS spectra was acquired and 84,831 of these spectra could be assigned to taxonomical information: taxon peptide-based specific matches (pepTSM). Based on this taxonomical information, 4 phyla were mainly identified amongst eukaryota (97% of the biomass) with the families Ixodidae (91%) corresponding to the tick, and Hominidae (2%), Leporidae (3%), Bovidae (0.3%) corresponding to potential feeding host. Bacteria (2% of the biomass) and archaea (0.1%) were also identified with the most represented phyla being Actinobacteria (0.7%, including the genus *Mycobacterium*), Proteobacteria (0,6%, including the genera *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Francisella* and *Rickettsia*), Firmicutes (0,5%, including the genus Bacillus) and Bacteroidetes (0,2%, including the genus *Prevotella*). The genera cited include endosymbiotic and pathogenic species already described in the microbiota of ticks by metagenomics.







Microbial populations were found to be dependent on the type of organ (gut versus salivary glands) and the ecotype (insectarium versus field). Additionally, the endosymbiont *Francisella* was evidenced, being more prevalent in salivary glands than in the gut. *Rickettsia*, *Mycoplasma,* and *Pseudomonas* are the most common pathogenic bacterial genera found in *Hm* microbiota. Accordingly, *Hm* ticks could represent potential vectors for these zoonotic bacterial agents.

CONCLUSION **The metaproteomics-derived proteotyping approach allowed us to show the presence of symbiotic, commensal, environmental, and pathogenic bacteria in the *Hyalomma marginatum* microbiota, with differences in bacterial communities described by metagenomics approaches. The idea behind being to use metaproteomics to understand how these microbiota function[3]. This pioneering metaproteomics study of *Hm* microbiome opens up new avenues for deciphering the role of these microbial communities and their involvement in tick biology, with insights into tick interactions with microbiota, pathogens and hosts.**

References

[1] 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.Strong evidence for the presence of the tick *Hyalomma marginatum* Koch, 1844 in southern continental France. Ticks Tick Borne Dis. 2016 Oct;7(6):1162-1167. doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.08.002.
[2] Benyedem H, Lekired A, Mhadhbi M, Dhibi M, Romdhane R, Chaari S, Rekik M, Ouzari HI, Hajji T, Darghouth MA. First insights into the microbiome of Tunisian *Hyalomma* ticks gained through next-generation sequencing with a special focus on H. scupense. PLoS One. 2022 May 19;17(5):e0268172. doi: 10.1371/journal.pone.0268172.
[3] Armengaud J. Metaproteomics to understand how microbiota function: The crystal ball predicts a promising future. Environ Microbiol. 2023 Jan;25(1):115-125. doi: 10.1111/1462-2920.16238.

Fundings

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE LA SOUVERAINETÉ ALIMENTAIRE

© CIRAD, April, 2023

www.cirad.fr; https://umr-astre.cirad.fr/
5th International Metaproteomics Symposium, 25-27 April 2023 Avignon, France

Conclusion chapitre 3

Comme présenté dans l'**article 4** qui portait sur la détection de micro-organismes (agents infectieux et endosymbiontes) dans les tiques *H. marginatum* collectées principalement sur des chevaux en Corse et sur le pourtour méditerranéen de la France continentale, l'utilisation de la méthode de PCR microfluidique en temps réel a permis la détection de huit genres et/ou espèces d'agents pathogènes connus, ou suspectés de l'être, à savoir *R. aeschlimannii*, *A. phagocytophilum*, *A. marginale*, *E. minasensis*, *Theileria* spp., *T. equi*, *B. occultans* et le virus du West Nile, qui s'avèrent tous être des agents infectieux autochtones à la France. La nouvelle arrivée de *H. marginatum* ne semble donc pas pour l'instant avoir engendré l'introduction de nouveaux agents infectieux exotiques et cette tique ne constituerait donc qu'un risque à devenir un nouveau vecteur pour des agents déjà présents sur le territoire. Toutefois, il est à noter que ce n'est pas parce qu'un agent infectieux est détecté au sein d'une tique, qu'elle est pour autant capable de le maintenir et le transmettre. Il faut tout un réseau d'informations concordantes pour suggérer ce rôle vecteur. Pour *A. marginale*, *E. minasensis*, *Theileria* spp., *T. equi* et *B. occultans*, il ne semble pas possible aux vues de mes résultats et de certaines limites méthodologiques (e.g. pour la caractérisation des espèces du genre Theileria) de conclure quant à la compétence vectorielle de *H. marginatum* pour ces agents infectieux et leur détection dans nos tiques n'est peut-être que le simple reflet de l'infection des hôtes sur lesquels les tiques ont été collectées. La méthode protéomique n'a pas permis de les retrouver sur des tiques adultes à jeun ; toutefois, aux vues des prévalences d'infection observées sur le terrain, le faible échantillonnage pour la protéomique pourrait être à l'origine d'un défaut de détection. Pour *A. phagocytophilum*, cela pourrait être le même cas de figure. Toutefois, le fait d'avoir trouvé des tiques collectées sur des vaches, chevaux et oiseaux infectées pourrait suggérer une aptitude à transmettre cet agent pathogène, même si tous ces animaux sont susceptibles à cet agent infectieux. Les tiques adultes trouvées infectées auraient pu se contaminer au stade immature et maintenir cet agent pathogène par transmission transstadiale, puisque le portage de cette bactérie par des oiseaux, entre autres des merles qui sont très fréquemment parasités par les immatures de *H. marginatum*, a été démontré (Scott et al. 2022). Ces tiques adultes, comme les immatures trouvées infectées, auraient aussi pu être contaminées dès le stade œuf par transmission transovarienne puisque cette dernière a déjà été confirmée chez d'autres espèces de tiques (Baldridge et al. 2009). Enfin, pour le virus du West Nile, le fait de trouver des tiques infectées collectées sur vaches, qui ne constituent pas des hôtes susceptibles à ce virus, suggère l'infection de ces tiques au stade immature lorsqu'elles se sont gorgées sur oiseaux et donc la

transmission transstadiale de ce virus chez *H. marginatum*, ce qui ne correspond qu'à une partie de la compétence vectorielle et nécessite des investigations supplémentaires. Enfin, cette étude a également révélé la présence majoritaire d'une espèce d'endosymbiontes, Francisella-*Like* Endosymbiont (FLE), déjà détectée dans des tiques françaises. Les tiques collectées sur le terrain ont, de manière globale, une prévalence de portage d'agents infectieux assez faible (0,1 à 6,7%), hormis pour l'endosymbionte FLE (en moyenne 97%) et aussi pour la bactérie *R. aeschlimannii* (en moyenne 85%), ce qui interroge quant au rôle de *R. aeschlimannii* chez *H. marginatum*. Cette bactérie est connue ou suspectée d'être responsable de fièvre boutonneuse méditerranéenne chez l'homme, mais elle ne semble pas représenter un risque en France à la hauteur de sa présence dans les populations de tiques. En effet, peu de rapports font état de fièvres liées à *R. aeschlimannii* dans le Sud de la France. La présence de ces 2 espèces (FLE et *R. aeschlimannii*) a été confirmées par l'approche de métaprotéomique par phylopeptidomique, dans les organes de *H. marginatum*, sur des tiques adultes non gorgées provenant de collectes différentes des échantillons utilisés pour la PCR microfluidique. Le croisement de ces données moléculaires démontre la présence physique de ces bactéries dans la tique, avec une abondance relative plus importante dans le tube digestif qui est cohérente avec le rôle avéré d'endosymbionte secondaire de FLE (Buysse et al. 2021). Tous ces résultats, nous amènent à penser que *R. aeschlimannii* pourrait jouer un rôle endosymbiotique chez les tiques (en tant que symbionte secondaire car ne semble pas particulièrement fixée au sein des populations de tiques). Ce travail mérite des études supplémentaires afin de mieux comprendre le rôle de cette bactérie chez les tiques du genre *Hyalomma*, et plus particulièrement *H. marginatum*.

La métaprotéomique par phylopeptidomique offre un aperçu de la composition et de la dynamique des microbiotes présents dans les tiques *H. marginatum*. Les micro-organismes détectés dans les tiques sont encore vivants dans les organes de ces arthropodes. Cette information est cruciale pour comprendre les interactions en cours entre les tiques et leurs microbiotes. Les résultats obtenus confirment l'idée que la composition des microbiotes varie considérablement en fonction des organes de la tique, en particulier les glandes salivaires et le tube digestif. Cette découverte révèle la complexité des interactions entre les tiques et les micro-organismes qu'elles hébergent. Le cas de *Francisella*, avec sa prédominance dans le tube digestif, soulève des questions sur son rôle potentiel en tant qu'endosymbionte ou agent pathogène de la tique. De même, la distribution spatiale de *Rickettsia* suggère que les microbiotes des tiques peuvent être influencés par leur environnement d'origine, probablement par les hôtes sur lesquels elles se nourrissent. Cette technique a également permis la détection de genres incluant des agents infectieux (qui n'ont pas été cherchés en PCR microfluidique) comme des *Pseudomonas* ou *Vibrio*. Les *Pseudomonas* peuvent être dans le cas de certaine espèce

comme *Pseudomonas æruginos*a, responsables de rhinite chez les lapins (Wahl et Forgeot 1954) et comme les lagomorphes sont un hôte de choix des stades immatures de *H. marginatum*, il peut s'agir d'un reste du repas sanguin précédent mais certaines espèces de *Pseudomonas* sont aussi connues pour être des contaminants de kit d'extraction d'acides nucléiques. En ce qui concerne le genre *Vibrio*, l'espèce la plus abondamment détectée est *Vibrio mediterranei,* une bactérie marine qui dans notre cas aurait pu être détectées dans les tiques après réhydratation de ces dernières dans un milieu contaminé par cette bactérie par les entrées maritimes que connaissent certaines zones du pourtour méditerranéen, et qui pourrait refléter une acquisition exogène de micro-organismes. L'identification précise des espèces microbiennes reste un défi, en particulier lorsqu'il s'agit de taxons proches. Les limitations actuelles de la précision de l'identification soulignent la nécessité de développer davantage les bases de données génomiques et d'améliorer les annotations. Cependant, cette étude démontre que l'approche de protéotypage est prometteuse pour comprendre le fonctionnement des microbiotes. Ces découvertes ouvrent la voie à des recherches futures visant à élucider ces rôles fonctionnels et à mieux comprendre les stratégies développées par les micro-organismes pour être transmis aux tiques de la génération suivante ou à d'autres hôtes.

DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les tiques représentent un risque majeur pour la santé humaine et animale avec des conséquences économiques importantes dans le monde entier. Elles sont les principaux vecteurs d'agents infectieux en Europe et peuvent transmettre une grande variété de micro-organismes (bactéries, parasites et virus). Les micro-organismes et leurs tiques vectrices sont à considérer comme des associations complexes qui interagissent fortement entre eux et avec leurs hôtes vertébrés, à différents niveaux, pour une transmission efficace. Pour évaluer cette transmission, il est nécessaire de prendre en considération plusieurs paramètres. Il s'agit notamment de définir la compétence vectorielle de la tique et de déterminer les interactions microbiennes qui s'établissent dans la tique, englobant les agents infectieux. De plus, il faut tenir compte de la capacité des hôtes à répliquer et à transmettre les agents infectieux aux tiques, ainsi que de la virulence de ces agents chez les hôtes et lors des sauts d'hôtes (mammifère vers arthropode et inversement). L'immunité des tiques et des hôtes joue également un rôle crucial en limitant ou non le développement des agents infectieux. Par ailleurs, la présence, l'abondance et la diversité des tiques et des hôtes, ainsi que leurs interactions au sein des communautés, sont des éléments déterminants. Les dynamiques temporelles et spatiales des rencontres entre tiques et hôtes, ainsi que les préférences trophiques des tiques envers leurs hôtes entrent aussi en jeu. Toutes ces interactions sont susceptibles d'évoluer au fil du temps, sous l'influence de facteurs tels que l'introduction d'organismes exotiques envahissants, les changements climatiques, les pratiques humaines, et les adaptations entre tiques, micro-organismes et hôtes. Le nombre important de paramètres à aborder en fait des équations biologiques particulièrement complexes, c'est ce qu'on appelle la capacité vectorielle.

Sous ce principe, dans le cadre de cette thèse, je me suis attelée à caractériser et spatialiser les risques sanitaires liés à la récente installation de la tique exotique *Hyalomma marginatum* dans le sud de la France, en m'intéressant tout particulièrement au risque de transmission enzootique du VFHCC, virus émergent zoonotique en Europe et connu pour être transmis entre autres par cette tique dans le bassin méditerranéen.

Mon travail a pu mettre en évidence des preuves de circulation du VFHCC en France, par l'intermédiaire d'analyses sérologiques. Ces dernières ont permis la détection d'anticorps dirigés

contre ce virus chez les bovins et diverses espèces d'ongulés sauvages (sangliers, chevreuils et cerfs), aussi bien en Corse que dans certains départements continentaux du pourtour méditerranéen (**Article 3**). En particulier, nous avons pu montrer que ces anticorps étaient fonctionnels et spécifiquement dirigés contre le VFHCC, puisqu'ils présentaient une activité neutralisante contre des infections *in vitro* par le VFHCC. En Corse-du-Sud et Haute-Corse, mon étude a confirmé la persistance d'une circulation virale chez les bovins dans les zones déjà identifiées cinq ans plus tôt et à des séroprévalences comparables (Grech-Angelini, Lancelot, et al. 2020). Malgré un faible nombre d'échantillons de faune sauvage, des sangliers corses ont aussi été trouvés séropositifs. Sur le continent, bien que les séroprévalences bovines soient plus faibles à l'échelle des départements, une circulation virale a pu être démontrée pour au moins quatre départements (Pyrénées-Orientales, Hérault, Gard, Alpes-Maritimes). Une hétérogénéité spatiale a été mise en évidence, à l'échelle du département, de la commune, mais surtout de l'exploitation, signifiant certainement des environnements et pratiques d'élevage différents entre fermes, favorisant plus ou moins la transmission du VFHCC aux bovins. Cela m'a permis de déterminer trois grands profils épidémiologiques: (i) des zones indemnes de transmission de VFHCC (pas de symptomatologie chez les animaux et pas encore de cas humain) où la détection d'anticorps reflète seulement l'introduction ponctuelle de tiques infectées ou d'animaux séropositifs, (ii) des zones où la circulation virale est éparse et localisée à quelques exploitations présentant un ou des animaux séropositifs, et (iii) des zones où la transmission virale semble être suffisamment efficace pour créer des groupements de plusieurs fermes voire plusieurs communes, avec parfois la quasi-totalité des animaux séropositifs. Les analyses sérologiques que j'ai réalisées sur la faune sauvage confirment l'absence de circulation de VFHCC dans certains départements comme la Lozère mais sa présence en Hérault, et surtout, a permis de mettre en évidence une apparente forte transmission du virus dans le département des Hautes-Pyrénées où elle n'était pas attendue. Cependant, ces résultats sérologiques ne coïncident pas avec les résultats virologiques produits au cours de ma thèse. En effet, l'analyse des micro-organismes présents dans les tiques *H. marginatum* collectées majoritairement sur chevaux entre 2017 et 2021 sur le continent et en Corse n'a pas permis de détecter de VFHCC (**Article 4**). Une étude similaire, conduite à plus large échelle en Corse, sur diverses espèces de tiques collectées majoritairement sur des bovins prélevés en abattoir n'a pas non plus permis de détecter de VFHCC (Vincent Cicculli, Maitre, et al. 2022). De plus, aucun cas humain de FHCC n'a été rapporté en France pour l'instant (mais on sait que de nombreux malades peuvent être asymptomatiques ou avec des signes cliniques non spécifiques) et aucune surveillance sérologique spécifique n'est établie chez l'homme qui permettrait d'avoir des preuves de circulation chez ce dernier. Ces apparentes contradictions pourraient toutefois trouver une explication dans

l'existence d'une circulation enzootique du VFHCC, à suffisamment bas bruit pour ne pas être détecté chez les tiques vectrices, et ce, du fait de la nature et la composition des communautés d'hôtes présentes en France (d'autant que la prévalence d'infection chez les tiques pour les arbovirus est toujours très faible). En effet, mon travail a permis de montrer qu'au vu des préférences trophiques documentées de *H. marginatum* (**Article 1**) et des communautés d'hôtes présentes dans le sud de la France, cette tique se gorge probablement majoritairement sur oiseaux aux stades immatures et sur chevaux au stade adulte ; les oiseaux étant réfractaires au VFHCC et les chevaux de piètres amplificateurs viraux, la probabilité qu'une tique *H. marginatum* puisse s'infecter est considérée comme faible, au point de ne pas être en mesure de détecter de portage viral chez les tiques si l'effort d'échantillonnage est insuffisant alors que des anticorps contre le VFHCC sont détectés chez les animaux puisqu'ils persistent durant plusieurs années chez ces derniers (**Article 2**). La recherche d'autres micro-organismes dans les tiques *H. marginatum* a, par contre, permis de décrire le premier cortège microbien de cette dernière en France et suggère sa compétence vectorielle pour certains agents infectieux comme *Theileria equi* ou peut être *Anaplasma phagocytophilum* et le virus du West Nile, que seules des études d'infections expérimentales pourront toutefois prouver (**Article 4**). Au cours de mon travail, seuls des micro-organismes déjà connus en France ont été mis en évidence, et les prévalences d'infection dans nos tiques semblent être similaires à d'autres espèces de tiques endémiques. Il n'a pas été mis en évidence de micro-organismes exotiques, signant un risque d'introduction de nouveaux agents pathogènes lié à l'installation de *H. marginatum* dans le sud de la France. Enfin, outre la détection d'un FLE (*Francisella*-Like Endosymbiont) chez quasiment toutes les tiques, le portage de *Rickettsia aeschlimannii* par trois quarts des *H. marginatum* suggère des études complémentaires pour statuer sur le caractère pathogénique ou endosymbiotique de ce micro-organisme ou sur la spécificité de la méthode de détection.

Les principales avancées de ma thèse rappelées, il est intéressant de proposer certaines perspectives de travail quant à une meilleure compréhension de la transmission enzootique du VFHCC en France, entre autres afin de pouvoir expliquer les différences entre résultats sérologiques et virologiques obtenus pour l'instant. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées.

- <u>L'existence d'un autre virus que le VFHCC</u> :

  Bien que de nombreuses preuves immunologiques aient déjà été apportées pour raisonnablement écarter le risque de réaction croisée du test CCHF DAM ELISA avec d'autres virus proches du VFHCC tels que les virus Dugbe, Hazara et Nairobi Sheep Disease (**Article 3**), il serait intéressant

d'aller encore plus loin au niveau moléculaire en identifiant les épitopes viraux contre lesquels sont spécifiquement dirigés les anticorps détectés par sérologie. Comme de nombreux tests sérologiques ciblant le VFHCC, le test ID Screen® CCHF DAM ELISA utilisé dans mon étude cible la nucléoprotéine (NP) qui est grandement conservée entre les différents clades de VFHCC et s'avère particulièrement antigénique. Une cartographie épitopique partielle avait été réalisée par Liu *et al.* (2014) et récemment complétée par Lombe *et al.* (2022) à l'aide de sérums de patients et de singes infectés par le VFHCC, ainsi que d'échantillons d'ascite de souris infectées par les virus Dugbe (DUGV) et Nairobi Sheep Disease (NSDV), phylogénétiquement proches de VFHCC. Dans cette étude, des NP chimères entre la séquence de VFHCC et celle de NSDV ont permis de cibler une zone épitopique centrale de la NP (acides aminés 160 à 320) qui serait antigéniquement spécifique au VFHCC. Puis des peptides synthétiques de 20 acides aminés chevauchant de 10 acides aminés ont permis de préciser les épitopes d'intérêts avec trois peptides (P19, P22, et P30) compris dans la zone spécifique au VFHCC identifiée précédemment et reconnus par des sérums de patients et de singes infectés par le VFHCC. Malheureusement, le peptide P22 présentaient certaines homologies de séquences en acides aminés donnant des réactions croisées avec les anticorps d'ascite de souris infectées par DUGV et NSDV, indiquant que la spécificité antigénique de la NP du VFHCC était restreinte à des épitopes précis (Lombe et al. 2022). Au CIRAD, une étude complémentaire a commencé cette année et doit être poursuivie, afin de voir si ces résultats se confirment ou non avec les sérums de bovins du continent détectés positifs en ELISA dans ma thèse. Après avoir identifié la séquence entière de la NP de VFHCC sur Uniprot (Numéro d'accession : P89522, souche Nigeria/IbAr10200/1970), celle-ci a servi à concevoir des peptides de vingt acides aminés, chevauchant de dix, couvrant la totalité de la séquence polypeptidique (même approche que Lombe *et al.* 2022). Des membranes de PepScan conçues avec les 47 peptides pré-déterminés montrent que les sérums bovins positifs en ELISA ID Screen® CCHF DAM ne reconnaissent pas les peptides reconnus par les sérums de patients ou de singes infectés P19, P22, et P30), mais reconnaissent d'autres peptides (P20, P31 et P32) de la zone centrale antigéniquement spécifique de la NP de VFHCC, et ne présentant pas d'homologies de séquences en acides aminés avec les NP des autres Nairovirus proches (Hazara, Dugbe et NSD). Il faudra confirmer ce résultat expérimentalement sur ces mêmes membranes de PepScan avec des sérums de bovins séropositifs aux virus Hazara, Dugbe et NSD, pour affiner la cartographie épitopique des nucléoprotéines de ces Nairovirus, et apporter un argument supplémentaire démontrant la spécificité des enquêtes sérologiques VFHCC réalisées en France. En outre, nous pouvons nous questionner quant à l'existence non pas d'un VFHCC en France mais peut-être d'un

VFHCC-*like* qui, de par sa très forte ressemblance antigénique avec le VFHCC, initierait la production d'anticorps reconnus comme des anticorps contre le VFHCC par le test ELISA que nous utilisons. Dans ce cas, qu'en serait-il de sa détection virale par PCR ? En ce qui concerne la méthode de qRT-PCR que nous utilisons pour détecter l'ARN du VFHCC dans les tiques (Sas et al. 2018), cette dernière cible, *a priori*, tous les génotypes circulants connus dans le monde et les amorces utilisées se fixent sur des zones conservées du génome viral. Ainsi, à moins que le virus qui circule en France soit une souche encore inconnue et génétiquement très différente des autres souches de VFHCC, nous devrions pouvoir le détecter. De plus, en Corse, Cicculli *et al.* (2022) ont également utilisé une qRT-PCR pan-Nairovirus (Lambert et Lanciotti 2009), sans pour autant qu'elle permette la détection d'ARN viral. Au vu de ces informations, l'existence d'un VFHCC-*like* semble peu probable, puisqu'il devrait à la fois être plus proche antigéniquement que les trois autres Orthonairovirus connus les plus proches du VFHCC pour entraîner une réaction immunitaire productrice d'anticorps spécifiques détectables en ELISA FHCC et suffisamment éloigné du VFHCC sur le plan génomique pour ne pas être détecté par la qRT-PCR ciblant les Orthonairovirus tout en appartenant à ce genre.

Enfin, une technique qu'il serait intéressant de développer pour caractériser ce virus inconnu, s'il existe, qui circulerait dans les tiques *H. marginatum* collectées en France serait le séquençage à haut débit ou NGS (Next-Generation Sequencing). Cette méthode permet de séquencer sans a priori une partie de génome ou les génomes entiers et par séquençage, d'identifier les organismes amplifiés, parfois encore inconnus. Certaines équipes collaborant avec le CIRAD, telles que EPIA (Épidémiologie des maladies animales et zoonotiques) de l'INRAE/Vet-AgroSup et AMU (Unité des Virus Émergents) de l'INSERM/IRD, sont en train de développer ces approches sur la question des Orthonairovirus de tiques en France.

- <u>L'existence d'un autre vecteur que la tique *H. marginatum* :</u>

Comme discuté dans l'**article 3**, une autre hypothèse quant à l'absence de détection virale dans les tiques *H. marginatum* analysées durant ma thèse alors que des anticorps ont été détectés chez les ongulés serait que nous ne serions pas allés chercher dans la bonne espèce de tique. Quand on s'intéresse aux études menées en France sur la détection de VFHCC dans les tiques, on remarque, qu'en Corse, deux études ont été réalisées et n'ont pas non plus permis la détection d'ARN de VFHCC. La première (Grech-Angelini, Stachurski, et al. 2020) avait cherché le virus dans *H. marginatum* (89 pools ; 362 tiques), un des principaux vecteurs du virus VFHCC, *H. scupense*

(135 tiques) dont le rôle vecteur est supposé même s'il semble peu probable (Estrada-Peña *et al.* 2012 ; Chumakov *et al.* 1968), mais également *Rh. bursa* (108 pools ; 518 tiques) dans laquelle le virus a été détecté dans plusieurs régions du pourtour méditerranéen sans que son rôle dans la transmission du virus ne soit prouvé (Papadopoulos et Koptopoulos 1978; Yesilbag et al. 2013). La seconde étude (Vincent Cicculli, Maitre, et al. 2022) a cherché dans 8 051 tiques de huit espèces différentes dont 2 386 *H. marginatum* et toutes se sont montrées négatives. Malgré cela, si l'on considère les candidats vecteurs de VFHCC en France, une attention particulière pourrait être portée à *Rhipicephalus burs*a. En effet, certaines espèces de tiques du genre *Rhipicephalus*, telles que *R. evertsi* (Faye et al. 1999) et *R. rossicus* (Kondratenko 1976), sont déjà reconnues comme vecteurs du virus, au Sénégal et en Russie, respectivement. De plus, la distribution écologique de *R. bursa* est comparable à celle de *H. marginatum* où le virus semble circuler. Des analyses ont été effectuées sur 4 168 tiques (1 061 pools) de *R. bursa*, similaires à celles menées sur *H. marginatum*, pour détecter la présence d'ARN viral de VFHCC en Corse. Cependant, aucune de ces tiques n'a été détectée positive avec, comme pour *H. marginatum*, un effectif trop faible pour détecter une tique positive (en prenant en compte chaque espèce de tique individuellement,(Vincent Cicculli, Maitre, et al. 2022). Au cours de son cycle de développement, *R. bursa* parasite principalement les bovins, qui sont des amplificateurs potentiels du virus. Du fait de son changement d'hôte à chaque stade de développement, il est envisageable qu'elle puisse s'infecter à partir d'un hôte virémique et transmettre le virus au stade suivant sans recourir à la transmission transovarienne. Néanmoins, en raison de sa répartition similaire à celle de *H. marginatum*, les résultats de tests sérologiques effectués sur la faune sauvage, notamment dans les Hautes-Pyrénées, ne soutiennent pas cette hypothèse (car elle ne serait pas présente dans ce département au même titre que *H. marginatum*). Par ailleurs, bien que *R. bursa* soit largement présente en Camargue (Rocafort-Ferrer et al. 2022), les tests sérologiques réalisés montrent principalement des résultats négatifs. Ces deux éléments remettent en question le rôle de *R. bursa* dans la transmission du virus. Même si des traces du virus ont été détectées dans des échantillons de *R. bursa* collectés sur des hôtes en Grèce en 1975 (Papadopoulos et Koptopoulos 1980) ou en Albanie en 2017 (Sherifi et al. 2018), aucune preuve formelle de sa capacité à agir en tant que vecteur compétent n'a été établie jusqu'à présent. Une autre espèce que l'on pourrait considérer est *D. marginatus*. En effet, une étude ancienne a rapporté de la transmission transovarienne de VFHCC chez cette espèce (Kondratenko 1976), sans que ces résultats aient été reproduits pour l'instant, et une récente étude sérologique en Hongrie a permis de détecter des anticorps chez quelques mulots *Apodemus flavicollis* (Földes et al. 2019) suggérant leur exposition à des tiques

(sans précision d'espèces) infectées par le VFHCC. Toutefois, les stades immatures de cette espèce se gorgent essentiellement sur des rongeurs, qui restent a priori de mauvais amplificateurs du VFHCC (Gargili et al. 2017), et donc peu capables d'infecter des tiques au stade immature se transformant ensuite en adultes en mesure de piquer et d'infecter des ongulés, à moins que la transmission transovarienne soit très efficace chez cette espèce. Les adultes, quant à eux, sont principalement retrouvés sur des sangliers (*Sus scrofa*) dont on ne connaît pas exactement le rôle vis-à-vis du VFHCC et sur des chevaux, qui, une fois de plus, ne sont pas de bons amplificateurs du VFHCC (Garcia-Vozmediano et al. 2020; Gilot 1983; Morel 1959). Le fait qu'en France les séroprévalences observées sont bien plus fortes chez les bovins que chez les sangliers qui constituent pourtant un des hôtes sauvages préférentiels de cette espèce de tique n'est pas en faveur d'un rôle majeur joué par *D. marginatus* dans la transmission enzootique du VFHCC. Enfin, cette tique s'avère présente sur large partie du pays (Rubel et al. 2016), même si elle privilégie des zones restant suffisamment chaudes et sèches contrairement à *D. reticulatus*, ce qui pourrait impliquer la détection d'anticorps contre le VFHCC (si le virus était présent) en dehors du pourtour méditerranéen, ce qui n'est pas le cas. En effet, une équipe de Vétagrosup de Lyon collaborant avec le CIRAD a commencé à analyser des sérums de bovins prélevés à l'abattoir de Saint-Étienne et ne trouve, a priori pour l'instant, aucun animal séropositif en VFHCC (Gilot Fromont, Bourgoin, Giuli, communication personnelle). En considérant l'ensemble de ces informations, il semble que *D. marginatus* ne puisse être considérée pour l'instant comme un vecteur potentiel de VFHCC en France (**Article 2**). Toutefois, pour *Rh. bursa* comme pour *D. marginatus*, des études complémentaires à la fois sur leur bio-écologie et leur portage de VHFCC (voire plus largement d'Orthonairovirus) seraient particulièrement intéressantes à effectuer sur le territoire français. Pour approfondir notre compréhension, une démarche exploratoire consisterait à procéder à la collecte sur le terrain de tiques appartenant à ces deux espèces et à les soumettre à des tests de détection du VFHCC. En ce qui concerne *R. bursa*, nous avons eu l'opportunité de collecter un nombre important d'individus durant les années 2022 et 2023. Ces prélèvements ont été effectués sur des chevaux et des bovins. Initialement axée sur la collecte de *H. marginatum*, notre collecte nous a permis de recueillir plusieurs centaines de *R. bursa*, étant donné que les périodes d'activité de ces deux espèces coïncident. Cependant, la situation diffère quelque peu pour *D. marginatus*. Bien que nous ayons réussi à collecter quelques individus, notre prospection n'a pas été menée au moment optimal, c'est-à-dire en février/mars, pour obtenir un échantillonnage plus exhaustif. Pour pallier cette lacune, il serait nécessaire de planifier une collecte durant cette période propice. En particulier, la collecte devrait être effectuée sur des bovins et des chevaux qui ne partagent pas le

même rôle en ce qui concerne l'amplification du virus. Cette approche de collecte et de test sur le terrain serait essentielle pour obtenir des données concrètes sur la présence potentielle du VFHCC dans les populations de tiques *R. bursa* et *D. marginatus*. Les échantillons ainsi collectés et les résultats des tests permettraient d'établir si ces tiques sont effectivement porteuses du virus, ce qui contribuerait grandement à éclairer leur rôle dans la transmission du virus.

S'il ne s'agit pas d'une espèce locale, on pourrait penser à une autre espèce exotique que *H. marginatum*, et incriminer *H. lusitanicum* qui est considérée comme étant un vecteur majeur de VFHCC en Espagne (Valcárcel et al. 2020b; 2023; Agustín Estrada-Peña, Palomar, et al. 2012) et qui était supposée avoir quasiment disparue de France (Article 2). Toutefois, grâce à une collaboration du CIRAD avec l'IHU (l'Institut Hospitalo-Universitaire, Méditerranée Infection) de Marseille, la présence de cette tique a été rapportée dans le département des Bouches-du-Rhône, à plusieurs endroits proches de l'étang de Berre, depuis 2022 (collectées à la main directement sur le sol) (Stachurski, Vial, Pollet, Giupponi, communication personnelle). Ailleurs dans le pays, nous ne connaissons que peu de choses sur sa présence, seuls quelques spécimens avaient été identifiés dans les années 1970-80 dans les Landes, la Gironde et la Charente-Maritime mais aussi les Pyrénées-Orientales, qui entourent les Hautes-Pyrénées, et d'autre part dans les Bouches-du-Rhône, le Var et près des Alpes-Maritimes (Rageau 1972; Morel 1959). En revanche, nous ne savons pas si des populations résiduelles ont pu persister ou si de nouvelles populations se sont établies à la suite d'introductions sur le territoire. *H. lusitanicum* est, au stade immature, inféodée aux lagomorphes, et se retrouve plutôt sur des cervidés au stade adulte. Depuis les années 1970, des importations de lapins et de lièvres sauvages sont signalées en provenance d'Espagne pour repeupler les réserves de chasse françaises et pallier à la disparition des espèces indigènes due à la myxomatose et à la maladie hémorragique du lapin (González-Redondo et Sánchez-Martínez 2014; Letty 2021; Aubineau 2006). En outre, les transits occasionnels d'animaux sauvages, tels que la réintroduction du bouquetin ibérique (*Capra hircus*) dans les montagnes transfrontalières des Pyrénées peuvent représenter des voies d'introduction de *H. lusitanicum* (Espunyes et al. 2021). *H. lusitanicum* pourrait donc constituer un bon candidat pour la transmission de VFHCC en France, dans certaines régions comme la Camargue ou potentiellement certaines zones des Pyrénées, où elle serait présente à défaut de *H. marginatum*. Cette hypothèse serait cohérente avec les résultats de sérologie chez les cervidés des Hautes-Pyrénées (**Article 3**), où l'absence de *H. marginatum* est prédite (Bah et al. 2022). Par contre, l'absence de bovins séropositifs en Camargue dans les Bouches-du-Rhône, alors que ces derniers peuvent aussi être parasités par les stades

adultes de *H. lusitanicum*, reste discutable. Bien que l'effort d'échantillonnage soit encore faible, la première chose à faire serait donc de tester en qRT-PCR les tiques *H. lusitanicum* qui ont été collectées sur le terrain dans les Bouches-du-Rhône. Ensuite, il serait intéressant d'en connaître plus sur la distribution et la bio-écologie de cette tique en France. Pour *H. marginatum*, dont le cheval est l'hôte préférentiel, il était assez simple d'aller dans des structures équestres pour aller échantillonner des tiques. En revanche, pour *H. lusitanicum* qui se nourrit principalement d'animaux sauvages, cela semble plus compliqué. En effet, dans le cadre du projet Holistique, des collectes de tiques sur faune sauvage ont été mises en place depuis deux ans grâce à une collaboration du CIRAD avec les Fédérations Nationales et Départementales de la Chasse (FNC/ FDC), et les résultats s'avèrent peu concluants pour l'instant. En effet, la période de chasse en France (entre septembre et février) ne coïncide pas avec la période d'activité de *H. lusitanicum* (mai à septembre). En outre, l'effort de communication pour encourager les chasseurs à réaliser ces prélèvements est conséquent et reste un facteur limitant. D'après les données de nos collègues espagnols, une autre solution pourrait être de collecter cette tique sur le terrain, non pas sur animaux mais en utilisant la méthode du drapeau qui semble mieux fonctionner avec *H. lusitanicum* que *H. marginatum* (Valcárcel et al. 2023). Une autre option serait d'utiliser des "appâts humains" car cette tique semble assez anthropophile mais, dans ce cas, en définissant les conditions techniques et éthiques. Quel que soit la méthode de collecte, afin d'optimiser les recherches, il serait préférable de se rendre dans les lieux où des rapports de présence (même historiques) existent pour voir si cette tique y est toujours présente, et ensuite échantillonner de façon concentrique. En outre, pour augmenter encore nos chances de la trouver, il faudrait, dans ces zones, trouver des garennes de lapins et échantillonner à proximité pour espérer y trouver des tiques adultes à jeûn. Enfin, puisqu'au stade adulte *H. lusitanicum* parasite principalement des cervidés mais aussi des bovins, il serait intéressant de cibler des zones d'interface entre lapins et cervidés et/ou bovins. La période d'échantillonnage devrait cibler la saison où la tique est active, c'est-à-dire autour de l'été pour les adultes à jeûn. Enfin, se focaliser en priorité sur des zones où le VFHCC semble circuler permettrait d'optimiser la recherche de VFHCC dans cette tique et de pouvoir ainsi conclure quant à son rôle dans la transmission enzootique du VFHCC.

- <u>Période d'échantillonnage des tiques *H. marginatum*</u> :

Pour expliquer l'absence de VFHCC dans les tiques que j'ai testées durant ma thèse, nous pourrions aussi penser que nous n'avons pas échantillonné aux bonnes périodes, afin de collecter des tiques infectées. En France, la période d'activité des stades adultes de *H. marginatum* est au

printemps, de mars à juillet, avec un pic d'activité en avril, mai et juin. Pour le VFHCC, les tiques sont considérées comme des réservoirs du virus. Par conséquent, il semble possible de trouver des tiques positives toute l'année, du moment qu'elles sont actives, et à tous les stades notamment si la transmission transovarienne est efficace (Gargili et al. 2017). Toutefois, la saisonnalité pourrait peut-être impacter la prévalence d'infection des tiques, par le biais d'une remise en circulation du virus chez les hôtes vertébrés animaux par les tiques déjà infectées lorsqu'elles entrent en activité, et entraîner l'infection de nouvelles tiques se gorgeant sur animaux virémiques. Etant donné que les stades adultes de *H. marginatum* sont actifs à compter de la fin du mois de mars (Stachurski, communication personnelle), cette remise en circulation commencerait au début du printemps. A cette période, il est supposé qu'une grande majorité des tiques adultes à jeûn se mettent à chercher, en même temps, un hôte pour se gorger, avec un spectre d'hôtes bien plus large que durant le reste de la saison où elle semble présenter de fortes préférences trophiques. Cette hypothèse se base uniquement sur des dires d'éleveurs qui déclarent "voir plus de tiques à pattes rayées en début de saison " (début avril) et "sur leurs chèvres ou leurs moutons alors qu'ensuite ils n'en voient plus", et nécessiterait donc d'être vérifiée. Si en début de saison, on retrouve plus de *H. marginatum* adultes sur des hôtes accessoires, pour elle, comme les petits ruminants qui s'avèrent par contre être de bons hôtes amplificateurs de VFHCC, cette période pourrait s'avérer propice à l'échantillonnage de tiques, avec plus de tiques infectées. Malheureusement, la majorité de nos collectes ont été réalisées plus tardivement (mai-juin) et cette "période plus propice" est difficile à cibler. En effet, si l'on se fie à notre expérience sur le terrain, cela peut changer d'une année à l'autre. Prenons l'exemple d'un éleveur de chèvres dans les Pyrénées-Orientales, qui a remarqué, en 2022, la présence de *H. marginatum* sur ces animaux dès le mois d'avril, et quand nous nous sommes rendus chez lui au mois de mai, il n'y avait plus rien (sans l'adjonction de traitements acaricides). En 2023, nous sommes allés sur le terrain plus tôt, en avril, et les chèvres ce dernier n'avait pas de tiques, mais il nous a contactés début juin pour nous avertir de l'arrivée de *H. marginatum* dans son troupeau (photos à l'appui). De la même manière, en 2022, dans les Alpes-Maritimes, toutes les personnes que nous avons rencontrées début juin nous ont dit que les tiques que nous recherchions ("à pattes rayées") étaient actives plus tôt dans la saison. Pour l'heure, nous ne comprenons pas ce qui entraîne cet apparent décalage de période d'activité de *H. marginatum* et s'il existe vraiment, car cela contredit les données d'activité que le CIRAD collecte depuis quatre ans, en suivant l'infestation par *H. marginatum* d'un troupeau de chevaux à l'observatoire de Pompignan (Stachurski, communication personnelle). Toutefois, afin d'éviter ce possible biais d'échantillonnage pour détecter du VFHCC chez les tiques, il serait intéressant de mettre en place,

dans des zones où la circulation virale est confirmée par sérologie, un suivi temporel sur toute la période d'activité des stades adultes de *H. marginatum*, soit de fin mars à fin juillet, si possible sur différents hôtes pour maximiser les chances d'échantillonner sur animaux virémiques capables de réinfecter des tiques. Dans des élevages de bovins très séropositifs, on pourrait suivre les populations de tiques mais également l'évolution de la présence d'anticorps (augmentation des taux d'IgG par rapport au taux précédent la période d'infestation par les tiques et éventuelle présence d'IgM signant une réinfection récente) et de VFHCC, afin d'identifier la période de remise en circulation du virus. Mais cette méthode présente certaines contraintes pratiques, comme la collecte de tiques sur vaches parfois peu manipulables surtout lorsqu'elles sont en liberté à l'année sur des pâtures, ou encore la réalisation de prises de sang régulières des bovins par une personne agréée.

- Zones d'échantillonnage des tiques *H. marginatum* :

Une dernière hypothèse concernant l'absence de détection de VFHCC dans nos tiques *H. marginatum* serait que nous ne serions pas allés échantillonner dans les bonnes zones. Comme je l'ai expliqué dans l'**article 2**, la composition locale des communautés d'hôtes peut influer sur la prévalence d'infection des tiques vectrices et le niveau de transmission du VFHCC. De ce fait, on peut supposer que toutes les populations de tiques *H. marginatum* ne sont pas forcément infectées ou à des niveaux d'infection différents. Prenons l'exemple des bovins en liberté dans les zones de montagne l'été, ce que l'on nomme l'estive, une tradition dans le Sud de la France et en particulier en Corse. Dans cette dernière région, un rapport de Santucci, Fabre et Paoli (2011) de l'INRAE de Corte décrit que les éleveurs gèrent leurs animaux par lots, avec des conduites différentes pour l'accès aux pâtures et à l'estive. Les génisses, ainsi que les vaches dont les veaux sont nés trop tardivement, rejoignent les alpages le plus tôt possible dans l'année, au début du printemps. A l'inverse, les vaches dont les veaux sont nés en hiver restent dans les pâturages de plaine jusqu'à ce que leurs veaux atteignent l'âge d'être abattus et ne rejoignent les pâturages de montagne qu'en fin de printemps ou début d'été. Dans ce cas, les veaux envoyés à l'abattoir n'expérimentent donc jamais l'estive. Les estives sont, a priori, des zones beaucoup plus naturelles que les pâturages de plaine, avec une végétation typiquement xérophile de maquis définie comme particulièrement favorable à de fortes densités de *H. marginatum* (Bah et al. 2022), et des communautés abondantes et diversifiées d'hôtes sauvages (lièvres, lapins, sangliers, cervidés, vaches ensauvagées, …) supposés être de bons amplificateurs de VFHCC et de tiques. Les populations de *H. marginatum* y sont certainement abondantes. En outre, du fait de la présence de la faune sauvage à laquelle *H.*

lusitanicum est fortement inféodée, cette dernière y est peut-être aussi présente, même si pour l'instant elle n'y a jamais été recherchée et donc détectée. Ces zones peuvent donc être supposées très propices à la transmission du VFHCC. A l'inverse, en pâturages de plaine, les communautés d'hôtes sont probablement moins diversifiées et abondantes en faune sauvage, avec souvent l'association, sur les mêmes pâtures des bovins avec des chevaux qui constituent de mauvais amplificateurs de VFHCC mais des hôtes préférentiels des tiques ; dans ces zones plus domestiques, il est probable que seule *H. marginatum* soit présente et en abondance moindre. Ces pâturages de plaine sont donc supposés moins favorables à la transmission de VFHCC. Or, les tiques *H. marginatum* collectées au printemps en abattoir et analysées pour la détection de VFHCC (Vincent Cicculli, Maitre, et al. 2022) proviennent des veaux qui ne sont pas partis en estive et ont justement passé la majorité du temps sur ces pâturages de plaine, donc ont peu de chances d'être trouvées infectés. Ce qui n'empêche pas de détecter des anticorps contre le VFHCC indifféremment chez toutes les vaches puisque ces dernières passent par l'estive, soit dès le début de la saison soit à l'approche de l'été, tandis que les veaux qui passent à l'abattoir au printemps ne sont pas prélevés en prophylaxie annuelle. En termes de transmission à l'homme, les zones d'estive supposées favorables à la transmission de VFHCC sont peu fréquentées par l'homme, si ce n'est quelques randonneurs et éleveurs ou bergers, tandis que les pâturages de plaine sont fortement fréquentés mais ne présentent, *a priori*, qu'un risque faible de transmission de VFHCC, ce qui permet de prédire dans les deux cas peu ou pas de contaminations humaines par piqûres de tiques par le VFHCC.

L'hypothèse de zones hyperlocalisées de transmission du VFHCC, comme les estives, pourrait en partie expliquer l'hétérogénéité spatiale, à l'échelle de la commune et de l'exploitation, des séroprévalences observées chez les bovins en Corse et suggère que les pratiques d'élevage sont en cause et devraient être plus étudiées pour comprendre la dynamique de transmission du VFHCC en France. Toutefois, ces informations sur la gestion des lots et l'usage d'estives ne sont pas disponibles à partir des bases de données telles que la Base de Données Nationale d'Identification des bovins (BDNI). Ainsi, lors du stage de Master 2 de Romain Clerget que j'ai co-encadré, une enquête préliminaire a été réalisée auprès d'éleveurs de bovins du nord-ouest de la Corse, où le VFHCC semble bien circuler et dont les troupeaux avaient été testés en sérologie VFHCC. En plus d'un entretien semi-directif sur leurs pratiques d'élevage, ces derniers devaient indiquer sur une carte les zones où étaient présents leurs bovins et à quelle période. Au terme de 22 questionnaires, ce qui constitue un très faible échantillon, la pratique du parcours en estives

présentait un effet positif très significatif sur la séropositivité des bovins (*P*-value = 0,00309). Si cette hypothèse de l'estive se confirme, cela pourrait entraîner un biais lors de la détermination des habitats favorables à l'infestation des bovins par les tiques vectrices de VFHCC, en décrivant les habitats dans une zone tampon de 5 km autour de chaque ferme, comme si tous les bovins exploitaient indifféremment les pâturages de la ferme et sans prendre en compte le passage de certains en estive (comme réalisé dans l'**article 3** sur les données sérologiques du continent, faute d'informations complémentaires).

Afin de confirmer cette dernière hypothèse de circulation hyperlocalisée de VFHCC, il serait intéressant de pouvoir collecter des tiques dans des élevages avec un grand nombre de bovins séropositifs, au moment où ils se trouvent en estive, voire même à différents moments du printemps et de l'été pour suivre tous les déplacements de pâturages, et de les tester en VFHCC. Cette tâche est particulièrement compliquée car à ce moment les animaux sont en libre parcours et ne sont que très rarement rassemblés et attachés pour des actions bien particulières, comme le changement de pâtures ou le tri des veaux en été. Ce type d'échantillonnage requiert donc l'acceptation et la participation active des éleveurs, ainsi qu'un long travail en amont pour comprendre leurs gestions respectives de leurs animaux. Une autre alternative pourrait être de placer dans les zones ciblées des animaux sentinelles comme des chevaux (plus facilement rattrapables et examinables) ; malheureusement, les règles d'utilisation des estives sont parfois très strictes et ne permettent généralement pas l'introduction d'autres espèces animales que celles prévues pour y être. Ainsi, en collaboration avec certains éleveurs, nous avons commencé en 2023 une étude dans une vallée de production de bovins allaitants (vallée du Conflent, autour de la commune de Prades) dans les Pyrénées-Orientales. Dans cette vallée, des séroprévalences à VFHCC élevées ont été mesurées, avec toutefois une forte hétérogénéité spatiale entre élevages parfois très proches. En questionnant les éleveurs dont les bovins ont été testés en ELISA, il est apparu que ceux qui avaient leurs animaux sur des pâturages de printemps ou des estives très proches, voire communs, présentaient pour la plupart des statuts sérologiques similaires. Nous nous sommes rendus en avril 2023, pour conduire une première collecte de tiques, dans tous ces élevages lorsque les animaux sont encore sur leurs pâturages d'hiver, ou déjà en pâtures intermédiaires de printemps. Malheureusement, faute de temps, nous n'avons pu nous y rendre à nouveau en été pour échantillonner les estives et ce travail devra être poursuivi ou reconduit par le CIRAD en 2024. Toutes les tiques collectées sont pour l'instant en attente d'être testées en

détection PCR du VFHCC. De la même manière que dans les Pyrénées-Orientales, un tel travail pourrait être réalisé en Corse, dans la zone de forte circulation virale dans le nord-ouest de l'île.

En termes de pratiques d'élevage, il serait intéressant d'étudier leur diversité, à l'échelle de filières de production, de grandes régions, mais aussi de zones plus localisées, afin de mieux comprendre leur rôle sur la transmission du VFHCC au sein des ruminants domestiques. Dans l'**article 3**, plusieurs hypothèses ont été émises quant aux facteurs pouvant expliquer l'hétérogénéité spatiale observée des séroprévalences. Ces facteurs peuvent agir, soit sur l'exposition des bovins aux tiques vectrices de VFHCC, soit sur le niveau de circulation du VFHCC entre hôtes animaux et tiques vectrices. Comme expliqué précédemment, une première hypothèse portait sur le libre parcours des animaux sur des zones intermédiaires ou d'estive, avec une végétation propice à *H. marginatum*, au printemps et en début d'été qui correspond à la période d'activité des stades adultes de *H. marginatum*. Ces estives seraient donc favorables à la présence de tiques vectrices de VFHCC et donc à l'exposition des bovins à ces dernières. De plus, il est supposé que plus les animaux séjournent longtemps sur ces parcours et se déplacent sur de grandes distances, plus ils sont susceptibles d'être exposés aux tiques *H. marginatum*, contrairement à ceux qui restent sur les parcelles clôturées tout au long de l'année. Mieux définir les zones visitées par les bovins au cours des saisons permettra de mieux corréler ces zones aux habitats prédits comme favorables à la présence et l'abondance de *H. marginatum* et voir si cette variable devient alors déterminante quant à la séropositivité des animaux. Alors que le modèle de Bah *et al.* (2022) fonctionne bien pour le continent pour la prédiction de présence de la tique, il doit encore être adapté aux spécificités de la Corse. Une seconde hypothèse portait sur le contact des bovins avec d'autres animaux, qu'ils soient sauvages ou domestiques, pouvant être de plus ou moins bons amplificateurs du VFHCC et être plus ou moins appréciés comme hôtes nourriciers par *H. marginatum*, ce qui influencerait le niveau de transmission du VFHCC aux bovins. Ainsi, les enquêtes préliminaires menées auprès de quelques éleveurs corses a montré que lorsque les bovins étaient en contact avec d'autres bovins (bons amplificateurs de VFHCC), la séroprévalence dans les élevages était supérieure à celle des élevages dont les bovins partageaient un milieu avec des chevaux (mauvais amplificateurs de VFHCC). Cette relation n'était toutefois statistiquement pas significative et nécessite un plus grand nombre d'enquêtes pour tester l'effet de cette variable. Il faudrait en outre rajouter l'information concernant les contacts avec la faune sauvage. Enfin, et de manière moins courante, l'achat d'animaux en dehors de l'exploitation devrait également être considéré comme source de nouveaux contacts avec des animaux pouvant déjà être infectés ou parasités par des tiques porteuses du VFHCC et facilitant l'introduction du virus dans l'élevage et sa propagation locale. Une troisième hypothèse portait sur

l'utilisation de traitements anti-parasitaires chez les animaux (insecticides, acaricides ou vermifuges à ivermectine pouvant avoir une action systémique contre les parasites externes, dont les tiques). En réduisant ainsi les charges parasitaires en tiques sur les bovins, l'antiparasitaire contribuerait à diminuer les risques de transmission du VFHCC. Pour ce genre d'investigation, il ne suffit pas d'identifier les molécules utilisées, mais aussi de voir les doses efficaces utilisées et la fréquence ou les périodes auxquelles elles sont utilisées, afin de déterminer la durée de protection des animaux et la mettre en relation avec la période d'activité de *H. marginatum*. Enfin, une dernière hypothèse concernait la race des bovins élevés dans chaque exploitation, en considérant que certaines races peuvent s'avérer plus résistantes aux infestations par les tiques, dont *H. marginatum*, voire à l'infection par le VFHCC. Bien que la résistance aux tiques ait été démontrée en Afrique chez certaines races locales versus des races améliorées introduites récemment sur le territoire (Frisch et O'Neill 1998; Frisch 1999), il n'est pas dit que ce phénomène puisse exister en France où les infestations par les tiques sont moindres et l'installation de *H. marginatum* encore récente. Cette hypothèse mérite toutefois d'être testée, avec la difficulté que les élevages bovins présentent parfois un mélange de races et qu'il est alors difficile de les catégoriser.

L'**article 3** a montré que certains facteurs précités pouvaient être appréhendés par l'intermédiaire de bases de données officielles telles que la BDNI qui renseigne sur la localisation des élevages, l'âge et la race des bovins, leurs déplacements au cours de leur vie, ainsi que sur la présence d'autres animaux domestiques sur l'élevage. Cependant, aucune information n'y est disponible quant aux traitements administrés aux animaux, aux pâturages ou estives utilisés par ces derniers, la présence de faune sauvage ou de certaines espèces domestiques comme les chevaux, ou encore l'utilisation mutualisée de pâtures par plusieurs espèces animales présentes ensemble sur un même élevage. En ce qui concerne l'utilisation des pâturages, une meilleure estimation pourrait se faire en croisant les informations de la BDNI et du Registre Parcellaire Graphique (RPG), disponible pour chaque département et indiquant l'ensemble des pâtures appartenant à chaque exploitation. En partant du principe que seuls les élevages allaitants utilisent le parcours en estives et que, par praticité, les éleveurs essaient d'avoir des zones d'estives contiguës aux pâtures d'hivernage ou à des distances acceptables, nous pourrions attribuer à chaque élevage une "zone d'influence" où les bovins pourraient s'infester et s'infecter. Toutefois, ces approximations devraient être vérifiées, au moins en partie, sur un petit nombre d'élevages. Pour les contacts des bovins avec la faune sauvage, nous pourrions utiliser d'autres bases de données telles que le GBIF (Global Biodiversity Information Facility) qui est le système mondial d'information sur la biodiversité, ainsi que des cartes prédictives sur la favorabilité des habitats pour certains ongulés

comme les sangliers ou les cervidés (issues des projets Edenext et Vmerge). Pour compléter ces informations, la seule option restante est la réalisation d'enquêtes sur le terrain par l'intermédiaire de questionnaires semi-directifs auprès des éleveurs, comme cela a déjà été testé en Corse, ou auprès des Fédérations De Chasseurs. Toutefois, ce premier essai a montré certaines limites de la méthode. Nous avons, entre autres, remarqué qu'en proposant une carte sur laquelle les éleveurs devaient indiquer les lieux de pâtures de leurs animaux, ces derniers avaient parfois du mal à cibler la bonne zone, faute d'avoir à disposition des représentations des zones à différentes échelles spatiales. En outre, le questionnaire que nous avons utilisé pour la Corse mériterait d'être revisité, afin d'y inclure des questions croisées pour s'assurer de la validité des réponses des éleveurs, mais aussi des questions plus précises sur les traitements antiparasitaires utilisés, avec des doses, des périodes, des molécules proposées car les éleveurs ne se souviennent parfois plus de ces détails et laissent leur vétérinaire choisir. Concernant les contacts entre animaux, les réponses pour la faune sauvage s'avéraient toujours assez vagues et restaient inexploitables. En Corse, de par l'ensauvagement de certains bovins, il serait important de faire la distinction des contacts des bovins avec des bovins d'autres élevages ou avec des bovins redevenus sauvages. Pour la faune domestique, il faudrait, là aussi, demander plus de précisions aux éleveurs, non pas que sur les espèces présentes dans l'élevage mais aussi sur le maintien de ces espèces sur les mêmes pâtures et le temps de partage des pâtures. Au vu de ces premiers résultats, un important travail en amont de définition et de test d'un questionnaire est nécessaire, par un collectif de scientifiques regroupant des compétences en zootechnie, médecine vétérinaire, sociologie, et statistiques.

Enfin, en termes de surveillance des risques sanitaires associés à l'installation de la tique *H. marginatum* en France, les résultats de ma thèse et les perspectives de recherche discutées plus haut permettent de proposer certaines mesures pouvant être mises en place.

Étant donné que l'émergence de la FHCC est le risque majeur lié à la tique *H. marginatum*, une première action de surveillance serait de continuer à chercher du VFHCC dans les tiques, afin de pouvoir identifier l'agent infectieux qui circule chez les ongulés domestiques et sauvages en France et caractériser la (ou les) souches pour estimer le risque encouru par l'homme en cas de piqûre de tiques ou, pour les personnes à risques, de contact avec des fluides biologiques animaux contaminés (éleveurs, vétérinaires, personnels d'abattoir…). Il serait intéressant de cibler les espèces animales présentant de fortes séroprévalences et/ou connues pour être de bons amplificateurs viraux (e.g. les bovins), dans des zones et élevages où le virus semble bien circuler (e.g. hotspots au nord-ouest de la Corse, dans les Pyrénées-Orientales ou dans les Alpes-Maritimes), au printemps où les stades adultes

des tiques supposées vectrices sont actives et la transmission aux ongulés domestiques est supposée reprendre, et si l'hypothèse du parcours est confirmée lorsque les animaux sont amenés sur leurs pâturages de printemps ou d'estive. Il est recommandé de tester plus largement toutes les tiques collectées sur bovins, et non que la tique *H. marginatum*, tant que nous ne connaissons pas le (ou les) vecteur(s) du VFHCC en France. Dans un second temps, lorsque ce virus aura été isolé, il peut être intéressant de réaliser un suivi en abattoir, si possible où sont abattus des animaux qui proviennent des zones considérées à forte transmission, ce qui permettrait de voir toutes les espèces de tiques présentes sur les animaux et ce à toutes les saisons. Toutefois, ce procédé peut présenter certaines limites, comme le risque de collecter des tiques sur des veaux qui ne sont pas exposés aux tiques infectées de par certaines pratiques d'élevage (e.g. cas de la Corse), ou encore celui d'échantillonner des animaux qui ont été envoyés en engraissement dans des pays frontaliers où la FHCC est endémique comme en Espagne et qui reviennent en France pour y être abattus (e.g. cas des Pyrénées-Orientales).

Il serait également nécessaire de continuer la surveillance sérologique de la faune domestique, via les sérums de prophylaxie annuelle, pour voir si d'autres zones de circulation apparaissent, en particulier sur le continent, et si les niveaux de transmission changent au cours du temps. En Corse, la réactualisation des résultats de sérologie cinq ans après la première enquête n'ayant pas montré d'évolution notoire, il serait alors raisonnable de proposer un suivi tous les 5 ans, permettant tout de même de suivre des animaux prélevés précédemment et détecter de nouvelles séroconversions. En effet, parmi les sérologies réalisées sur le continent, nous avons eu l'opportunité, parfois, de tester des animaux prélevés deux années consécutives, et seules deux vaches dans les Alpes-Maritimes avaient séroconverti, preuve que l'évolution ne semble pas très rapide. Il serait aussi intéressant de maintenir le suivi au niveau de la faune sauvage, en utilisant les sérothèques des fédérations de chasse qui, dans certains départements, collectent sur sangliers, chevreuils, cerfs, renards, mais aussi lièvres et lapins de garennes. Pour ce faire, il faudrait systématiser les prélèvements de sérums par les chasseurs, en réalisant des formations à cet effet, afin d'avoir une meilleure couverture spatiale avec une participation large des départements du sud de la France. Les laboratoires départementaux d'analyses étant le lieu où arrivent les sérums de prophylaxie bovine, mais aussi parfois celui où sont stockées les sérothèques des fédérations de chasse, leur implication dans cette surveillance devrait être encouragée pour ne plus dépendre de leur acceptation respective à participer, en leur proposant, à terme, de réaliser eux-mêmes les sérologies au VFHCC selon un plan prédéfini de sous-échantillonnage pour systématiser cette surveillance. Cette proposition soulève toutefois la question du recueil de l'acceptation éclairée des éleveurs qui restent propriétaires des sérums de leurs animaux et du

financement de cette surveillance qui ne devrait pas être aux frais des éleveurs puisque la FHCC reste une maladie non réglementée et sans implications sanitaires si un animal présente des anticorps.

Il serait enfin utile d'initier une surveillance sérologique chez l'homme pour savoir si des humains sont exposés au virus, même si aucun cas clinique n'est pour l'instant déclaré. On pourrait au départ focaliser nos efforts sur le public dit à risque d'exposition aux tiques ou aux fluides biologiques d'animaux potentiellement contaminés (e.g. éleveurs, chasseurs, vétérinaires, professionnels de la nature, et personnels d'abattoir et de centres équestres). Dans un second temps, une surveillance en population générale, dans les hotspots de circulation, pourrait être envisagée. En parallèle, la surveillance de l'émergence de cas humains doit être maintenue dans les services hospitaliers, ainsi que chez les médecins ruraux des zones de forte circulation virale indiquée par sérologie des animaux notamment des bovins, afin de détecter, non pas que des formes cliniques hémorragiques mais aussi des syndrômes fébriles non spécifiques suite à une piqûre de tique identifiée comme potentiellement vectrice.

Le VFHCC n'étant pas le seul agent infectieux pouvant être transmis par la tique *H. marginatum* il serait important de continuer de surveiller son portage d'autres agents infectieux (bactéries, virus et parasites), afin de voir si des changements s'opèrent quant aux prévalences d'infection décrites dans ma thèse et par d'autres études similaires, et détecter l'apparition de nouveaux agents infectieux non encore décrits chez cette espèce de tique. Plus particulièrement pour les agents de la piroplasmose équine (*T. equi* et *B. caballi*, *T. haneyi*) et le virus du West Nile, il serait utile non seulement de suivre les niveaux d'infection des tiques *H. marginatum* mais aussi de voir si l'épidémiologie de ces maladies venait à changer en termes d'incidence ou de saisonnalité des cas au fur et à mesure que la tique envahit de nouvelles zones sur le territoire français. La recherche pourra apporter des informations utiles quant au rôle vecteur de *H. marginatum* pour ces agents infectieux, car sa compétence vectorielle reste questionnée, et permettra d'anticiper les risques sanitaires associés.

Bibliographie

Aguiar, Daniel M., Thayza F. Ziliani, Xiaofeng Zhang, Andreia L. T. Melo, Ísis A. Braga, Rute Witter, Leodil C. Freitas, et al. 2014. « A Novel Ehrlichia Genotype Strain Distinguished by the TRP36 Gene Naturally Infects Cattle in Brazil and Causes Clinical Manifestations Associated with Ehrlichiosis ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 5 (5): 537-44. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.03.010.

Aguilar-Díaz, Hugo, Rosa Estela Quiroz-Castañeda, Mayra Cobaxin-Cárdenas, Elizabeth Salinas-Estrella, et Itzel Amaro-Estrada. 2021. « Advances in the Study of the Tick Cattle Microbiota and the Influence on Vectorial Capacity ». *Frontiers in Veterinary Science* 8. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2021.710352.

Ak, Ç, Ö Ergönül, et M. Gönen. 2020. « A Prospective Prediction Tool for Understanding Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Dynamics in Turkey ». *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 26 (1): 123.e1-123.e7. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.05.006.

Aker, Servet, Halil Akıncı, Cem Kılıçoğlu, et Hakan Leblebicioglu. 2015. « The Geographic Distribution of Cases of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: Kastamonu, Turkey ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 6 (6): 730-36. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.06.008.

Aktas, Munir, Zati Vatansever, et Sezayi Ozubek. 2014. « Molecular Evidence for Trans-Stadial and Transovarial Transmission of Babesia Occultans in Hyalomma Marginatum and Rhipicephalus Turanicus in Turkey ». *Veterinary Parasitology* 204 (3-4): 369-71. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.05.037.

Akyildiz, Gurkan, Dennis Bente, Aysen Gargili Keles, Zati Vatansever, et Sirri Kar. 2021. « High Prevalence and Different Genotypes of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Genome in Questing Unfed Adult Hyalomma Marginatum in Thrace, Turkey ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 12 (2): 101622. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101622.

Al-Abri, Seif S., Idris Al Abaidani, Mehdi Fazlalipour, Ehsan Mostafavi, Hakan Leblebicioglu, Natalia Pshenichnaya, Ziad A. Memish, et al. 2017. « Current Status of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever in the World Health Organization Eastern Mediterranean Region: Issues, Challenges, and Future Directions ». *International Journal of Infectious Diseases* 58 (mai): 82-89. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.02.018.

Albornoz, Amelina, Anja B. Hoffmann, Pierre-Yves Lozach, et Nicole D. Tischler. 2016. « Early Bunyavirus-Host Cell Interactions ». *Viruses* 8 (5): 143. https://doi.org/10.3390/v8050143.

Alekseev, A. N., et H. V. Dubinina. 1996. « Exchange of Borrelia Burgdorferi between Ixodes Persulcatus (Ixodidae:Acarina) Sexual Partners ». *Journal of Medical Entomology* 33 (3): 351-54. https://doi.org/10.1093/jmedent/33.3.351.

Anderson, Lucy G., Steve Rocliffe, Neal R. Haddaway, et Alison M. Dunn. 2015. « The Role of Tourism and Recreation in the Spread of Non-Native Species: A Systematic Review and

Meta-Analysis ». *PLOS ONE* 10 (10): e0140833. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140833.

Angelini, R., A. C. Finarelli, P. Angelini, C. Po, K. Petropulacos, G. Silvi, P. Macini, et al. 2007. « Chikungunya in North-Eastern Italy: A Summing up of the Outbreak ». *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 12 (11): E071122.2. https://doi.org/10.2807/esw.12.47.03313-en.

Ansari, S. A., V. S. Springthorpe, et S. A. Sattar. 1991. « Survival and Vehicular Spread of Human Rotaviruses: Possible Relation to Seasonality of Outbreaks ». *Reviews of Infectious Diseases* 13 (3): 448-61. https://doi.org/10.1093/clinids/13.3.448.

Apanaskevich, Dmitry A., et Ivan G. Horak. 2008. « The genus Hyalomma Koch, 1844: v. re-evaluation of the taxonomic rank of taxa comprising the H. (Euhyalomma) marginatum koch complex of species (Acari: Ixodidae) with redescription of all parasitic stages and notes on biology ». *International Journal of Acarology* 34 (1): 13-42. https://doi.org/10.1080/01647950808683704.

Armengaud, Jean. 2023. « Metaproteomics to Understand How Microbiota Function: The Crystal Ball Predicts a Promising Future ». *Environmental Microbiology* 25 (1): 115-25. https://doi.org/10.1111/1462-2920.16238.

Armengaud, Jean, Judith Trapp, Olivier Pible, Olivier Geffard, Arnaud Chaumot, et Erica M. Hartmann. 2014. « Non-Model Organisms, a Species Endangered by Proteogenomics ». *Journal of Proteomics* 105 (juin): 5-18. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.01.007.

Arteaga, Lía Monsalve, Juan Luis Muñoz Bellido, María Carmen Vieira Lista, María Belén Vicente Santiago, Pedro Fernández Soto, Isabel Bas, Nuria Leralta, et al. 2020. « Crimean-Congo Haemorrhagic Fever (CCHF) Virus-Specific Antibody Detection in Blood Donors, Castile-León, Spain, Summer 2017 and 2018 ». *Eurosurveillance* 25 (10): 1900507. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.10.1900507.

Atif, Farhan Ahmad. 2015. « Anaplasma Marginale and Anaplasma Phagocytophilum: Rickettsiales Pathogens of Veterinary and Public Health Significance ». *Parasitology Research* 114 (11): 3941-57. https://doi.org/10.1007/s00436-015-4698-2.

Atlan, Anne, Nathalie Udo, Benjamin Hornoy, et Catherine Darrot. 2015. « Evolution of the uses of gorse in native and invaded regions : what are the impacts on its dynamics and management ? » *Revue d'Écologie (La Terre et La Vie)* 12 (1): 191-206. https://doi.org/10.3406/revec.2015.1829.

Aubineau, J. 2006. « Repeuplements de lapins de garenne : enseignements des suivis par radio-pistage ».

Aubry, P., et D. W. Geale. 2011. « A Review of Bovine Anaplasmosis ». *Transboundary and Emerging Diseases* 58 (1): 1-30. https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x.

Azagi, Tal, Eyal Klement, Gidon Perlman, Yaniv Lustig, Kosta Y. Mumcuoglu, Dmitry A. Apanaskevich, et Yuval Gottlieb. 2017. « Francisella-Like Endosymbionts and Rickettsia

Species in Local and Imported Hyalomma Ticks ». *Applied and Environmental Microbiology* 83 (18): e01302-17. https://doi.org/10.1128/AEM.01302-17.

Bah, Madiou Thierno, Vladimir Grosbois, Frédéric Stachurski, Facundo Muñoz, Maxime Duhayon, Ignace Rakotoarivony, Anaïs Appelgren, et al. 2022. « The Crimean-Congo haemorrhagic fever tick vector Hyalomma marginatum in the south of France: Modelling its distribution and determination of factors influencing its establishment in a newly invaded area ». *Transboundary and Emerging Diseases* 69 (5): e2351-65. https://doi.org/10.1111/tbed.14578.

Bailey, Sarah A. 2015. « An Overview of Thirty Years of Research on Ballast Water as a Vector for Aquatic Invasive Species to Freshwater and Marine Environments ». *Aquatic Ecosystem Health & Management* 18 (3): 261-68. https://doi.org/10.1080/14634988.2015.1027129.

Bakheit, M, A Latif, Z Vatansever, U Seitzer, et J Ahmed. 2012. « The Huge Risks Due to Hyalomma Ticks ». https://doi.org/10.1007/978-3-642-28842-5_8.

Baldridge, Gerald D., Nicole Y. Burkhardt, Jason A. Simser, Timothy J. Kurtti, et Ulrike G. Munderloh. 2004. « Sequence and Expression Analysis of the ompA Gene of Rickettsia Peacockii, an Endosymbiont of the Rocky Mountain Wood Tick, Dermacentor Andersoni ». *Applied and Environmental Microbiology* 70 (11): 6628-36. https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6628-6636.2004.

Baldridge, Gerald D., Glen. A. Scoles, Nicole Y. Burkhardt, Brian Schloeder, Timothy J. Kurtti, et Ulrike G. Munderloh. 2009. « Transovarial Transmission of Francisella-Like Endosymbionts and Anaplasma phagocytophilum Variants in Dermacentor albipictus (Acari: Ixodidae) ». *Journal of Medical Entomology* 46 (3): 625-32. https://doi.org/10.1603/033.046.0330.

Barker, Stephen C., et Alan R. Walker. 2014. « Ticks of Australia. The Species That Infest Domestic Animals and Humans ». *Zootaxa*, nº 3816 (juin): 1-144. https://doi.org/10.11646/zootaxa.3816.1.1.

Basilico, L, J.P Damien, J.M Roussel, N Poulet, J.M Paillisson, PNR DE BRIERE, INRA, CNRS, et ONEMA. 2013. « Les invasions d'écrevisses exotiques. Impacts écologiques et pistes pour la gestion ». 2013. https://www.documentation.eauetbiodiversite.fr/notice/00000000015dd1e74e239d7a07bf9228.

Baudart, Julia, et Nathalie Paniel. 2014. « Sources et devenir des micro-organismes pathogènes dans les environnements aquatiques ». *Revue Francophone Des Laboratoires* 2014 (459): 29-39. https://doi.org/10.1016/S1773-035X(14)72362-7.

Bean, B., B. M. Moore, B. Sterner, L. R. Peterson, D. N. Gerding, et H. H. Balfour. 1982. « Survival of Influenza Viruses on Environmental Surfaces ». *The Journal of Infectious Diseases* 146 (1): 47-51. https://doi.org/10.1093/infdis/146.1.47.

Beati, L., M. Meskini, B. Thiers, et D. Raoult. 1997. « Rickettsia Aeschlimannii Sp. Nov., a New Spotted Fever Group Rickettsia Associated with Hyalomma Marginatum Ticks ». *International Journal of Systematic Bacteriology* 47 (2): 548-54. https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-548.

Bente, Dennis A., Naomi L. Forrester, Douglas M. Watts, Alexander J. McAuley, Chris A. Whitehouse, et Mike Bray. 2013. « Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: History, Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Syndrome and Genetic Diversity ». *Antiviral Research* 100 (1): 159-89. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.07.006.

Bernard, Célia, Philippe Holzmuller, Madiou Thierno Bah, Matthieu Bastien, Benoit Combes, Ferran Jori, Vladimir Grosbois, et Laurence Vial. 2022. « Systematic Review on Crimean–Congo Hemorrhagic Fever Enzootic Cycle and Factors Favoring Virus Transmission: Special Focus on France, an Apparently Free-Disease Area in Europe ». *Frontiers in Veterinary Science* 9. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.932304.

Bernard, Jennifer. 2015. « Caractérisation de la compétence vectorielle des tiques Ornithodores pour le virus de la peste porcine africaine et étude de deux déterminants : la relation souche virale – vecteur et l'influence de la salive de tiques sur l'infection chez le porc domestique ».

Bernard, Jennifer, Evelyne Hutet, Frédéric Paboeuf, Tantely Randriamparany, Philippe Holzmuller, Renaud Lancelot, Valérie Rodrigues, Laurence Vial, et Marie-Frédérique Le Potier. 2016. « Effect of O. porcinus Tick Salivary Gland Extract on the African Swine Fever Virus Infection in Domestic Pig ». *PLoS ONE* 11 (2): e0147869. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147869.

Beyhan, Yunus Emre, Mesut Mungan, et Cahit Babur. 2016. « The Species of Ticks Bites on Human and Their Seasonal Distribution inAnkara, Turkey ». *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 63 (2): 115-19. https://doi.org/10.1501/Vetfak_0000002718.

Bhatt, Samir, Peter W. Gething, Oliver J. Brady, Jane P. Messina, Andrew W. Farlow, Catherine L. Moyes, John M. Drake, et al. 2013. « The Global Distribution and Burden of Dengue ». *Nature* 496 (7446): 504-7. https://doi.org/10.1038/nature12060.

Bolon, Pierrick. 2018. « LA FIEVRE HEMORRAGIQUE DE CRIMEE-CONGO : SITUATION EPIDEMIOLOGIQUE ACTUELLE ». VETAGRO SUP.

Boniface, V. 2020. « Programme de lutte contre l'Erismature rousse ». *Centre de ressources* (blog). 20 avril 2020. http://especes-exotiques-envahissantes.fr/programme-lutte-erismature-rousse/.

Bonnet, Sarah, Jean-Claude George, et Nathalie Boulanger. 2017. « 6. L'interface tique-hôte et la transmission des pathogènes ». In *Tiques et maladies à tiques : Biologie, écologie évolutive, épidémiologie*, édité par Karen D. McCoy, 165-91. Didactiques. Marseille: IRD Éditions. https://doi.org/10.4000/books.irdeditions.9045.

Bonnet, Sarah, Karine Huber, Guy Joncour, Magalie René-Martellet, Frédéric Stachurski, et Lionel Zenner. 2017. « 2. Biologie des tiques ». In *Tiques et maladies à tiques : Biologie, écologie évolutive, épidémiologie*, édité par Nathalie Boulanger et Karen D. McCoy, 53-84. Didactiques. Marseille: IRD Éditions. https://doi.org/10.4000/books.irdeditions.9020.

Bonnet, Sarah I., Stéphane Bertagnoli, Alessandra Falchi, Julie Figoni, Johanna Fite, Thierry Hoch, Elsa Quillery, et al. 2023. « An Update of Evidence for Pathogen Transmission by Ticks of the Genus Hyalomma ». *Pathogens* 12 (4): 513. https://doi.org/10.3390/pathogens12040513.

Bonnet, Sarah I., Gwenaël Vourc'h, Alice Raffetin, Alessandra Falchi, Julie Figoni, Johanna Fite, Thierry Hoch, Sara Moutailler, et Elsa Quillery. 2022. « The Control of Hyalomma Ticks, Vectors of the Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus: Where Are We Now and Where Are We Going? » *PLoS Neglected Tropical Diseases* 16 (11): e0010846. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010846.

Bouchaud, O., P.-H. Consigny, M. Cot, et S. Odermatt-Biays. 2009. « Fiches maladies ». *Médecine des voyages Médecine tropicale*, 91-239. https://doi.org/10.1016/B978-2-294-70867-1.00055-X.

Boulanger, Nathalie. 2018. « SURVEILLANCE DU VECTEUR DE LA BORRÉLIOSE DE LYME, IXODES RICINUS, EN ALSACE DE 2013 À 2016 / SURVEILLANCE OF THE TICK IXODES RICINUS, THE VECTOR OF LYME BORRELIOSIS IN ALSACE (FRANCE) FROM 2013 TO 2016 ».

Boulanger, Nathalie, et Karen D. McCoy, éd. 2017. *Tiques et maladies à tiques : Biologie, écologie évolutive, épidémiologie*. *Tiques et maladies à tiques : Biologie, écologie évolutive, épidémiologie*. Didactiques. Marseille: IRD Éditions. https://doi.org/10.4000/books.irdeditions.9001.

Bouquetin Pyrénées. 2016. « Contexte et historique de la réintroduction du Bouquetin ibérique ». Bouquetin Pyrénées. 8 janvier 2016. https://www.bouquetin-pyrenees.fr/historique-et-bilan.

Braña, Florentino. 1991. « SUMMER ACTIVITY PATTERNS AND THERMOREGULATION IN THE WALL LIZARD. PODARCIS MURALIS ».

Broeckling, Corey D., Emmy Hoyes, Keith Richardson, Jeffery M. Brown, et Jessica E. Prenni. 2018. « Comprehensive Tandem-Mass-Spectrometry Coverage of Complex Samples Enabled by Data-Set-Dependent Acquisition ». *Analytical Chemistry* 90 (13): 8020-27. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00929.

Brown, Vienna R., Ryan S. Miller, Sophie C. McKee, Karina H. Ernst, Nicole M. Didero, Rachel M. Maison, Meredith J. Grady, et Stephanie A. Shwiff. 2021. « Risks of Introduction and Economic Consequences Associated with African Swine Fever, Classical Swine Fever and Foot-and-Mouth Disease: A Review of the Literature ». *Transboundary and Emerging Diseases* 68 (4): 1910-65. https://doi.org/10.1111/tbed.13919.

Buck, Eugene. 2010. « Ballast Water Management to Combat Invasive Species ». *Congressional Research Service Reports*, janvier. https://digitalcommons.unl.edu/crsdocs/25.

Bull, J. J. 1994. « Virulence ». *Evolution* 48 (5): 1423-37. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1994.tb02185.x.

Burger, Thomas D., Renfu Shao, Marcelo B. Labruna, et Stephen C. Barker. 2014. « Molecular Phylogeny of Soft Ticks (Ixodida: Argasidae) Inferred from Mitochondrial Genome and Nuclear rRNA Sequences ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 5 (2): 195-207. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.10.009.

Buysse, Marie, Anna Maria Floriano, Yuval Gottlieb, Tiago Nardi, Francesco Comandatore, Emanuela Olivieri, Alessia Giannetto, et al. 2021. « A dual endosymbiosis supports

nutritional adaptation to hematophagy in the invasive tick Hyalomma marginatum ». Édité par Bruno Lemaître, Patricia J Wittkopp, Bruno Lemaître, Sukanya Narasimhan, et Alejandro Manzano-Marin. *eLife* 10 (décembre): e72747. https://doi.org/10.7554/eLife.72747.

Camicas, J. L., J. P. Cornet, J. P. Gonzalez, M. L. Wilson, F. Adam, et H. G. Zeller. 1994. « [Crimean-Congo hemorrhagic fever in Senegal. Latest data on the ecology of the CCHF virus] ». *Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique (1990)* 87 (1): 11-16.

Cann, Alan J. 2016. « Chapter 7 - Pathogenesis ». In *Principles of Molecular Virology (Sixth Edition)*, édité par Alan J. Cann, 221-59. Boston: Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801946-7.00007-9.

Carrera-Faja, Laura, Jesús Cardells, Lola Pailler-García, Víctor Lizana, Gemma Alfaro-Deval, Johan Espunyes, Sebastian Napp, et Oscar Cabezón. 2022. « Evidence of Prolonged Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Endemicity by Retrospective Serosurvey, Eastern Spain ». *Emerging Infectious Diseases* 28 (5): 1031-34. https://doi.org/10.3201/eid2805.212335.

Carvalho, Izabelle T. S., Andréia L. T. Melo, Leodil C. Freitas, Rodolfo V. Verçoza, Alvair S. Alves, Jackeliny S. Costa, Cristiane S. Chitarra, et al. 2016. « Minimum Infection Rate of Ehrlichia Minasensis in Rhipicephalus Microplus and Amblyomma Sculptum Ticks in Brazil ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 7 (5): 849-52. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.04.004.

Casals, Jordi. 1969. « Antigenic Similarity between the Virus Causing Crimean Hemorrhagic Fever and Congo Virus ». *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 131 (1): 233-36. https://doi.org/10.3181/00379727-131-33847.

CDR EEE. 2016. « Salvinia molesta ». *Centre de ressources* (blog). 2016. http://especes-exotiques-envahissantes.fr/espece/salvinia-molesta/.

CDR EEE. 2018. « Ambrosia artemisiifolia ». *Base d'information sur les invasions biologiques en milieux aquatiques. Centre de ressources Espèces exotiques envahissantes. UICN France et Office français de la biodiversité.* (blog). 2018. http://especes-exotiques-envahissantes.fr/espece/ambrosia-artemisiifolia/.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1995. « Update: Management of Patients with Suspected Viral Hemorrhagic Fever--United States ». *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 44 (25): 475-79.

Chabrerie, Olivier, François Massol, Benoit Facon, Romain Thevenoux, Manon Hess, Romain Ulmer, Jelena H Pantel, et al. 2019. « Biological Invasion Theories: Merging Perspectives from Population, Community and Ecosystem Scales ». Preprint. BIOLOGY. https://doi.org/10.20944/preprints201910.0327.v1.

Chapman, L. E., M. L. Wilson, D. B. Hall, B. LeGuenno, E. A. Dykstra, K. Ba, et S. P. Fisher-Hoch. 1991. « Risk Factors for Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Rural Northern Senegal ». *The Journal of Infectious Diseases* 164 (4): 686-92. https://doi.org/10.1093/infdis/164.4.686.

Chen, Ze, Xiaojun Yang, Fengju Bu, Xiaohong Yang, et Jingze Liu. 2012. « Morphological, Biological and Molecular Characteristics of Bisexual and Parthenogenetic Haemaphysalis

Longicornis ». *Veterinary Parasitology* 189 (2-4): 344-52. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.04.021.

Chiu, Nan-Chang, Hsin Chi, Yu-Lin Tai, Chun-Chih Peng, Cheng-Yin Tseng, Chung-Chu Chen, Boon Fatt Tan, et Chien-Yu Lin. 2020. « Impact of Wearing Masks, Hand Hygiene, and Social Distancing on Influenza, Enterovirus, and All-Cause Pneumonia During the Coronavirus Pandemic: Retrospective National Epidemiological Surveillance Study ». *Journal of Medical Internet Research* 22 (8): e21257. https://doi.org/10.2196/21257.

Chown, Steven L, Sarette Slabber, Melodie A McGeoch, Charlene Janion, et Hans Petter Leinaas. 2007. « Phenotypic plasticity mediates climate change responses among invasive and indigenous arthropods ». *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274 (1625): 2531-37. https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0772.

Chumakov, M. P. 1945. « A new tick-borne virus disease—Crimean hemorrhagic fever ». *Crimean hemorrhagic fever*, 13-43.

Chumakov. 1974. « A Translation of "Crimean Hemorrhagic Fever": Papers from the Third Regional Workshop at Rostov-on-Don in May 1970 ». In *A Translation of "Crimean Hemorrhagic Fever": Papers from the Third Regional Workshop at Rostov-on-Don in May 1970*, 9:125. Entomological Society of America. https://doi.org/10.4182/KGVP3013.9-3.125.

Chumakov, M. P., A. M. Butenko, N. V. Shalunova, L. I. Mart'ianova, S. E. Smirnova, Iu N. Bashkirtsev, T. I. Zavodova, et al. 1968. « [New data on the viral agent of Crimean hemorrhagic fever] ». *Voprosy Virusologii* 13 (3): 377.

Chumakov, M. P., S. E. Smirnova, et E. A. Tkachenko. 1969. « Antigenic relationships between the Soviet strains of Crimean hemorrhagic fever virus and the Afro-Asian Congo virus strains ». *Mater* 16: 152-54.

Cicculli, V., L. Capai, Y. Quilichini, S. Masse, A. Fernández-Alvarez, L. Minodier, P. Bompard, R. Charrel, et A. Falchi. 2019. « Molecular Investigation of Tick-Borne Pathogens in Ixodid Ticks Infesting Domestic Animals (Cattle and Sheep) and Small Rodents (Black Rats) of Corsica, France ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 10 (3): 606-13. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.02.007.

Cicculli, Vincent, Nazli Ayhan, Léa Luciani, Laura Pezzi, Apolline Maitre, Dorine Decarreaux, Xavier de Lamballerie, et al. 2022. « Molecular detection of parapoxvirus in Ixodidae ticks collected from cattle in Corsica, France ». *Veterinary Medicine and Science* 8 (2): 907-16. https://doi.org/10.1002/vms3.700.

Cicculli, Vincent, Apolline Maitre, Nazli Ayhan, Stevan Mondoloni, Jean-Christophe Paoli, Laurence Vial, Xavier N. de Lamballerie, Remi Charrel, et Alessandra Falchi. 2022. « Lack of Evidence for Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Ticks Collected from Animals, Corsica, France ». *Emerging Infectious Diseases* 28 (5): 1035-38. https://doi.org/10.3201/eid2805.211996.

Cicculli, Vincent, Shirley Masse, Lisandru Capai, Xavier de Lamballerie, Remi Charrel, et Alessandra Falchi. 2019. « First detection of Ehrlichia minasensis in Hyalomma marginatum

ticks collected from cattle in Corsica, France ». *Veterinary Medicine and Science* 5 (2): 243-48. https://doi.org/10.1002/vms3.140.

Cikman, Aytekin, Merve Aydin, Baris Gulhan, Faruk Karakecili, Ozan Arif Kesik, Adalet Ozcicek, Hicran Akin, et Murat Kara. 2016. « Seroprevalence of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Erzincan Province, Turkey, Relationship with Geographic Features and Risk Factors ». *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 16 (3): 199-204. https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1879.

Colwell, Douglas D., Filipe Dantas-Torres, et Domenico Otranto. 2011. « Vector-Borne Parasitic Zoonoses: Emerging Scenarios and New Perspectives ». *Veterinary Parasitology* 182 (1): 14-21. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.012.

Cosson, Jean-François. 2019. « Écologie de la maladie de Lyme ». *Santé Publique* S1 (HS1): 73-87. https://doi.org/10.3917/spub.190.0073.

Cosson, Jean-François, Lorraine Michelet, Julien Chotte, Evelyne Le Naour, Martine Cote, Elodie Devillers, Marie-Lazarine Poulle, et al. 2014. « Genetic Characterization of the Human Relapsing Fever Spirochete Borrelia Miyamotoi in Vectors and Animal Reservoirs of Lyme Disease Spirochetes in France ». *Parasites & Vectors* 7 (1): 233. https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-233.

Cruz, Alejandro Cabezas, Erich Zweygarth, Mucio Flavio Barbosa Ribeiro, Julia Angelica Gonçalves da Silveira, Jose de la Fuente, Libor Grubhoffer, James J. Valdés, et Lygia Maria Friche Passos. 2012. « New species of Ehrlichia isolated from Rhipicephalus (Boophilus) microplus shows an ortholog of the E. canis major immunogenic glycoprotein gp36 with a new sequence of tandem repeats ». *Parasites & Vectors* 5 (1): 291. https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-291.

Dagenais, Amy, Carlos Villalba-Guerrero, et Martin Olivier. 2023. « Trained Immunity: A “New” Weapon in the Fight against Infectious Diseases ». *Frontiers in Immunology* 14: 1147476. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1147476.

Dahmani, Mustapha, Bernard Davoust, Frédéric Rousseau, Didier Raoult, Florence Fenollar, et Oleg Mediannikov. 2017. « Natural Anaplasmataceae Infection in Rhipicephalus Bursa Ticks Collected from Sheep in the French Basque Country ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 8 (1): 18-24. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.09.009.

Dantas-Torres, Filipe. 2010. « Biology and ecology of the brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus ». *Parasites & Vectors* 3 (1): 26. https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-26.

David, Shoba, et Asha Mary Abraham. 2016. « Epidemiological and Clinical Aspects on West Nile Virus, a Globally Emerging Pathogen ». *Infectious Diseases (London, England)* 48 (8): 571-86. https://doi.org/10.3109/23744235.2016.1164890.

Demir, Samiye, Sedef Erkunt Alak, Ahmet Efe Köseoğlu, Cemal Ün, Muhammed Nalçacı, et Hüseyin Can. 2020. « Molecular Investigation of Rickettsia Spp. and Francisella Tularensis in Ticks from Three Provinces of Turkey ». *Experimental & Applied Acarology* 81 (2): 239-53. https://doi.org/10.1007/s10493-020-00498-y.

Desenclos, J.-C. 2005. « [Surveillance of infectious diseases: principles and organisation in France in 2005] ». *Medecine Et Maladies Infectieuses* 35 (5): 232-44. https://doi.org/10.1016/j.medmal.2005.02.007.

Desenclos. 2008. « La transmission aérienne des agents infectieux ». *Medecine et Maladies Infectieuses* 38 (8): 449-51. https://doi.org/10.1016/j.medmal.2008.06.015.

Dickson, D. L., et M. J. Turell. 1992. « Replication and Tissue Tropisms of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Experimentally Infected Adult Hyalomma Truncatum (Acari: Ixodidae) ». *Journal of Medical Entomology* 29 (5): 767-73. https://doi.org/10.1093/jmedent/29.5.767.

Doganci, Levent. 2007. « New Insights on the Bleeding Disorders in CCHF ». *The Journal of Infection* 55 (4): 379-81. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2007.05.179.

Domènech, Roser, et Montserrat Vilà. 2008. « Cortaderia Selloana Seed Germination under Different Ecological Conditions ». *Acta Oecologica* 33 (1): 93-96. https://doi.org/10.1016/j.actao.2007.09.004.

Dreshaj, Shemsedin, Sali Ahmeti, Naser Ramadani, Gresa Dreshaj, Isme Humolli, et Isuf Dedushaj. 2016. « Current Situation of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Southeastern Europe and Neighboring Countries: A Public Health Risk for the European Union? » *Travel Medicine and Infectious Disease* 14 (2): 81-91. https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2016.03.012.

Duguid, J. P. 1946. « The size and the duration of air-carriage of respiratory droplets and droplet-nuclei ». *The Journal of Hygiene* 44 (6): 471-79.

Dupeyron, C. 2018. « Développement et Santé | Modalités de transmission des infections ». 2018. https://devsante.org/articles/modalites-de-transmission-des-infections.

Duran, A, A Küçükbayrak, T Ocak, Ni Hakyemez, T Taþ, M Karadað, et Zf Mengeloðlu. 2013. « Evaluation of Patients with Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Bolu, Turkey ». *African Health Sciences* 13 (2): 233-42. https://doi.org/10.4314/ahs.v13i2.5.

Duron, Olivier, Olivier Morel, Valérie Noël, Marie Buysse, Florian Binetruy, Renaud Lancelot, Etienne Loire, et al. 2018. « Tick-Bacteria Mutualism Depends on B Vitamin Synthesis Pathways ». *Current Biology* 28 (12): 1896-1902.e5. https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.04.038.

Duscher, Georg Gerhard, Adnan Hodžić, Peter Hufnagl, Walpurga Wille-Piazzai, Anna-Magarita Schötta, Mateusz Andrzej Markowicz, Agustín Estrada-Peña, Gerold Stanek, et Franz Allerberger. 2018. « Adult Hyalomma Marginatum Tick Positive for Rickettsia Aeschlimannii in Austria, October 2018 ». *Eurosurveillance* 23 (48): 1800595. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.48.1800595.

Dutartre, A. 2019. « Une base d'information de l'UICN sur les EEE règlementées par l'UE ». *Centre de ressources* (blog). 18 juin 2019. http://especes-exotiques-envahissantes.fr/une-base-dinformation-de-luicn-sur-les-eee-reglementees-par-lue/.

Dutrieux. 2017. « Surveillance et voies d'introduction et de propagation des EEE : exemples de pratiques en Europe et préconisations ».

Duvallet, Gérard, Nathalie Boulanger, et Vincent Robert. 2018. « Chapter 2 - Arthropods: Definition and Medical Importance ». In *Skin and Arthropod Vectors*, édité par Nathalie Boulanger, 29-54. Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811436-0.00002-2.

ECDC. 2017. « Hyalomma marginatum - Fiche d'information pour les experts ». 17 juin 2017. https://www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/tick-factsheets/hyalomma-marginatum.

Edouard, Sophie, Christelle Koebel, François Goehringer, Cristina Socolovschi, Benoit Jaulhac, Didier Raoult, et Philippe Brouqui. 2012. « Emergence of Human Granulocytic Anaplasmosis in France ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 3 (5): 403-5. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.10.002.

Ehret, P, B Hostachy, R Bordeau, et A Blin. 2016. « Cultures tropicales dans les DROM ».

EID. 2019. « Surveillance du moustique Aedes albopictus en France métropolitaine ».

Elhachimi, Latifa, Carolien Rogiers, Stijn Casaert, Siham Fellahi, Thomas Van Leeuwen, Wannes Dermauw, Félix Valcárcel, et al. 2021. « Ticks and Tick-Borne Pathogens Abound in the Cattle Population of the Rabat-Sale Kenitra Region, Morocco ». *Pathogens (Basel, Switzerland)* 10 (12): 1594. https://doi.org/10.3390/pathogens10121594.

Ergonul, O., A. Celikbas, N. Baykam, S. Eren, et B. Dokuzoguz. 2006. « Analysis of Risk-Factors among Patients with Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Virus Infection: Severity Criteria Revisited ». *Clinical Microbiology and Infection* 12 (6): 551-54. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01445.x.

Ergönül, Önder. 2006. « Crimean-Congo haemorrhagic fever ». *The Lancet. Infectious Diseases* 6 (4): 203-14. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70435-2.

Ergonul, Onder. 2008. « Treatment of Crimean-Congo hemorrhagic fever ». *Antiviral Research*, Special Issue: Treatment of highly pathogenic RNA viral infections, 78 (1): 125-31. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.11.002.

Ergonul, Onder, et Chris A. Whitehouse. 2007. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: A Global Perspective*. 1er édition. Berlin: Springer-Verlag New York Inc.

Espunyes, Johan, Oscar Cabezón, Lola Pailler-García, Andrea Dias-Alves, Lourdes Lobato-Bailón, Ignasi Marco, Maria P. Ribas, Pedro E. Encinosa-Guzmán, Marta Valldeperes, et Sebastian Napp. 2021. « Hotspot of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Seropositivity in Wildlife, Northeastern Spain ». *Emerging Infectious Diseases* 27 (9): 2480-84. https://doi.org/10.3201/eid2709.211105.

Estrada-Peña, A. 2015. « Ticks as Vectors: Taxonomy, Biology and Ecology ». *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)* 34 (1): 53-65. https://doi.org/10.20506/rst.34.1.2345.

Estrada-Peña, Agustín. 2023. « The climate niche of the invasive tick species Hyalomma marginatum and Hyalomma rufipes (Ixodidae) with recommendations for modeling exercises ». *Experimental & Applied Acarology* 89 (2): 231-50. https://doi.org/10.1007/s10493-023-00778-3.

Estrada-Peña, Agustín, Lisa Jameson, Jolyon Medlock, Zati Vatansever, et Farida Tishkova. 2012. « Unraveling the Ecological Complexities of Tick-Associated Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Transmission: A Gap Analysis for the Western Palearctic ». *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 12 (9): 743-52. https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0767.

Estrada-Peña, Agustín, Ana M. Palomar, Paula Santibáñez, Nely Sánchez, Miguel A. Habela, Aránzazu Portillo, Lourdes Romero, et José A. Oteo. 2012. « Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Ticks, Southwestern Europe, 2010 ». *Emerging Infectious Diseases* 18 (1): 179-80. https://doi.org/10.3201/eid1801.111040.

Fahrig, Lenore, et Gray Merriam. 1994. « Conservation of Fragmented Populations ». *Conservation Biology* 8 (1): 50-59. https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1994.08010050.x.

Faye, O., J. P. Cornet, J. L. Camicas, D. Fontenille, et J. P. Gonzalez. 1999. « Transmission expérimentale du virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo : place de trois espèces vectrices dans les cycles de maintenance et de transmission au Sénégal ». *Parasite* 6 (1): 27-32. https://doi.org/10.1051/parasite/1999061027.

Fernández-Ruiz, Natalia, et Agustín Estrada-Peña. 2021. « Towards New Horizons: Climate Trends in Europe Increase the Environmental Suitability for Permanent Populations of Hyalomma Marginatum (Ixodidae) ». *Pathogens (Basel, Switzerland)* 10 (2): 95. https://doi.org/10.3390/pathogens10020095.

Fine, Paul, Ken Eames, et David L. Heymann. 2011. « “Herd Immunity”: A Rough Guide ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 52 (7): 911-16. https://doi.org/10.1093/cid/cir007.

Flusin, O., F. Iseni, R. Rodrigues, G. Paranhos-Baccalà, J. M. Crance, P. Marianneau, M. Bouloy, et C. N. Peyrefitte. 2010. « [Crimean-Congo hemorrhagic fever: basics for general practitioners] ». *Medecine Tropicale: Revue Du Corps De Sante Colonial* 70 (5-6): 429-38.

Földes, Fanni, Mónika Madai, Viktória Németh, Brigitta Zana, Henrietta Papp, Gábor Kemenesi, Ildikó Bock-Marquette, Győző Horváth, Róbert Herczeg, et Ferenc Jakab. 2019. « Serologic Survey of the Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Virus Infection among Wild Rodents in Hungary ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 10 (6): 101258. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.07.002.

Fontenille, Didier, Christophe Lagneau, Sylvie Lecollinet, Régine Lefait Robin, Michel Setbon, Bernard Tirel, et André Yébakima, éd. 2013. « Modes de transmission des agents infectieux / La dynamique de la maladie versus celle de l’infectiosité ». In *La lutte antivectorielle en France*, 4-7. Expertise collégiale. Marseille: IRD Éditions. http://books.openedition.org/irdeditions/1303.

Formosinho, P., et M. M. Santos-Silva. 2006. « Experimental Infection of Hyalomma Marginatum Ticks with West Nile Virus ». *Acta Virologica* 50 (3): 175-80.

Frisch, J. E. 1999. « Towards a Permanent Solution for Controlling Cattle Ticks ». *International Journal for Parasitology* 29 (1): 57-71; discussion 73-75. https://doi.org/10.1016/s0020-7519(98)00177-5.

Frisch, J. E., et C. J. O'Neill. 1998. « Comparative Evaluation of Beef Cattle Breeds of African, European and Indian Origins. 2. Resistance to Cattle Ticks and Gastrointestinal Nematodes ». *Animal Science* 67 (1): 39-48. https://doi.org/10.1017/S1357729800009772.

Fuente, Jose de la, Agustin Estrada-Pena, Jose M. Venzal, Katherine M. Kocan, et Daniel E. Sonenshine. 2008. « Overview: Ticks as Vectors of Pathogens That Cause Disease in Humans and Animals ». *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 13 (mai): 6938-46. https://doi.org/10.2741/3200.

Gajadhar, Alvin A., Vladislav Lobanov, W. Brad Scandrett, John Campbell, et Batol Al-Adhami. 2010. « A Novel Ehrlichia Genotype Detected in Naturally Infected Cattle in North America ». *Veterinary Parasitology* 173 (3): 324-29. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.034.

Ganyo, Ebenezer Yaw, Johnson N Boampong, Daniel K Masiga, Jandouwe Villinger, et Paa Kobina Turkson. 2018. « Haematology of N'Dama and West African Shorthorn cattle herds under natural Trypanosoma vivax challenge in Ghana ». *F1000Research* 7 (août): 314. https://doi.org/10.12688/f1000research.14032.2.

Garcia-Vozmediano, Aitor, Giorgia Giglio, Elisa Ramassa, Fabrizio Nobili, Luca Rossi, et Laura Tomassone. 2020. « Dermacentor Marginatus and Dermacentor Reticulatus, and Their Infection by SFG Rickettsiae and Francisella-Like Endosymbionts, in Mountain and Periurban Habitats of Northwestern Italy ». *Veterinary Sciences* 7 (4): 157. https://doi.org/10.3390/vetsci7040157.

Gargili, Aysen, Agustin Estrada-Peña, Jessica R. Spengler, Alexander Lukashev, Patricia A. Nuttall, et Dennis A. Bente. 2017. « The Role of Ticks in the Maintenance and Transmission of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus: A Review of Published Field and Laboratory Studies ». *Antiviral Research* 144 (août): 93-119. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.05.010.

Garner, J. S. 1996. « Guideline for Isolation Precautions in Hospitals. The Hospital Infection Control Practices Advisory Committee ». *Infection Control and Hospital Epidemiology* 17 (1): 53-80. https://doi.org/10.1086/647190.

Garnier, Alexandre. 2021. « Conservation of ibex species (capra ibex et capra pyrenaica) en France: contribution of monitoring data from reintroduced and settled population ».

Garrison, Aura R., Darci R. Smith, et Joseph W. Golden. 2019. « Animal Models for Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Human Disease ». *Viruses* 11 (7): 590. https://doi.org/10.3390/v11070590.

Garrison, R. 2020. « ICTV Virus Taxonomy Profile: Nairoviridae », Journal of General Virology, .

Gergova, Ivanka, et Bozhin Kamarinchev. 2014. « Seroprevalence of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Southeastern Bulgaria ». *Japanese Journal of Infectious Diseases* 67 (5): 397-98. https://doi.org/10.7883/yoken.67.397.

Germanakis, Antonis, Dimosthenis Chochlakis, Emmanouil Angelakis, Yannis Tselentis, et Anna Psaroulaki. 2013. « Rickettsia Aeschlimannii Infection in a Man, Greece ». *Emerging Infectious Diseases* 19 (7): 1176-77. https://doi.org/10.3201/eid1907.130232.

Gilot, B. 1983. « RÉPARTITION ET ÉCOLOGIE DE DERMACENTOR MARGINA TUS (SULZER, 1776) (IXODOIDEA) DANS LES ALPES FRANÇAISES ET LEUR AVANT-PAYS ».

Gondard, Mathilde, Lorraine Michelet, Athinna Nisavanh, Elodie Devillers, Sabine Delannoy, Patrick Fach, Anna Aspan, et al. 2018. « Prevalence of tick-borne viruses in Ixodes ricinus assessed by high-throughput real-time PCR ». *Pathogens and Disease* 76 (8): fty083. https://doi.org/10.1093/femspd/fty083.

Gonzalez, J. P, J. P Cornet, M. L Wilson, et J. L Camicas. 1991. « Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Virus Replication in Adult Hyalomma Truncatum and Amblyomma Variegatum Ticks ». *Research in Virology* 142 (6): 483-88. https://doi.org/10.1016/0923-2516(91)90071-A.

Gonzalez, J.P., J.L. Camicas, J.P. Cornet, O. Faye, et M.L. Wilson. 1992. « Sexual and Transovarian Transmission of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Virus in Hyalomma Truncatum Ticks ». *Research in Virology* 143 (janvier): 23-28. https://doi.org/10.1016/S0923-2516(06)80073-7.

González-Redondo, Pedro, et Rosario Sánchez-Martínez. 2014. « Characterisation of Wild Rabbit Commercial Game Farms in Spain ». *World Rabbit Science* 22 (1): 51-58. https://doi.org/10.4995/wrs.2014.1213.

Gordon, SW, KJ Linthicum, et JR Moulton. 1993. « Transmission of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Two Species of Hyalomma Ticks from Infected Adults to Cofeeding Immature Forms ». Am.J.Trop.Med.Hyg. https://apps.dtic.mil/sti/citations/ADA267112.

Gouveia, Duarte, Olivier Pible, Karen Culotta, Virginie Jouffret, Olivier Geffard, Arnaud Chaumot, Davide Degli-Esposti, et Jean Armengaud. 2020. « Combining Proteogenomics and Metaproteomics for Deep Taxonomic and Functional Characterization of Microbiomes from a Non-Sequenced Host ». *NPJ Biofilms and Microbiomes* 6 (1): 23. https://doi.org/10.1038/s41522-020-0133-2.

Gray, J. S. 1991. « The Development and Seasonal Activity of the Tick Ixodes Ricinus: A Vector of Lyme Borreliosis. » *Review of Medical and Veterinary Entomology* 79 (6): 323-33.

Grech-Angelini, Sébastien, Renaud Lancelot, Olivier Ferraris, Christophe Nicolas Peyrefitte, Nathalie Vachiery, Aurélie Pédarrieu, Armelle Peyraud, et al. 2020. « Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Antibodies among Livestock on Corsica, France, 2014–2016 ». *Emerging Infectious Diseases* 26 (5): 1041-44. https://doi.org/10.3201/eid2605.191465.

Grech-Angelini, Sébastien, Frédéric Stachurski, Renaud Lancelot, Jérôme Boissier, Jean-François Allienne, Sylvain Marco, Oscar Maestrini, et Gerrit Uilenberg. 2016. « Ticks (Acari: Ixodidae) Infesting Cattle and Some Other Domestic and Wild Hosts on the French Mediterranean Island of Corsica ». *Parasites & Vectors* 9 (1): 582. https://doi.org/10.1186/s13071-016-1876-8.

Grech-Angelini, Sébastien, Frédéric Stachurski, Muriel Vayssier-Taussat, Elodie Devillers, François Casabianca, Renaud Lancelot, Gerrit Uilenberg, et Sara Moutailler. 2020. « Tick-Borne Pathogens in Ticks (Acari: Ixodidae) Collected from Various Domestic and Wild Hosts in Corsica (France), a Mediterranean Island Environment ». *Transboundary and Emerging Diseases*. https://doi.org/10.1111/tbed.13393.

GT IBMA. 2016a. « Reynoutria japonica ». *Base d'information sur les invasions biologiques en milieux aquatiques. Groupe de travail national Invasions biologiques en milieux aquatiques. UICN France et Onema.* (blog). 2016. http://especes-exotiques-envahissantes.fr/espece/reynoutria-japonica/.

GT IBMA. 2016b. « Spartina alterniflora ». *Base d'information sur les invasions biologiques en milieux aquatiques. Groupe de travail national Invasions biologiques en milieux aquatiques. UICN France et Onema.* (blog). 2016. http://especes-exotiques-envahissantes.fr/espece/spartina-alterniflora/.

Guglielmone, Alberto A., et Santiago Nava. 2014. « Names for Ixodidae (Acari: Ixodoidea): Valid, Synonyms, Incertae Sedis, Nomina Dubia, Nomina Nuda, Lapsus, Incorrect and Suppressed Names--with Notes on Confusions and Misidentifications ». *Zootaxa* 3767 (février): 1-256. https://doi.org/10.11646/zootaxa.3767.1.1.

Guglielmone, Alberto A., Richard G. Robbins, Dmitry A. Apanaskevich, Trevor N. Petney, Agustín Estrada-Peña, Ivan G. Horak, Renfu Shao, et Stephen C. Barker. 2010. « The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the World: A List of Valid Species Names</Strong> ». *Zootaxa* 2528 (1): 1-28. https://doi.org/10.11646/zootaxa.2528.1.1.

Guglielmone, Alberto Alejandro, Richard G. Robbins, Dmitry A. Apanaskevich, Trevor N. Petney, Agustín Estrada Peña, Ivan G. Horak, Renfu Shao, et Stephen C. Barker. 2010. « The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the World: A List of Valid Species Names », juillet. https://doi.org/10.11646/zootaxa.2528.1.1.

Hailemariam, Zerihun, Jürgen Krücken, Maximilian Baumann, Jabbar S. Ahmed, Peter-Henning Clausen, et Ard M. Nijhof. 2017. « Molecular Detection of Tick-Borne Pathogens in Cattle from Southwestern Ethiopia ». *PLOS ONE* 12 (11): e0188248. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188248.

Hall, C. B. 1983. « The Nosocomial Spread of Respiratory Syncytial Viral Infections ». *Annual Review of Medicine* 34: 311-19. https://doi.org/10.1146/annurev.me.34.020183.001523.

Harrison, Susan, et Emilio Bruna. 1999. « Habitat Fragmentation and Large-Scale Conservation: What Do We Know for Sure? » *Ecography* 22 (3): 225-32. https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.1999.tb00496.x.

Hawman, David W., et Heinz Feldmann. 2023. « Crimean–Congo Haemorrhagic Fever Virus ». *Nature Reviews Microbiology* 21 (7): 463-77. https://doi.org/10.1038/s41579-023-00871-9.

Hawman, David W., Kimberly Meade-White, Elaine Haddock, Rumi Habib, Dana Scott, Tina Thomas, Rebecca Rosenke, et Heinz Feldmann. 2019. « Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Mouse Model Recapitulating Human Convalescence ». *Journal of Virology* 93 (18): 10.1128/jvi.00554-19. https://doi.org/10.1128/jvi.00554-19.

Higa, Yukiko. 2011. « Dengue Vectors and their Spatial Distribution ». *Tropical Medicine and Health* 39 (4SUPPLEMENT): S17-27. https://doi.org/10.2149/tmh.2011-S04.

Hillion, Sophie, Marina I. Arleevskaya, Patrick Blanco, Anne Bordron, Wesley H. Brooks, Jean Yves Cesbron, Srini Kaveri, Eric Vivier, et Yves Renaudineau. 2020. « The Innate Part of the Adaptive Immune System ». *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 58 (2): 151-54. https://doi.org/10.1007/s12016-019-08740-1.

Hoffman, Tove, Mats Lindeborg, Christos Barboutis, Kiraz Erciyas-Yavuz, Magnus Evander, Thord Fransson, Jordi Figuerola, et al. 2018. « Alkhurma Hemorrhagic Fever Virus RNA in Hyalomma rufipes Ticks Infesting Migratory Birds, Europe and Asia Minor ». *Emerging Infectious Diseases* 24 (5): 879-82. https://doi.org/10.3201/eid2405.171369.

Holzmuller, Philippe, Philippe Nirdé, Frédéric Vezilier, et Paul Chuchana. 2016. « The Transcriptomic Analytical Level Determines the Human Monocyte-Derived Macrophage Response toward Either the Infectious Agent or the Host ». *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 45 (novembre): 426-33. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.10.002.

Hoogstraal, Harry. 1979. « Review Article1: The Epidemiology of Tick-Borne Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Asia, Europe, and Africa23 ». *Journal of Medical Entomology* 15 (4): 307-417. https://doi.org/10.1093/jmedent/15.4.307.

Horton, Katherine C., Nermeen T. Fahmy, Noha Watany, Alia Zayed, Abro Mohamed, Ammar Abdo Ahmed, Pierre E. Rollin, et Erica L. Dueger. 2016. « Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus and Alkhurma (Alkhumra) Virus in Ticks in Djibouti ». *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 16 (10): 680-82. https://doi.org/10.1089/vbz.2016.1951.

Hulme, Philip E. 2009. « Trade, Transport and Trouble: Managing Invasive Species Pathways in an Era of Globalization ». *Journal of Applied Ecology* 46 (1): 10-18. https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2008.01600.x.

Hussain, Sabir, Nighat Perveen, Abrar Hussain, Baolin Song, Muhammad Umair Aziz, Jehan Zeb, Jun Li, David George, Alejandro Cabezas-Cruz, et Olivier Sparagano. 2022. « The Symbiotic Continuum Within Ticks: Opportunities for Disease Control ». *Frontiers in Microbiology* 13. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.854803.

Hutchinson, GE. 1957. « Conluding remarks ».

Ibañez-Justicia, A., A. Gloria-Soria, W. den Hartog, M. Dik, F. Jacobs, et A. Stroo. 2017. « The First Detected Airline Introductions of Yellow Fever Mosquitoes (Aedes Aegypti) to Europe, at

Schiphol International Airport, the Netherlands ». *Parasites & Vectors* 10 (1): 603. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2555-0.

Ibáñez-Justicia, Adolfo, Nathalie Smitz, Wietse den Hartog, Bart van de Vossenberg, Katrien De Wolf, Isra Deblauwe, Wim Van Bortel, et al. 2020. « Detection of Exotic Mosquito Species (Diptera: Culicidae) at International Airports in Europe ». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17 (10): 3450. https://doi.org/10.3390/ijerph17103450.

Ikegami, Tetsuro, et Shinji Makino. 2011. « The Pathogenesis of Rift Valley Fever ». *Viruses* 3 (5): 493-519. https://doi.org/10.3390/v3050493.

Inserm. 2017. « Dengue · Inserm, La science pour la santé ». Inserm. 2017. https://www.inserm.fr/dossier/dengue/.

Iweriebor, Benson C., Elia J. Mmbaga, Abiodun Adegborioye, Aboi Igwaran, Larry C. Obi, et Anthony I. Okoh. 2017. « Genetic profiling for Anaplasma and Ehrlichia species in ticks collected in the Eastern Cape Province of South Africa ». *BMC Microbiology* 17 (1): 45. https://doi.org/10.1186/s12866-017-0955-0.

Jameson, Lisa J., Peter J. Morgan, Jolyon M. Medlock, George Watola, et Alexander G.C. Vaux. 2012. « Importation of Hyalomma Marginatum, Vector of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Virus, into the United Kingdom by Migratory Birds ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 3 (2): 95-99. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2011.12.002.

Jones, L. D., C. R. Davies, G. M. Steele, et P. A. Nuttall. 1987. « A Novel Mode of Arbovirus Transmission Involving a Nonviremic Host ». *Science (New York, N.Y.)* 237 (4816): 775-77. https://doi.org/10.1126/science.3616608.

Jones, L. D., E. Hodgson, T. Williams, S. Higgs, et P. A. Nuttall. 1992. « Saliva Activated Transmission (SAT) of Thogoto Virus: Relationship with Vector Potential of Different Haematophagous Arthropods ». *Medical and Veterinary Entomology* 6 (3): 261-65. https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1992.tb00616.x.

Jongejan, F., et G. Uilenberg. 2004. « The Global Importance of Ticks ». *Parasitology* 129 Suppl: S3-14. https://doi.org/10.1017/s0031182004005967.

Josseran, Loïc, Christophe Paquet, Abdelkrim Zehgnoun, Nadège Caillere, Alain Le Tertre, Jean-Louis Solet, et Martine Ledrans. 2006. « Chikungunya Disease Outbreak, Reunion Island ». *Emerging Infectious Diseases* 12 (12): 1994-95. https://doi.org/10.3201/eid1212.060710.

Jourdain, E., Y. Toussaint, A. Leblond, D.j. Bicout, P. Sabatier, et M. Gauthier-Clerc. 2007. « Bird Species Potentially Involved in Introduction, Amplification, And Spread of West Nile Virus in A Mediterranean Wetland, The Camargue (Southern France) ». *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 7 (1): 15-33. https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0543.

Kampen, Helge, Wolfgang Poltz, Kathrin Hartelt, Roman Wölfel, et Michael Faulde. 2007. « Detection of a Questing Hyalomma Marginatummarginatum Adult Female (Acari, Ixodidae) in Southern Germany ». *Experimental and Applied Acarology* 43 (3): 227-31. https://doi.org/10.1007/s10493-007-9113-y.

Karti, S Sami, Zekaver Odabasi, Volkan Korten, Mustafa Yilmaz, Mehmet Sonmez, Rahmet Caylan, Elif Akdogan, et al. 2004. « Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Turkey ». *Emerging Infectious Diseases* 10 (8).

Keesing, F., R. D. Holt, et R. S. Ostfeld. 2006. « Effects of Species Diversity on Disease Risk ». *Ecology Letters* 9 (4): 485-98. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00885.x.

Kengne, Michel, Yolande Francine Onomo Medja, Tedom, et Julius Mbekem Nwobegahay. 2021. « Risque résiduel de la transmission par transfusion de l´infection du virus de l´hépatite B dû aux donneurs porteurs de l´infection du virus de l´hépatite B occulte à Yaoundé, Cameroun ». *The Pan African Medical Journal* 39 (juillet): 175. https://doi.org/10.11604/pamj.2021.39.175.22365.

Kenis, M., W. Rabitsch, M.-A. Auger-Rozenberg, et A. Roques. 2007. « How Can Alien Species Inventories and Interception Data Help Us Prevent Insect Invasions? » *Bulletin of Entomological Research* 97 (5): 489-502. https://doi.org/10.1017/S0007485307005184.

Keysary, Avi, Robert F. Massung, Moshe Inbar, Arian D. Wallach, Uri Shanas, Kosta Y. Mumcuoglu, et Trevor Waner. 2007. « Molecular Evidence for Anaplasma phagocytophilum in Israel ». *Emerging Infectious Diseases* 13 (9): 1411-12. https://doi.org/10.3201/eid1309.070455.

Kilicoglu, Yunus, Abdurrahman Anil Cagirgan, Gulnur Serdar, Selma Kaya, Yuksel Durmaz, et Yunus Gur. 2020. « Molecular Investigation, Isolation and Phylogenetic Analsysis of Coxiella Burnetii from Aborted Fetus and Ticks ». *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 73 (décembre): 101571. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101571.

Kilinc, Cetin, Ridvan Gückan, Mustafa Capraz, Kenan Varol, Erman Zengin, Zafer Mengeloglu, et Elif Menekse. 2016. « Examination of the Specific Clinical Symptoms and Laboratory Findings of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever ». *Journal of Vector Borne Diseases* 53 (2): 162-67.

Killilea, Mary E., Andrea Swei, Robert S. Lane, Cheryl J. Briggs, et Richard S. Ostfeld. 2008. « Spatial Dynamics of Lyme Disease: A Review ». *EcoHealth* 5 (2): 167-95. https://doi.org/10.1007/s10393-008-0171-3.

Knowles, Donald P., Lowell S. Kappmeyer, Darrell Haney, David R. Herndon, Lindsay M. Fry, James B. Munro, Kelly Sears, et al. 2018. « Discovery of a Novel Species, Theileria Haneyi n. Sp., Infective to Equids, Highlights Exceptional Genomic Diversity within the Genus Theileria: Implications for Apicomplexan Parasite Surveillance ». *International Journal for Parasitology* 48 (9): 679-90. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.03.010.

Kocáková, P., V. Hajnická, M. Slovák, P. A. Nuttall, et N. Fuchsberger. 1999. « Promotion of Vesicular Stomatitis Virus Nucleocapsid Protein Production by Arthopod Saliva ». *Acta Virologica* 43 (4): 251-54.

Kolodziejek, Jolanta, Mihai Marinov, Botond J. Kiss, Vasile Alexe, et Norbert Nowotny. 2014. « The Complete Sequence of a West Nile Virus Lineage 2 Strain Detected in a Hyalomma Marginatum Marginatum Tick Collected from a Song Thrush (Turdus Philomelos) in Eastern

Romania in 2013 Revealed Closest Genetic Relationship to Strain Volgograd 2007 ». *PLOS ONE* 9 (10): e109905. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109905.

Kondratenko, V. F. 1976. « [Importance of ixodid ticks in the transmission and preservation of the causative agent of Crimean hemorrhagic fever in foci of the infection ». *Parazitologiia* 10 (4): 297-302.

Kumar, Deepak, Surendra Raj Sharma, Abdulsalam Adegoke, Ashley Kennedy, Holly C. Tuten, Andrew Y. Li, et Shahid Karim. 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 ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12: 787209. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.787209.

Kurokawa, Cheyne, Geoffrey E. Lynn, Joao H. F. Pedra, Utpal Pal, Sukanya Narasimhan, et Erol Fikrig. 2020. « Interactions between Borrelia Burgdorferi and Ticks ». *Nature Reviews Microbiology* 18 (10): 587-600. https://doi.org/10.1038/s41579-020-0400-5.

Kutasi, O., T. Bakonyi, S. Lecollinet, I. Biksi, E. Ferenczi, C. Bahuon, S. Sardi, S. Zientara, et O. Szenci. 2011. « Equine Encephalomyelitis Outbreak Caused by a Genetic Lineage 2 West Nile Virus in Hungary ». *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25 (3): 586-91. https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0715.x.

Lambert, Amy J., et Robert S. Lanciotti. 2009. « Consensus Amplification and Novel Multiplex Sequencing Method for S Segment Species Identification of 47 Viruses of the Orthobunyavirus, Phlebovirus, and Nairovirus Genera of the Family Bunyaviridae ». *Journal of Clinical Microbiology* 47 (8): 2398-2404. https://doi.org/10.1128/JCM.00182-09.

Leblebicioglu, Hakan, Cafer Eroglu, Kiraz Erciyas-Yavuz, Murat Hokelek, Mustafa Acici, et Hava Yilmaz. 2014. « Role of Migratory Birds in Spreading Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, Turkey ». *Emerging Infectious Diseases* 20 (8): 1331-34. https://doi.org/10.3201/eid2008.131547.

Leblebicioglu, Hakan, Resat Ozaras, Tom E. Fletcher, et Nick J. Beeching. 2016. « Crimean-Congo Haemorrhagic Fever in Travellers: A Systematic Review ». *Travel Medicine and Infectious Disease* 14 (2): 73-80. https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2016.03.002.

Lecollinet, Sylvie. 2012. « Le virus West Nile : bilan de la situation en Europe et point sur la surveillance en France ».

Letty. 2021. « Lièvre France ».

Liu, Dongliang, Yang Li, Jing Zhao, Fei Deng, Xiaomei Duan, Chun Kou, Ting Wu, et al. 2014. « Fine Epitope Mapping of the Central Immunodominant Region of Nucleoprotein from Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus (CCHFV) ». *PLOS ONE* 9 (11): e108419. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108419.

Lobanov, V. A., A. A. Gajadhar, B. Al-Adhami, et H. M. Schwantje. 2012. « Molecular Study of Free-Ranging Mule Deer and White-Tailed Deer from British Columbia, Canada, for

Evidence of Anaplasma Spp. and Ehrlichia Spp. » *Transboundary and Emerging Diseases* 59 (3): 233-43. https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01259.x.

Logan, T. M., K. J. Linthicum, C. L. Bailey, D. M. Watts, et J. R. Moulton. 1989. « Experimental Transmission of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus by Hyalomma Truncatum Koch ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 40 (2): 207-12. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1989.40.207.

Lombe, Boniface Pongombo, Takeshi Saito, Hiroko Miyamoto, Akina Mori-Kajihara, Masahiro Kajihara, Masayuki Saijo, Justin Masumu, Takanari Hattori, Manabu Igarashi, et Ayato Takada. 2022. « Mapping of Antibody Epitopes on the Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Nucleoprotein ». *Viruses* 14 (3): 544. https://doi.org/10.3390/v14030544.

Lorenzo Juanes, Helena Miriam, Cristina Carbonell, Begoña Febrer Sendra, Amparo López-Bernus, Alberto Bahamonde, Alberto Orfao, Carmen Vieira Lista, et al. 2023. « Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, Spain, 2013–2021 ». *Emerging Infectious Diseases* 29 (2): 252-59. https://doi.org/10.3201/eid2902.220677.

Lynch, Susan V., et Oluf Pedersen. 2016. « The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease ». *The New England Journal of Medicine* 375 (24): 2369-79. https://doi.org/10.1056/NEJMra1600266.

Macias, A. E., A. de la Torre, S. Moreno-Espinosa, P. E. Leal, M. T. Bourlon, et G. M. Ruiz-Palacios. 2009. « Controlling the Novel A (H1N1) Influenza Virus: Don’t Touch Your Face! » *The Journal of Hospital Infection* 73 (3): 280-81. https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.06.017.

Mack, Richard N., Daniel Simberloff, W. Mark Lonsdale, Harry Evans, Michael Clout, et Fakhri A. Bazzaz. 2000. « Biotic Invasions: Causes, Epidemiology, Global Consequences, and Control ». *Ecological Applications* 10 (3): 689-710. https://doi.org/10.1890/1051-0761(2000)010[0689:BICEGC]2.0.CO;2.

Mancuso, Elisa, Luciano Toma, Andrea Polci, Silvio G. d’Alessio, Marco Di Luca, Massimiliano Orsini, Marco Di Domenico, et al. 2019. « Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Genome in Tick from Migratory Bird, Italy ». *Emerging Infectious Diseases* 25 (7): 1418-20. https://doi.org/10.3201/eid2507.181345.

Mans, Ben J., Daniel de Klerk, Ronel Pienaar, et Abdalla A. Latif. 2011. « Nuttalliella Namaqua: A Living Fossil and Closest Relative to the Ancestral Tick Lineage: Implications for the Evolution of Blood-Feeding in Ticks ». *PLOS ONE* 6 (8): e23675. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023675.

Martin, Claire, Paul-Pierre Pastoret, Bernard Brochier, Marie-France Humblet, et Claude Saegerman. 2011. « A survey of the transmission of infectious diseases/infections between wild and domestic ungulates in Europe ». *Veterinary Research* 42 (1): 70. https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-70.

Matsumoto, K., G. Joncour, B. Davoust, Pierre-Hugues Pitel, A. Chauzy, E. Collin, H. Morvan, N. Vassallo, et P. Brouqui. 2006. « Anaplasma Phagocytophilum Infection in Cattle in France ».

Annals of the New York Academy of Sciences 1078 (1): 491. https://doi.org/10.1196/annals.1374.092.

Matsumoto, K., P. Parola, P. Brouqui, et D. Raoult. 2004. « Rickettsia Aeschlimannii in Hyalomma Ticks from Corsica ». *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 23 (9): 732-34. https://doi.org/10.1007/s10096-004-1190-9.

Mattioli, Mia Catharine, Amy J. Pickering, Rebecca J. Gilsdorf, Jennifer Davis, et Alexandria B. Boehm. 2013. « Hands and Water as Vectors of Diarrheal Pathogens in Bagamoyo, Tanzania ». *Environmental Science & Technology* 47 (1): 355-63. https://doi.org/10.1021/es303878d.

Mazur-Panasiuk, Natalia, Jacek Żmudzki, et Grzegorz Woźniakowski. 2019. « African Swine Fever Virus – Persistence in Different Environmental Conditions and the Possibility of its Indirect Transmission ». *Journal of Veterinary Research* 63 (3): 303-10. https://doi.org/10.2478/jvetres-2019-0058.

Meha, Christelle. 2013. « Forêt et risque de santé publique : le cas de la borréliose de Lyme. Application à la forêt périurbaine de Sénart (Île-de-France) ». Phdthesis, Université Paris-Sorbonne - Paris IV. https://theses.hal.science/tel-00980387.

Meyer, C. 2023. « distomose hépato-biliaire des carnivores - Dictionnaire des Sciences Animales ». 2023. https://dico-sciences-animales.cirad.fr/liste-mots.php?fiche=8138&def=distomose+h%C3%A9pato-biliaire+des+carnivores.

M'ghirbi, Youmna, Hèla Yaïch, Abderazek Ghorbel, et Ali Bouattour. 2012. « Anaplasma phagocytophilum in horses and ticks in Tunisia ». *Parasites & Vectors* 5 (août): 180. https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-180.

Michelet, Lorraine, Sabine Delannoy, Elodie Devillers, Gérald Umhang, Anna Aspan, Mikael Juremalm, Jan Chirico, et al. 2014. « High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2014.00103.

Midilli, Kenan, Ayşen Gargili, Onder Ergonul, Murat Elevli, Sevgi Ergin, Nesrin Turan, Gönül Sengöz, Recep Ozturk, et Mehmet Bakar. 2009. « The First Clinical Case Due to AP92 like Strain of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus and a Field Survey ». *BMC Infectious Diseases* 9 (juin): 90. https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-90.

Ming, Zhihao, Zhiqiang Chen, Hao Tong, Xia Zhou, Tingting Feng, et Jianfeng Dai. 2023. « Immune Functions of C-Type Lectins in Medical Arthropods ». *Insect Science*, janvier. https://doi.org/10.1111/1744-7917.13169.

Monahan, A. M., I. S. Miller, et J. E. Nally. 2009. « Leptospirosis: Risks during Recreational Activities ». *Journal of Applied Microbiology* 107 (3): 707-16. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04220.x.

Moore, Thomas C., Laura A. Pulscher, Luke Caddell, Michael E. von Fricken, Benjamin D. Anderson, Battsetseg Gonchigoo, et Gregory C. Gray. 2018. « Evidence for transovarial

transmission of tick-borne rickettsiae circulating in Northern Mongolia ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12 (8): e0006696. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006696.

Moraga-Fernández, Alberto, Francisco Ruiz-Fons, Miguel A. Habela, Lara Royo-Hernández, Rafael Calero-Bernal, Christian Gortazar, José de la Fuente, et Isabel G. Fernández de Mera. 2021. « Detection of New Crimean–Congo Haemorrhagic Fever Virus Genotypes in Ticks Feeding on Deer and Wild Boar, Spain ». *Transboundary and Emerging Diseases* 68 (3): 993-1000. https://doi.org/10.1111/tbed.13756.

Morel, P.-C. 1959. « Les *Hyalomma* (Acariens, *Ixodidæ*) de France ». *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 34 (4): 552-55. https://doi.org/10.1051/parasite/1959344552.

Morse, S. S. 1995. « Factors in the Emergence of Infectious Diseases ». *Emerging Infectious Diseases* 1 (1): 7-15. https://doi.org/10.3201/eid0101.950102.

Moutailler, Sara, Jean-Claude George, Yves Hansmann, Brigitte Degeilh, Guy Joncour, Elsa Jourdain, Laurence Malandrin, et al. 2017. « 7. Principales maladies transmises par les tiques : épidémiologie, clinique et diagnostic ». In *Tiques et maladies à tiques : Biologie, écologie évolutive, épidémiologie*, édité par Karen D. McCoy, 193-209. Didactiques. Marseille: IRD Éditions. https://doi.org/10.4000/books.irdeditions.9047.

Muraro, Lívia S., Aneliza de O. Souza, Tamyres N. S. Leite, Stefhano L. Cândido, Andréia L. T. Melo, Hugo S. Toma, Mariana B. Carvalho, et al. 2021. « First Evidence of Ehrlichia Minasensis Infection in Horses from Brazil ». *Pathogens* 10 (3): 265. https://doi.org/10.3390/pathogens10030265.

Murray, Christopher JL, Lisa C. Rosenfeld, Stephen S. Lim, Kathryn G. Andrews, Kyle J. Foreman, Diana Haring, Nancy Fullman, Mohsen Naghavi, Rafael Lozano, et Alan D. Lopez. 2012. « Global Malaria Mortality between 1980 and 2010: A Systematic Analysis ». *The Lancet* 379 (9814): 413-31. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60034-8.

Nabeth, Pierre, Dah Ould Cheikh, Baidy Lo, Ousmane Faye, Idoumou Ould Mohamed Vall, Mbayame Niang, Bocar Wague, et al. 2004. « Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, Mauritania ». *Emerging Infectious Diseases* 10 (12).

Nacambo, S., F. L. G. Leuthardt, H. Wan, H. Li, T. Haye, B. Baur, R. M. Weiss, et M. Kenis. 2014. « Development Characteristics of the Box-Tree Moth Cydalima Perspectalis and Its Potential Distribution in Europe ». *Journal of Applied Entomology* 138 (1-2): 14-26. https://doi.org/10.1111/jen.12078.

Nadal, Clémence. 2019. « Eco-épidémiologie de la piroplasmose équine et des vecteurs impliqués en France ». These en préparation, Paris 12. https://www.theses.fr/s233615.

Nadal, Clémence, Sarah I. Bonnet, et Maud Marsot. 2022. « Eco-Epidemiology of Equine Piroplasmosis and Its Associated Tick Vectors in Europe: A Systematic Literature Review and a Meta-Analysis of Prevalence ». *Transboundary and Emerging Diseases* 69 (5): 2474-98. https://doi.org/10.1111/tbed.14261.

Negredo, Ana, Miguel Ángel Habela, Eva Ramírez de Arellano, Francisco Diez, Fátima Lasala, Pablo López, Ana Sarriá, et al. 2019. « Survey of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever

Enzootic Focus, Spain, 2011–2015 ». *Emerging Infectious Diseases* 25 (6): 1177-84. https://doi.org/10.3201/eid2506.180877.

Negredo, Anabel, Fernando de la Calle-Prieto, Eduardo Palencia-Herrejón, Marta Mora-Rillo, Jenaro Astray-Mochales, María P. Sánchez-Seco, Esther Bermejo Lopez, et al. 2017. « Autochthonous Crimean–Congo Hemorrhagic Fever in Spain ». *New England Journal of Medicine* 377 (2): 154-61. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1615162.

Negredo, Anabel, Rafael Sánchez-Arroyo, Francisco Díez-Fuertes, Fernando de Ory, Marco Antonio Budiño, Ana Vázquez, Ángeles Garcinuño, et al. 2021. « Fatal Case of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Caused by Reassortant Virus, Spain, 2018 ». *Emerging Infectious Diseases* 27 (4): 1211-15. https://doi.org/10.3201/eid2704.203462.

Neiderud, Carl-Johan. 2015. « How urbanization affects the epidemiology of emerging infectious diseases ». *Infection Ecology & Epidemiology* 5 (juin): 10.3402/iee.v5.27060. https://doi.org/10.3402/iee.v5.27060.

Noden, B. H., M. D. Kent, et J. C. Beier. 1995. « The Impact of Variations in Temperature on Early Plasmodium Falciparum Development in Anopheles Stephensi ». *Parasitology* 111 (Pt 5) (décembre): 539-45. https://doi.org/10.1017/s0031182000077003.

Nonaka, Etsuko, Gregory D. Ebel, et Helen J. Wearing. 2010. « Persistence of Pathogens with Short Infectious Periods in Seasonal Tick Populations: The Relative Importance of Three Transmission Routes ». *PLOS ONE* 5 (7): e11745. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011745.

Nuttall, P. A., et M. Labuda. 2003. « Dynamics of Infection in Tick Vectors and at the Tick-Host Interface ». *Advances in Virus Research* 60: 233-72. https://doi.org/10.1016/s0065-3527(03)60007-2.

OFB. 2022. « Les espèces exotiques envahissantes : enjeux et impacts ».

OFB & UICN France. 2020a. « Agave americana ». *Base d'information sur les espèces exotiques envahissantes. Centre de ressources* (blog). 2020. http://especes-exotiques-envahissantes.fr/espece/agave-americana/.

OFB & UICN France. 2020b. « Oxyura jamaicensis ». *Base d'information sur les espèces exotiques envahissantes. Centre de ressources Espèces exotiques envahissantes. UICN France et Office français de la biodiversité.* (blog). 2020. http://especes-exotiques-envahissantes.fr/espece/oxyura-jamaicensis/.

OFB & UICN France. 2021. « Urva auropunctata (Herpestes javanicus) ». *Base d'information sur les espèces exotiques envahissantes. Centre de ressources Espèces exotiques envahissantes. UICN France et Office français de la biodiversité.* (blog). 2021. http://especes-exotiques-envahissantes.fr/espece/herpestes-javanicus/.

OMS. 2014. « Fièvre hémorragique de Crimée-Congo ». 2014. https://www.iph.mk/fr/fievre-hemorragique-de-crimee-congo/.

OMS. 2019. « 1 personne sur 3 dans le monde n'a pas accès à de l'eau salubre – UNICEF, OMS ». 2019. https://www.who.int/fr/news/item/18-06-2019-1-in-3-people-globally-do-not-have-access-to-safe-drinking-water-–-unicef-who.

Öncü, Serkan. 2013. « Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: An Overview ». *Virologica Sinica* 28 (4): 193-201. https://doi.org/10.1007/s12250-013-3327-4.

Onyiche, ThankGod E., Keisuke Suganuma, Ikuo Igarashi, Naoaki Yokoyama, Xuenan Xuan, et Oriel Thekisoe. 2019. « A Review on Equine Piroplasmosis: Epidemiology, Vector Ecology, Risk Factors, Host Immunity, Diagnosis and Control ». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16 (10): 1736. https://doi.org/10.3390/ijerph16101736.

Orkun, Ömer. 2019. « Molecular Investigation of the Natural Transovarial Transmission of Tick-Borne Pathogens in Turkey ». *Veterinary Parasitology* 273 (septembre): 97-104. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.08.013.

Orkun, Ömer. 2022. « Comprehensive Screening of Tick-Borne Microorganisms Indicates That a Great Variety of Pathogens Are Circulating between Hard Ticks (Ixodoidea: Ixodidae) and Domestic Ruminants in Natural Foci of Anatolia ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 13 (6): 102027. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102027.

Orkun, Ömer, Ayşe Çakmak, Serpil Nalbantoğlu, et Zafer Karaer. 2020. « Turkey Tick News: A Molecular Investigation into the Presence of Tick-Borne Pathogens in Host-Seeking Ticks in Anatolia; Initial Evidence of Putative Vectors and Pathogens, and Footsteps of a Secretly Rising Vector Tick, Haemaphysalis Parva ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 11 (3): 101373. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101373.

Orkun, Ömer, Zafer Karaer, Ayşe Çakmak, et Serpil Nalbantoğlu. 2017. « Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Ticks in Turkey: A Broad Range Tick Surveillance Study ». *Infection, Genetics and Evolution* 52 (août): 59-66. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.04.017.

Ozubek, Sezayi, Reginaldo G. Bastos, Heba F. Alzan, Abdullah Inci, Munir Aktas, et Carlos E. Suarez. 2020. « Bovine Babesiosis in Turkey: Impact, Current Gaps, and Opportunities for Intervention ». *Pathogens* 9 (12): 1041. https://doi.org/10.3390/pathogens9121041.

Page, Matthew J., Joanne E. McKenzie, Patrick M. Bossuyt, Isabelle Boutron, Tammy C. Hoffmann, Cynthia D. Mulrow, Larissa Shamseer, et al. 2021. « The PRISMA 2020 Statement: An Updated Guideline for Reporting Systematic Reviews ». *BMJ* 372 (mars): n71. https://doi.org/10.1136/bmj.n71.

Palomar, Ana M., Aránzazu Portillo, David Mazuelas, Lidia Roncero, Juan Arizaga, Ariñe Crespo, Óscar Gutiérrez, et al. 2016. « Molecular Analysis of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus and Rickettsia in Hyalomma Marginatum Ticks Removed from Patients (Spain) and Birds (Spain and Morocco), 2009–2015 ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 7 (5): 983-87. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.05.004.

Papa, Anna, Silva Bino, Enkelejda Velo, Arjan Harxhi, Majlinda Kota, et Antonis Antoniadis. 2006. « Cytokine Levels in Crimean-Congo Hemorrhagic Fever ». *Journal of Clinical Virology:*

The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology 36 (4): 272-76. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2006.04.007.

Papa, Anna, Ilias Chaligiannis, Natasa Kontana, Tatiana Sourba, Katerina Tsioka, Andreas Tsatsaris, et Smaragda Sotiraki. 2014. « A Novel AP92-like Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Strain, Greece ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 5 (5): 590-93. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.04.008.

Papa, Anna, Enkeleda Velo, Perparim Kadiaj, Katerina Tsioka, Anastasia Kontana, Majlinda Kota, et Silvia Bino. 2017. « Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Ticks Collected from Livestock in Albania ». *Infection, Genetics and Evolution* 54 (octobre): 496-500. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.08.017.

Papadopoulos, O., et G. Koptopoulos. 1978. « Isolation of Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF) virus from Rhipicephalus bursa ticks in Greece. » *Acta Microbiologica Hellenica* 23 (1): 20-28.

Papadopoulos, O. t, et G. Koptopoulos. 1980. « Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) in Greece: isolation of the virus from Rhipicephalus bursa ticks and a preliminary serological survey ». *Zentbl Bakteriol Hyg Abt* 1 (Suppl 9): 189-93.

Parola, Philippe, Christopher D. Paddock, Cristina Socolovschi, Marcelo B. Labruna, Oleg Mediannikov, Tahar Kernif, Mohammad Yazid Abdad, et al. 2014. « Update on Tick-Borne Rickettsioses around the World: a Geographic Approach ». *Clinical Microbiology Reviews* 27 (1): 166. https://doi.org/10.1128/CMR.00104-13.

Patin, Etienne, Milena Hasan, Jacob Bergstedt, Vincent Rouilly, Valentina Libri, Alejandra Urrutia, Cécile Alanio, et al. 2018. « Natural Variation in the Parameters of Innate Immune Cells Is Preferentially Driven by Genetic Factors ». *Nature Immunology* 19 (3): 302-14. https://doi.org/10.1038/s41590-018-0049-7.

Pauli, Georg, Ursula Bauerfeind, Johannes Blümel, Reinhard Burger, Christian Drosten, Albrecht Gröner, Lutz Gürtler, et al. 2013. « West Nile Virus ». *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 40 (4): 265-84. https://doi.org/10.1159/000353698.

Pepin, Michel, Michele Bouloy, Brian H. Bird, Alan Kemp, et Janusz Paweska. 2010. « Rift Valley Fever Virus(Bunyaviridae: Phlebovirus): An Update on Pathogenesis, Molecular Epidemiology, Vectors, Diagnostics and Prevention ». *Veterinary Research* 41 (6): 61. https://doi.org/10.1051/vetres/2010033.

Pereira de Oliveira, Rémi. 2020. « Mécanismes de transmission vectorielle du virus de la Peste Porcine Africaine et facteurs influençant cette transmission : étude de différentes associations tique-virus ». These de doctorat, Montpellier. https://www.theses.fr/2020MONTG013.

Pérez-Eid, Claudine. 2007. *Les tiques : identification, biologie, importance médicale et vétérinaire*. Lavoisier.

Pérez-Mayorga, D. M., L. B. Ladah, J. A. Zertuche-González, J. J. Leichter, A. E. Filonov, et M. F. Lavín. 2011. « Nitrogen Uptake and Growth by the Opportunistic Macroalga Ulva Lactuca

(Linnaeus) during the Internal Tide ». *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 406 (1): 108-15. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.05.028.

Perveen, Nighat, et Gulfaraz Khan. 2022. « Crimean–Congo hemorrhagic fever in the Arab world: A systematic review ». *Frontiers in Veterinary Science* 9 (septembre): 938601. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.938601.

Petersen, Lyle R., Aaron C. Brault, et Roger S. Nasci. 2013. « West Nile Virus: Review of the Literature ». *JAMA* 310 (3): 308-15. https://doi.org/10.1001/jama.2013.8042.

Piasecka, Barbara, Darragh Duffy, Alejandra Urrutia, Hélène Quach, Etienne Patin, Céline Posseme, Jacob Bergstedt, et al. 2018. « Distinctive roles of age, sex, and genetics in shaping transcriptional variation of human immune responses to microbial challenges ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (3): E488-97. https://doi.org/10.1073/pnas.1714765115.

Piesman, Joseph, et Lars Eisen. 2008. « Prevention of Tick-Borne Diseases ». *Annual Review of Entomology* 53: 323-43. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093429.

Plantard, Olivier, Ionut Pavel, et Laurence Vial. 2017. « 1. Évolution, systématique et diversité des tiques ». In *Tiques et maladies à tiques : Biologie, écologie évolutive, épidémiologie*, édité par Nathalie Boulanger et Karen D. McCoy, 31-51. Didactiques. Marseille: IRD Éditions. https://doi.org/10.4000/books.irdeditions.9015.

Poitras, E, et A Houde. 2002. « La PCR en temps réel: principes et applications ».

Powles, Stephen B. 2010. « Gene amplification delivers glyphosate-resistant weed evolution ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (3): 955-56. https://doi.org/10.1073/pnas.0913433107.

Prüss-Üstün, Annette, J. Wolf, Carlos F. Corvalán, R. Bos, et Maria Purificación Neira. 2016. *Preventing Disease through Healthy Environments: A Global Assessment of the Burden of Disease from Environmental Risks*. World Health Organization. https://apps.who.int/iris/handle/10665/204585.

Rageau, Jean. 1972. « Répartition géographique et rôle pathogène des tiques (acariens : Argasidae et Ixodidae) en France ».

Rehman, Abdul, Franz J. Conraths, Carola Sauter-Louis, Jürgen Krücken, et Ard M. Nijhof. 2019. « Epidemiology of Tick-Borne Pathogens in the Semi-Arid and the Arid Agro-Ecological Zones of Punjab Province, Pakistan ». *Transboundary and Emerging Diseases* 66 (1): 526-36. https://doi.org/10.1111/tbed.13059.

Reichler, Mary R., Dana Bruden, Harold Thomas, Bobbie Rae Erickson, Barbara Knust, Nadia Duffy, John Klena, et Thomas Hennessy. 2020. « Ebola Patient Virus Cycle Threshold and Risk of Household Transmission of Ebola Virus ». *The Journal of infectious diseases* 221 (5): 707-14. https://doi.org/10.1093/infdis/jiz511.

Rennie, L., P. J. Wilkinson, et P. S. Mellor. 2001. « Transovarial Transmission of African Swine Fever Virus in the Argasid Tick Ornithodoros Moubata ». *Medical and Veterinary Entomology* 15 (2): 140-46. https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2001.00282.x.

Ribbens, S., J. Dewulf, F. Koenen, H. Laevens, et A. de Kruif. 2004. « Transmission of classical swine fever. A review ». *Veterinary Quarterly* 26 (4): 146-55. https://doi.org/10.1080/01652176.2004.9695177.

Richard, Mathilde, Sascha Knauf, Philip Lawrence, Alison E Mather, Vincent J Munster, Marcel A Müller, Derek Smith, et Thijs Kuiken. 2017. « Factors Determining Human-to-Human Transmissibility of Zoonotic Pathogens via Contact ». *Current Opinion in Virology*, Emerging viruses: intraspecies transmission • Viral immunology, 22 (février): 7-12. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.11.004.

Rikihisa, Yasuko. 2011. « Mechanisms of Obligatory Intracellular Infection with Anaplasma phagocytophilum ». *Clinical Microbiology Reviews* 24 (3): 469-89. https://doi.org/10.1128/CMR.00064-10.

Ristic, Miodrag. 1981. « Anaplasmosis ». In *Diseases of Cattle in the Tropics: Economic and Zoonotic Relevance*, édité par Miodrag Ristic et Ian McIntyre, 327-44. Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-015-6895-1_27.

Robert, Vincent. 2012. « 1. Introduction aux arthropodes nuisants, aux vecteurs et aux maladies à transmission vectorielle ». In *Protection personnelle antivectorielle*, édité par Gérard Duvallet et Ludovic De Gentile, 25-49. IRD Éditions. https://doi.org/10.4000/books.irdeditions.9383.

Rocafort-Ferrer, Gloria, Agnès Leblond, Aurélien Joulié, Magalie René-Martellet, Alain Sandoz, Valérie Poux, Sophie Pradier, Séverine Barry, Laurence Vial, et Loïc Legrand. 2022. « Molecular Assessment of Theileria Equi and Babesia Caballi Prevalence in Horses and Ticks on Horses in Southeastern France ». *Parasitology Research* 121 (3): 999-1008. https://doi.org/10.1007/s00436-022-07441-7.

Rodhain, François, Claudine Pérez-Eid, et Leonard Jan Préfacier Bruce-Chwatt. 1985. *Précis d'entomologie médicale et vétérinaire: notions d'épidémiologie des maladies à vecteurs*. Paris, France: Maloine SA.

Romanenko, V. N. 2005. « [Visual potentialities of the tick Hyalomma asiaticum asiaticum (Ixodidae)] ». *Parazitologiia* 39 (3): 186-90.

Ros-García, A., Y. M'ghirbi, A. Bouattour, et A. Hurtado. 2011. « First Detection of Babesia Occultans in Hyalomma Ticks from Tunisia ». *Parasitology* 138 (5): 578-82. https://doi.org/10.1017/S0031182011000060.

Rothschild, Chantal M. 2013. « Equine Piroplasmosis ». *Journal of Equine Veterinary Science* 33 (7): 497-508. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.03.189.

Rubel, Franz, Katharina Brugger, Martin Pfeffer, Lidia Chitimia-Dobler, Yuliya M. Didyk, Sandra Leverenz, Hans Dautel, et Olaf Kahl. 2016. « Geographical Distribution of Dermacentor

Marginatus and Dermacentor Reticulatus in Europe ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 7 (1): 224-33. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.10.015.

Ruiz, Sara I., Elizabeth E. Zumbrun, et Aysegul Nalca. 2013. « Animal Models of Human Viral Diseases ». In *Animal Models for the Study of Human Disease*, 927-70. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415894-8.00038-5.

Ruscio, M., et M. Cinco. 2003. « Human granulocytic ehrlichiosis in Italy: first report on two confirmed cases. » *Annals of the New York Academy of Sciences*. https://www.semanticscholar.org/paper/Human-granulocytic-ehrlichiosis-in-Italy%3A-first-on-Ruscio-Cinco/b5b6d8ff69ae6c5dff525b35b7a3f4f7048af442.

Saegerman, Claude, Dirk Berkvens, et Philip S. Mellor. 2008. « Bluetongue Epidemiology in the European Union ». *Emerging Infectious Diseases* 14 (4): 539-44. https://doi.org/10.3201/eid1404.071441.

Salehi-Vaziri, Mostafa, Vahid Baniasadi, Tahmineh Jalali, S. Maryam Mirghiasi, Sanam Azad-Manjiri, Roya Zarandi, Tahereh Mohammadi, Sahar Khakifirouz, et Mehdi Fazlalipour. 2016. « The First Fatal Case of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Caused by the AP92-Like Strain of the Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus ». *Japanese Journal of Infectious Diseases* 69 (4): 344-46. https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2015.533.

Sánchez-Seco, María Paz, María José Sierra, Agustín Estrada-Peña, Félix Valcárcel, Ricardo Molina, Eva Ramírez de Arellano, Angeles Sonia Olmeda, et al. 2021. « Widespread Detection of Multiple Strains of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Ticks, Spain ». *Emerging Infectious Diseases* 28 (2): 394-402. https://doi.org/10.3201/eid2802.211308.

Sanders, C, P Mellor, et A Wilson. 2010. « Invasive arthropods », Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., .

Santucci, Pierre, Joana Fabre, et Jean-Christophe Paoli. 2011. « Rôle des parcours en élevage pastoral corse ».

Sargianou, Maria, George Panos, Andreas Tsatsaris, Charalambos Gogos, et Anna Papa. 2013. « Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: Seroprevalence and Risk Factors among Humans in Achaia, Western Greece ». *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases* 17 (12): e1160-1165. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.07.015.

Sas, Miriam A., Loic Comtet, Fabien Donnet, Marc Mertens, Zati Vatansever, Noel Tordo, Philippe Pourquier, et Martin H. Groschup. 2018. « A Novel Double-Antigen Sandwich ELISA for the Species-Independent Detection of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus-Specific Antibodies ». *Antiviral Research* 151 (mars): 24-26. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.01.006.

Satta, Giuseppe, Valentina Chisu, Pierangela Cabras, Francesco Fois, et Giovanna Masala. 2011. « Pathogens and symbionts in ticks: a survey on tick species distribution and presence of tick-transmitted micro-organisms in Sardinia, Italy ». *Journal of Medical Microbiology* 60 (1): 63-68. https://doi.org/10.1099/jmm.0.021543-0.

Schloesser, Don W. 1995. *Introduced Species, Zebra Mussels in North America*. Vol. 2. https://pubs.er.usgs.gov/publication/81456.

Scoles, Glen A., et Massaro W. Ueti. 2015. « Vector Ecology of Equine Piroplasmosis ». *Annual Review of Entomology* 60 (janvier): 561-80. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-021110.

Scott, John D, Elena McGoey, Ana Morales, et Risa R Pesapane. 2022. « Molecular Detection of Anaplasma Phagocytophilum, Babesia Odocoilei, Babesia Species and Borrelia Burgdorferi Sensu Lato in Songbirds ». *Journal of Biomedical Research & Environmental Sciences* 3 (12): 1451-59. https://doi.org/10.37871/jbres1619.

Sears, Kelly P., Lowell S. Kappmeyer, Lauren N. Wise, Marta Silva, Massaro W. Ueti, Stephen White, Kathryn E. Reif, et Donald P. Knowles. 2019. « Infection Dynamics of Theileria Equi and Theileria Haneyi, a Newly Discovered Apicomplexan of the Horse ». *Veterinary Parasitology* 271 (juillet): 68-75. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.06.009.

Seebens, Hanno, Tim M. Blackburn, Ellie E. Dyer, Piero Genovesi, Philip E. Hulme, Jonathan M. Jeschke, Shyama Pagad, et al. 2017. « No Saturation in the Accumulation of Alien Species Worldwide ». *Nature Communications* 8 (février): 14435. https://doi.org/10.1038/ncomms14435.

Sekercioğlu, Cağan Hakkı. 2013. « Guineafowl, Ticks and Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Turkey: The Perfect Storm? » *Trends in Parasitology* 29 (1): 1-2. https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.10.001.

Selmi, Rachid, Mourad Ben Said, Aymen Mamlouk, Houcine Ben Yahia, et Lilia Messadi. 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 (novembre): 103655. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103655.

Semenza, Jan C, et Jonathan E Suk. 2018. « Vector-borne diseases and climate change: a European perspective ». *FEMS Microbiology Letters* 365 (2): fnx244. https://doi.org/10.1093/femsle/fnx244.

Serrato-Salas, Javier, et Mathilde Gendrin. 2023. « Involvement of Microbiota in Insect Physiology: Focus on B Vitamins ». Édité par Brian Weiss et Jacob Yount. *mBio* 14 (1): e02225-22. https://doi.org/10.1128/mbio.02225-22.

Shapiro-Ilan, David I., James R. Fuxa, Lawrence A. Lacey, David W. Onstad, et Harry K. Kaya. 2005. « Definitions of Pathogenicity and Virulence in Invertebrate Pathology ». *Journal of Invertebrate Pathology* 88 (1): 1-7. https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.10.003.

Shayan, Sara, Mohammad Bokaean, Mona Ranjvar Shahrivar, et Sadegh Chinikar. 2015. « Crimean-Congo Hemorrhagic Fever ». *Laboratory Medicine* 46 (3): 180-89. https://doi.org/10.1309/LMN1P2FRZ7BKZSCO.

Shepherd, A. J., R. Swanepoel, et P. A. Leman. 1989. « Antibody Response in Crimean-Congo Hemorrhagic Fever ». *Clinical Infectious Diseases* 11 (Supplement_4): S801-6. https://doi.org/10.1093/clinids/11.Supplement_4.S801.

Sherifi, Kurtesh, Agim Rexhepi, Kristaq Berxholi, Blerta Mehmedi, Rreze M. Gecaj, Zamira Hoxha, Anja Joachim, et Georg G. Duscher. 2018. « Crimean–Congo Hemorrhagic Fever Virus and Borrelia Burgdorferi Sensu Lato in Ticks from Kosovo and Albania ». *Frontiers in Veterinary Science* 5 (mars): 38. https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00038.

Šimo, Ladislav, Maria Kazimirova, Jennifer Richardson, et Sarah I. Bonnet. 2017. « The Essential Role of Tick Salivary Glands and Saliva in Tick Feeding and Pathogen Transmission ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7: 281. https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00281.

Šimo, Ladislav, Mirko Slovák, Yoonseong Park, et Dušan Žitňan. 2009. « Identification of a Complex Peptidergic Neuroendocrine Network in the Hard Tick, Rhipicephalus Appendiculatus ». *Cell and Tissue Research* 335 (3): 639-55. https://doi.org/10.1007/s00441-008-0731-4.

Simonsen, L., A. Kane, J. Lloyd, M. Zaffran, et M. Kane. 1999. « Unsafe injections in the developing world and transmission of bloodborne pathogens: a review. » *Bulletin of the World Health Organization* 77 (10): 789-800.

Simpson, D. I., E. M. Knight, G. Courtois, M. C. Williams, M. P. Weinbren, et J. W. Kibukamusoke. 1967. « Congo Virus: A Hitherto Undescribed Virus Occurring in Africa. I. Human Isolations--Clinical Notes ». *East African Medical Journal* 44 (2): 86-92.

Široký, Pavel, Tomáš Bělohlávek, Ivo Papoušek, David Jandzik, Peter Mikulíček, Michaela Kubelová, et Lenka Zdražilová-Dubská. 2014. « Hidden Threat of Tortoise Ticks: High Prevalence of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Virus in Ticks Hyalomma Aegyptium in the Middle East ». *Parasites & Vectors* 7 (1): 101. https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-101.

Sisman, Aziz. 2013. « Epidemiologic Features and Risk Factors of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Samsun Province, Turkey ». *Journal of Epidemiology* 23 (2): 95-102. https://doi.org/10.2188/jea.je20120097.

Sojka, Daniel, Zdeněk Franta, Martin Horn, Conor R. Caffrey, Michael Mareš, et Petr Kopáček. 2013. « New Insights into the Machinery of Blood Digestion by Ticks ». *Trends in Parasitology* 29 (6): 276-85. https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.04.002.

Sonenshine, Daniel E., R. Michael Roe, Daniel E. Sonenshine, et R. Michael Roe, éd. 2014a. *Biology of Ticks Volume 1*. Second Edition, Second Edition. Oxford, New York: Oxford University Press.

Sonenshine, Daniel E., R. Michael Roe, Daniel E. Sonenshine, et R. Michael Roe, éd. 2014b. *Biology of Ticks Volume 2*. Second Edition, Second Edition. Oxford, New York: Oxford University Press.

Sorvillo, Teresa E., Sergio E. Rodriguez, Peter Hudson, Megan Carey, Luis L. Rodriguez, Christina F. Spiropoulou, Brian H. Bird, Jessica R. Spengler, et Dennis A. Bente. 2020. « Towards a

Sustainable One Health Approach to Crimean–Congo Hemorrhagic Fever Prevention: Focus Areas and Gaps in Knowledge ». *Tropical Medicine and Infectious Disease* 5 (3): 113. https://doi.org/10.3390/tropicalmed5030113.

Spengler, Jessica R., Agustín Estrada-Peña, Aura R. Garrison, Connie Schmaljohn, Christina F. Spiropoulou, Éric Bergeron, et Dennis A. Bente. 2016. « A Chronological Review of Experimental Infection Studies of the Role of Wild Animals and Livestock in the Maintenance and Transmission of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus ». *Antiviral Research* 135 (novembre): 31-47. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.09.013.

Spengler, John D. 2012. « Climate Change, Indoor Environments, and Health: Editorial ». *Indoor Air* 22 (2): 89-95. https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.2012.00768.x.

Stachurski, Frédéric, et Laurence Vial. 2018. « Santé animale - alimentation ».

Stanley, David, Eric Haas, et Yonggyun Kim. 2023. « Beyond Cellular Immunity: On the Biological Significance of Insect Hemocytes ». *Cells* 12 (4): 599. https://doi.org/10.3390/cells12040599.

Stringham, Oliver C., Pablo García-Díaz, Adam Toomes, Lewis Mitchell, Joshua V. Ross, et Phillip Cassey. 2021. « Live Reptile Smuggling Is Predicted by Trends in the Legal Exotic Pet Trade ». *Conservation Letters* 14 (6): e12833. https://doi.org/10.1111/conl.12833.

Suda, Yuto, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Shin Murakami, Masayuki Saijo, Taisuke Horimoto, et Masayuki Shimojima. 2016. « Analysis of the Entry Mechanism of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus, Using a Vesicular Stomatitis Virus Pseudotyping System ». *Archives of Virology* 161 (6): 1447-54. https://doi.org/10.1007/s00705-016-2803-1.

Sun, Lizhe, Xianwei Wang, Jason Saredy, Zuyi Yuan, Xiaofeng Yang, et Hong Wang. 2020. « Innate-Adaptive Immunity Interplay and Redox Regulation in Immune Response ». *Redox Biology* 37 (octobre): 101759. https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101759.

Swanepoel, R., D. E. Gill, A. J. Shepherd, P. A. Leman, J. H. Mynhardt, et S. Harvey. 1989. « The Clinical Pathology of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever ». *Reviews of Infectious Diseases* 11 Suppl 4: S794-800. https://doi.org/10.1093/clinids/11.supplement_4.s794.

Swanepoel, R., P. A. Leman, F. J. Burt, J. Jardine, D. J. Verwoerd, I. Capua, G. K. Brückner, et W. P. Burger. 1998. « Experimental Infection of Ostriches with Crimean–Congo Haemorrhagic Fever Virus ». *Epidemiology and Infection* 121 (2): 427-32. https://doi.org/10.1017/S0950268898001344.

Tahenni, Said. 2021. « La fièvre hémorragique de Crimée-Congo. Une autre maladie transmise par les tiques ». 30 mai 2021. https://www.alliance-elevage.com/informations/article/la-fievre-hemorragique-de-crimee-congo-une-autre-maladie-transmise-par-les-tiques.

Tarantola, Arnaud, Pierre Nabeth, Pierre Tattevin, Christian Michelet, et Hervé Zeller. 2006. « Lookback Exercise with Imported Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, Senegal and France ». *Emerging Infectious Diseases* 12 (9): 1424-26. https://doi.org/10.3201/eid1209.060002.

Tasdelen Fisgin, Nuriye, Tunc Fisgin, Esra Tanyel, Levent Doganci, Necla Tulek, Nil Guler, et Feride Duru. 2008. « Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: Five Patients with Hemophagocytic Syndrome ». *American Journal of Hematology* 83 (1): 73-76. https://doi.org/10.1002/ajh.20969.

Tekin, Saban, Ahmet Bursali, Neslihan Mutluay, Adem Keskin, et Ekrem Dundar. 2012. « Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Various Ixodid Tick Species from a Highly Endemic Area ». *Veterinary Parasitology* 186 (3-4): 546-52. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.010.

Thomson, Kirsty, Tal Yaaran, Alex Belshaw, Lucia Curson, Laurence Tisi, Sarah Maurice, et Guy Kiddle. 2018. « A New TaqMan Method for the Reliable Diagnosis of Ehrlichia Spp. in Canine Whole Blood ». *Parasites & Vectors* 11 (1): 350. https://doi.org/10.1186/s13071-018-2914-5.

Tian, Xu, et Stephan von Cramon-Taubadel. 2020. « Economic Consequences of African Swine Fever ». *Nature Food* 1 (4): 196-97. https://doi.org/10.1038/s43016-020-0061-6.

Tirosh-Levy, Sharon, Yuval Gottlieb, Monica L. Mazuz, Igor Savitsky, et Amir Steinman. 2020. « Infection Dynamics of Theileria Equi in Carrier Horses Is Associated with Management and Tick Exposure ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 11 (6): 101508. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101508.

Torchin, M. E., K. D. Lafferty, et A. M. Kuris. 2002. « Parasites and Marine Invasions ». *Parasitology* 124 (7): 137-51. https://doi.org/10.1017/S0031182002001506.

Tosoni, A., A. Mirijello, A. Ciervo, F. Mancini, G. Rezza, F. Damiano, R. Cauda, A. Gasbarrini, G. Addolorato, et Internal Medicine Sepsis Study Group. 2016. « Human Rickettsia Aeschlimannii Infection: First Case with Acute Hepatitis and Review of the Literature ». *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 20 (12): 2630-33.

Tuteja, Renu. 2007. « Malaria − an Overview ». *The FEBS Journal* 274 (18): 4670-79. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05997.x.

UICN Comité français, et OFB. 2022. « ESPÈCES EXOTIQUES ENVAHISSANTES ET CHANGEMENTS CLIMATIQUES ». Centre de ressources espèces exotiques envahissantes et Réseau espèces exotiques envahissantes outre-mer.

Valcárcel, Félix, L. Elhachimi, M. Vilá, L. Tomassone, M. Sánchez, S. M. A. Selles, M. Kouidri, et al. 2023. « Emerging Hyalomma Lusitanicum: From Identification to Vectorial Role and Integrated Control ». *Medical and Veterinary Entomology* n/a (n/a). https://doi.org/10.1111/mve.12660.

Valcárcel, Félix, Julia González, Marta G. González, María Sánchez, José María Tercero, Latifa Elhachimi, Juan D. Carbonell, et A. Sonia Olmeda. 2020a. « Comparative Ecology of Hyalomma Lusitanicum and Hyalomma Marginatum Koch, 1844 (Acarina: Ixodidae) ». *Insects* 11 (5): 303. https://doi.org/10.3390/insects11050303.

Vanderhoeven, Sonia, Etienne Branquart, Jean-Claude Grégoire, et Grégory Mahy. 2006. « Dossier scientifique réalisé dans le cadre de l'élaboration du Rapport analytique 2006-2007 sur l'état de l'environnement wallon ».

Vaughan, Jefferson A., Robert A. Newman, et Michael J. Turell. 2022. « Bird Species Define the Relationship between West Nile Viremia and Infectiousness to Culex Pipiens Mosquitoes ». *PLOS Neglected Tropical Diseases* 16 (10): e0010835. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010835.

Vial, L. 2009. « Biological and Ecological Characteristics of Soft Ticks (Ixodida: Argasidae) and Their Impact for Predicting Tick and Associated Disease Distribution ». *Parasite* 16 (3): 191-202. https://doi.org/10.1051/parasite/2009163191.

Vial, Laurence, Frédéric Stachurski, Agnès Leblond, Karine Huber, Gwenaël Vourc'h, Magalie René-Martellet, Isabelle Desjardins, et al. 2016. « Strong Evidence for the Presence of the Tick Hyalomma Marginatum Koch, 1844 in Southern Continental France ». *Ticks and Tick-Borne Diseases* 7 (6): 1162-67. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.08.002.

Voordouw, Maarten J. 2015. « Co-Feeding Transmission in Lyme Disease Pathogens ». *Parasitology* 142 (2): 290-302. https://doi.org/10.1017/S0031182014001486.

Wahl, R., et P. Forgeot. 1954. « Un cas d'infection naturelle du Lapin par Pseudomonas œruginosa ». *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* 107 (4): 147-50. https://doi.org/10.4267/2042/68611.

Walker, A R, A Bouattour, J L Camicas, Estrada-Pena, Ivan G. Horak, A Latif, Pegram, et PM Preston. 2003. « Ticks of Domestic Animals in Africa: A Guide to Identification of Species ».

Weaver, Scott C., Caroline Charlier, Nikos Vasilakis, et Marc Lecuit. 2018. « Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases ». *Annual Review of Medicine* 69 (1): 395-408. https://doi.org/10.1146/annurev-med-050715-105122.

Whitehouse, Chris A. 2004. « Crimean–Congo Hemorrhagic Fever ». *Antiviral Research* 64 (3): 145-60. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2004.08.001.

WHO. 2018. « Rift Valley Fever ». 2018. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rift-valley-fever.

WHO. 2020. « Maladies à transmission vectorielle ». 2020. https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases.

WHO. 2022. « Crimean-Congo haemorrhagic fever ». 2022. https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/crimean-congo-haemorrhagic-fever.

Williamson, Mark H., et Alastair Fitter. 1996. « The characters of successful invaders ». *Biological Conservation*, Invasion Biology, 78 (1): 163-70. https://doi.org/10.1016/0006-3207(96)00025-0.

Wilson, Anthony James, Eric René Morgan, Mark Booth, Rachel Norman, Sarah Elizabeth Perkins, Heidi Christine Hauffe, Nicole Mideo, Janis Antonovics, Hamish McCallum, et Andy

Fenton. 2017. « What is a vector? » *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 372 (1719): 20160085. https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0085.

Wilson, M.L., J.-P. Gonzalez, J.-P. Cornet, et J.-L. Camicas. 1991. « Transmission of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Virus from Experimentally Infected Sheep to Hyalomma Truncatum Ticks ». *Research in Virology* 142 (5): 395-404. https://doi.org/10.1016/0923-2516(91)90007-P.

Wise, L.n., L.s. Kappmeyer, R.h. Mealey, et D.p. Knowles. 2013. « Review of Equine Piroplasmosis ». *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27 (6): 1334-46. https://doi.org/10.1111/jvim.12168.

Woldehiwet, Zerai. 2006. « Anaplasma Phagocytophilum in Ruminants in Europe ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1078 (1): 446-60. https://doi.org/10.1196/annals.1374.084.

Wölfel, Roman, Janusz T. Paweska, Nadine Petersen, Antoinette A. Grobbelaar, Patricia A. Leman, Roger Hewson, Marie-Claude Georges-Courbot, Anna Papa, Stephan Günther, et Christian Drosten. 2007. « Virus Detection and Monitoring of Viral Load in Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Patients ». *Emerging Infectious Diseases* 13 (7): 1097-1100. https://doi.org/10.3201/eid1307.070068.

Woodall, J. P., M. C. Williams, et D. I. Simpson. 1967. « Congo Virus: A Hitherto Undescribed Virus Occurring in Africa. II. Identification Studies ». *East African Medical Journal* 44 (2): 93-98.

Wu, Jiahui, Xia Zhou, Qiaoqiao Chen, Zhiqiang Chen, Jinyu Zhang, Lele Yang, Yuxuan Sun, Guohui Wang, Jianfeng Dai, et Tingting Feng. 2022. « Defensins as a promising class of tick antimicrobial peptides: a scoping review ». *Infectious Diseases of Poverty* 11 (1): 71. https://doi.org/10.1186/s40249-022-00996-8.

Xie, X., Y. Li, A. T. Y. Chwang, P. L. Ho, et W. H. Seto. 2007. « How Far Droplets Can Move in Indoor Environments--Revisiting the Wells Evaporation-Falling Curve ». *Indoor Air* 17 (3): 211-25. https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.2007.00469.x.

Yadav, Pragya D., Sarah S. Cherian, Divya Zawar, Prasad Kokate, Rashmi Gunjikar, Santosh Jadhav, Akhilesh C. Mishra, et Devendra T. Mourya. 2013. « Genetic Characterization and Molecular Clock Analyses of the Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus from Human and Ticks in India, 2010–2011 ». *Infection, Genetics and Evolution* 14 (mars): 223-31. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.10.005.

Yen, Y. C., L. X. Kong, L. Lee, Y. Q. Zhang, F. Li, B. J. Cai, et S. Y. Gao. 1985. « Characteristics of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus (Xinjiang Strain) in China ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 34 (6): 1179-82.

Yesilbag, Kadir, Levent Aydin, Ender Dincer, Gizem Alpay, A. Onur Girisgin, Pelin Tuncer, et Aykut Ozkul. 2013. « Tick Survey and Detection of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Tick Species from a Non-Endemic Area, South Marmara Region, Turkey ». *Experimental and Applied Acarology* 60 (2): 253-61. https://doi.org/10.1007/s10493-012-9642-x.

Zehender, Gianguglielmo, Erika Ebranati, Renata Shkjezi, Anna Papa, Camilla Luzzago, Elena Gabanelli, Alessandra Lo Presti, et al. 2013. « Bayesian Phylogeography of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Europe ». Édité par Ana Paula Arez. *PLoS ONE* 8 (11): e79663. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079663.

Zeller, H.G., J.P. Cornet, et J.L. Camicas. 1994. « Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Virus Infection in Birds: Field Investigations in Senegal ». *Research in Virology* 145 (janvier): 105-9. https://doi.org/10.1016/S0923-2516(07)80012-4.

Zeng, Tian, Saleem Jaffar, Yijuan Xu, et Yixiang Qi. 2022. « The Intestinal Immune Defense System in Insects ». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (23): 15132. https://doi.org/10.3390/ijms232315132.

Zhong, Jianmin, Algimantas Jasinskas, et Alan G. Barbour. 2007. « Antibiotic Treatment of the Tick Vector Amblyomma Americanum Reduced Reproductive Fitness ». *PloS One* 2 (5): e405. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000405.

Zivcec, Marko, Florine Scholte, Christina Spiropoulou, Jessica Spengler, et Éric Bergeron. 2016. « Molecular Insights into Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus ». *Viruses* 8 (4): 106. https://doi.org/10.3390/v8040106.

Znari, Mohammed, Nawal Hichami, Mohammed Znari, et Nawal Hichami. 2018. « Biology, Life History Traits and Conservation of the Vulnerable Souss Valley Tortoise in Arid Areas of West Central Morocco ». In *Reptiles and Amphibians*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.74855.

Résumé :

La Fièvre Hémorragique de Crimée-Congo (FHCC) est une maladie virale zoonotique en recrudescence dans le bassin méditerranéen, se manifestant chez l'homme par un syndrome fébrile suivi parfois de graves hémorragies. Le Nairovirus responsable de la FHCC est principalement transmis par les tiques du genre *Hyalomma*, qui agissent à la fois en tant que vecteurs et réservoirs du virus. Certains hôtes vertébrés, tels que les bovins, les petits ruminants, les lapins et les hérissons, hébergent également temporairement le virus sans montrer de symptômes cliniques, ce qui en fait des sources potentielles d'infection pour les tiques. En raison de l'implantation croissante de la tique *Hyalomma marginatum* dans le sud de la France continentale et des cas récents de FHCC chez l'homme en Espagne, il est essentiel de comprendre la situation épidémiologique sur notre territoire. Une première enquête sérologique menée de 2014 à 2016 sur des bovins et des petits ruminants en Corse, où *H. marginatum* est présente depuis des décennies, a révélé la présence d'anticorps dirigés contre le VFHCC chez ces animaux. L'objectif général de cette thèse était de caractériser et spatialiser les risques sanitaires liés à la présence de la tique *H. marginatum*. Cette recherche a permis de proposer le premier modèle hypothétique du cycle de transmission de la FHCC en France, en prenant en compte les différents acteurs, notamment les tiques et leurs hôtes sauvages et domestiques. Les résultats de cette étude ont également permis de mettre à jour les données sérologiques précédemment obtenues en Corse et d'identifier des facteurs potentiels expliquant la présence d'anticorps dirigés contre la FHCC chez les bovins sur le continent. Cependant, à ce stade, la détection du virus dans les tiques n'a pas encore été réalisée, mais la présence d'autres agents infectieux a été évaluée, ce qui a contribué à préciser le risque associé à l'introduction et à l'expansion de la tique *H. marginatum* en France.

Mots clefs : Hyalomma marginatum, risque, agent pathogène, VFHCC, France

Abstract:

Crimean-Congo Haemorrhagic Fever (CCHF) is a zoonotic viral disease on the rise in the Mediterranean basin, causing in humans as a febrile syndrome sometimes followed by severe bleedings. The Nairovirus responsible for CCHF is mainly transmitted by ticks of the genus *Hyalomma*, which act as both vectors and reservoirs for the virus. Some vertebrate hosts, such as cattle, small ruminants, rabbits and hedgehogs, also temporarily harbor the virus without showing clinical symptoms, making them potential sources of infection for ticks. In view of the growing presence of the *Hyalomma marginatum* tick in the South of mainland France, and recent cases of CCHF in humans in Spain, it is essential to understand the epidemiological situation in France. An initial serological survey conducted from 2014 to 2016 on cattle and small ruminants in Corsica, where *H. marginatum* has been present for decades, revealed the presence of antibodies directed against the CCHF virus in these animals. The general objective of this thesis was to characterize and spatialize the health risks associated with the presence of the *H. marginatum* tick. This research has enabled us to propose the first hypothetical model of the CCHF transmission cycle in France, taking into account the various players involved, notably ticks and their wild and domestic hosts. The results of this study have also made it possible to update serological data previously obtained in Corsica, and to identify potential factors explaining the presence of antibodies to CCHFV in cattle on the mainland. At this stage, however, the virus has not yet been detected in ticks, but the presence of other infectious agents has been assessed, helping to clarify the risk associated with the introduction and spread of the *H. marginatum* tick in France.

Key-word: Hyalomma marginatum, risk, pathogen, CCHFV, France