



**HAL**  
open science

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

Camille Victoire Migné, Cécile Beck, Gaëlle Gonzalez, Sylvie Lecollinet, Sara Moutailler

### ► To cite this version:

Camille Victoire Migné, Cécile Beck, Gaëlle Gonzalez, Sylvie Lecollinet, Sara Moutailler. Quels outils pour la surveillance des arbovirus émergents au sein de leurs hôtes mammifères et vecteurs arthropodes ?. *Virologie*, 2021, 25 (1), pp.12-28. <10.1684/vir.2021.0880>. <hal-03160615>

**HAL Id: hal-03160615**

**<https://hal.science/hal-03160615v1>**

Submitted on 5 Mar 2021

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

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



HAL Authorization

# 1 **Quels outils pour la surveillance des arbovirus émergents au sein de** 2 **leurs hôtes mammifères et vecteurs arthropodes ?**

3 Camille Victoire Migné<sup>1,2</sup>, Cécile Beck<sup>2</sup>, Gaëlle Gonzalez<sup>2</sup>, Sylvie Lecollinet<sup>2</sup> et  
4 Sara Moutailler<sup>1</sup>

5 <sup>1</sup> UMR BIPAR, Laboratoire de Santé Animale, ANSES, INRAE, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,  
6 Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France

7 <sup>2</sup> UMR Virologie, Laboratoire de Santé Animale, ANSES, INRAE, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,  
8 Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France

## 9 **Résumé**

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

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

24

25

## 26 **Abstract**

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

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

## 38 **Introduction**

39 Les arbovirus (arthropod-borne viruses) sont des virus transmis à l'Homme et/ou à des  
40 animaux par des arthropodes hématophages [1]. Au moins 500 arbovirus ont été identifiés, la moitié  
41 étant transmise par des moustiques, un tiers par des tiques et le reste essentiellement par des  
42 phlébotomes et des moucheron piqueurs du genre *Culicoides* [2]. Les arbovirus peuvent être  
43 zoonotiques ou épizootiques. Les signes cliniques d'une arbovirose sont variables, allant de la simple  
44 fièvre, fatigue jusqu'à des signes cliniques plus sévères tels que des atteintes neurologiques ou des  
45 fièvres hémorragiques pouvant entraîner la mort. Ces virus sont importants en termes de santé  
46 publique puisqu'ils sont responsables d'épidémies dans certaines régions du monde. Par exemple,  
47 deux épidémies causées par deux virus transmis par des moustiques du genre *Aedes*, principalement  
48 par *Ae. albopictus* et secondairement *Ae. aegypti*, ont marqué le début du 21<sup>ème</sup> siècle : le virus Zika  
49 (ZIKV) en 2015-2016 sur le continent américain [3] et le virus Chikungunya (CHIKV) en 2005-2007 dans

50 l'océan Indien (île de la Réunion, Inde, Malaisie, Sri Lanka) [4]. Les arbovirus ont également un impact  
51 économique non négligeable notamment pour les élevages comme le virus de la fièvre catarrhale ovine  
52 (*bluetongue virus*, BTV), transmis par les moucheron du genre *Culicoides*, responsable de taux de  
53 morbidité et de mortalité élevés dans les élevages ovins. L'épizootie due à la souche BTV de sérotype  
54 8 (BTV-8) en Europe de 2006 à 2008 a eu un impact financier de l'ordre du milliard d'euros en France.  
55 En plus de l'impact direct de la maladie, les échanges commerciaux d'animaux et de produits animaux  
56 ont été bloqués [5].

57 Les arbovirus ont un cycle naturel qui implique des vecteurs arthropodes hématophages et des  
58 hôtes vertébrés. Leur transmission repose sur la compétence vectorielle de l'arthropode pour le virus.  
59 En effet, l'arthropode doit être capable d'acquérir le virus lors d'un repas sanguin sur un hôte infecté.  
60 Le virus doit ensuite infecter les cellules du tractus digestif et disséminer au sein du vecteur jusqu'à  
61 atteindre les glandes salivaires afin d'être transmis à un nouvel hôte lors d'un autre repas sanguin [6].  
62 Il a été démontré que les arbovirus pouvaient établir une infection persistante au sein des arthropodes.  
63 Ces derniers peuvent alors être considérés comme des vecteurs viraux mais également comme des  
64 réservoirs [7]. De plus, les arthropodes peuvent être porteurs de plusieurs virus, des cas de co-  
65 infections ayant déjà été rapportés chez les moustiques notamment [8]. La répartition géographique  
66 des arbovirus est donc à mettre en relation avec celle de leurs vecteurs pour lesquels des cartes de  
67 distribution sont généralement disponibles. En outre, le changement climatique et les activités  
68 humaines (déforestation, urbanisation, échanges internationaux...) ont (largement) contribué à  
69 modifier l'écologie et la distribution des vecteurs et ainsi à engendrer de nouvelles émergences virales  
70 [9-11]. De plus, au vu de l'intensification des échanges internationaux, le risque d'introduction de virus  
71 dans de nouvelles aires géographiques n'est pas négligeable notamment par le biais d'importation de  
72 vecteurs et/ou d'animaux infectés et amplificateurs (commerce légal ou illégal) [12].

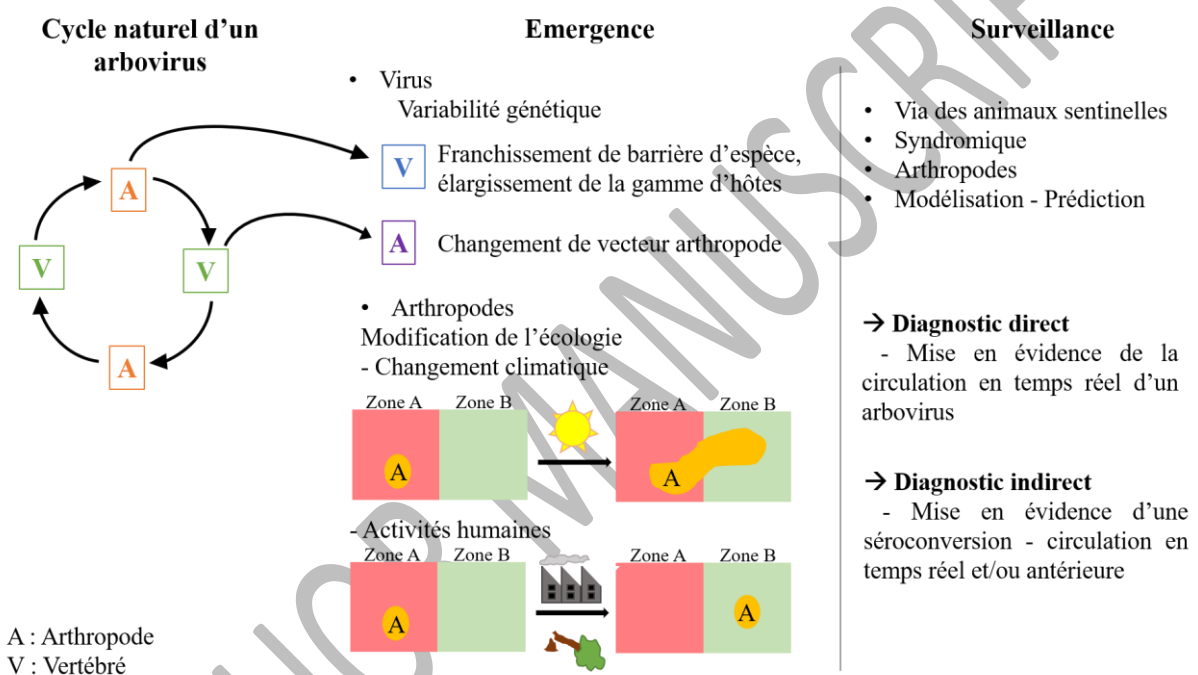
73 Les arbovirus appartiennent à dix familles virales : *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Asfarviridae*,  
74 *Nairoviridae*, *Peribunyaviridae*, *Phenuiviridae*, *Nyamiviridae*, *Rhabdoviridae*, *Reoviridae* et

75 *Orthomyxoviridae* [2]. La plupart des arbovirus animaux sont des virus à ARN, sauf le virus de la peste  
76 porcine africaine qui est un virus à ADN. Les virus à ARN ont un taux de mutation plus élevé que celui  
77 des virus à ADN en raison d'une absence d'activité de relecture de leur ARN polymérase ARN  
78 dépendante pendant la réplication [13]. D'autres événements peuvent participer à leur variabilité  
79 génétique comme des événements de recombinaisons, duplications de gènes, réassortiments de  
80 segments, etc. La population générée par la multiplication des virus dans une cellule est alors  
81 hétérogène mais ceux-ci sont proches génétiquement. Il s'agit de quasi-espèces virales qui ont une  
82 plasticité phénotypique importante et une grande capacité à s'adapter à de nouveaux hôtes et/ou  
83 environnements [14]. En outre, ces virus sont soumis à des sélections compétitives et aléatoires. Les  
84 pressions naturelles sont les plus efficaces pour la sélection des différents variants, notamment pour  
85 l'élimination des mutations à large effet. Parmi elles, les goulots d'étranglement réduisent fortement  
86 la variabilité génétique, et par conséquent, la taille des populations générées [15]. Par exemple, le  
87 franchissement de la barrière intestinale et des glandes salivaires du moustique, *Culex taeniopus*,  
88 représente un goulot d'étranglement qui impacte fortement la taille de la population du virus de  
89 l'encéphalite équine de l'Est [16]. En 2005-2007, CHIKV, responsable de l'épidémie dans l'océan Indien,  
90 présentait une mutation au niveau de la glycoprotéine E1 entraînant une substitution d'acide aminé  
91 (A226V) et permettant au virus d'infecter un autre vecteur, *Aedes albopictus*. Ce moustique a une  
92 répartition géographique beaucoup plus large qu'*Aedes aegypti*, l'habituel vecteur du CHIKV [17].

93 La circulation des arbovirus au sein d'une population animale peut se démontrer par recherche  
94 directe du virus au sein de l'hôte et/ou du vecteur ou par recherche indirecte d'une infection passée  
95 par le virus en mettant en évidence une séroconversion chez l'hôte vertébré. La surveillance peut se  
96 faire de différentes manières en utilisant, par exemple, des animaux sentinelles. Afin d'identifier les  
97 espèces sentinelles, ces dernières doivent être fortement exposées à l'arbovirus concerné et  
98 développer une séroconversion rapide lors de l'infection. Ces espèces ne doivent, cependant, pas  
99 participer au cycle de transmission. Leur séroconversion est un signe de première alerte. En Amérique  
100 du Nord, les poules (*Gallus gallus domesticus*) sont utilisées comme sentinelles pour les virus *West Nile*

101 (WNV) et de l'encéphalite équine de l'Est (EEEV) [18]. En Grèce, la séroconversion des pigeons  
102 domestiques (*Columba livia*) pour WNV a été démontrée avant les cas humains [19]. La surveillance  
103 syndromique est également utile à la détection de signaux anormaux groupés dans l'espace et le  
104 temps. La description de signes cliniques inhabituels par les vétérinaires et les professionnels de la  
105 filière animale peut être une première indication d'une maladie émergente [20]. L'intérêt de la  
106 surveillance syndromique a été montré *a posteriori* pour plusieurs épidémies telles que celle de BTV-8  
107 en Europe en 2006 [21] et de WNV en France en utilisant les signes neurologiques développés chez les  
108 équidés [22]. Pour le virus Schmallenberg, la baisse de production laitière a permis de mettre en  
109 évidence la circulation du virus en Belgique et aux Pays-Bas [23]. L'analyse spatiale des données issues  
110 de la surveillance syndromique, la distribution des vecteurs et les données climatiques permettent par  
111 la suite l'identification de zones hautement à risque pour des maladies vectorielles et de prédire  
112 d'éventuelles émergences [24]. Afin de prévenir l'apparition d'épidémies d'arbovirus, la surveillance  
113 de ces derniers au sein de leurs vecteurs ou des populations animales réservoirs ou sentinelles est une  
114 stratégie clé. La figure 1 schématise les différents processus qui peuvent être à l'origine d'une  
115 émergence virale ainsi que les moyens mis en œuvre pour la surveillance des arbovirus. En Europe, la  
116 surveillance des arbovirus est active ou événementielle (anciennement dite passive). En Italie, par  
117 exemple, la surveillance active des virus transmis par les moustiques (comme WNV) est faite par le  
118 biais de collectes d'arthropodes et de sérums d'animaux sentinelles (poules, chevaux en particulier)  
119 plusieurs fois durant la saison vectorielle (début juin à fin novembre)[25]. En France, la surveillance  
120 est, quant à elle, événementielle. Des prélèvements sont effectués sur des animaux ou individus  
121 malades lorsqu'une épizootie ou épidémie est suspectée. En cas d'émergence suspectée ou avérée, la  
122 surveillance active et la collecte d'arthropodes sont renforcées [25]. Pour les virus transmis par les  
123 tiques, la surveillance s'inscrit dans des programmes de recherche avec des collectes qui ont lieu  
124 seulement certaines années ou seulement sur certains territoires où l'on suppose que le virus circule  
125 afin de mesurer les prévalences de ces virus. La capture de tiques et hôtes réservoirs (souvent les  
126 rongeurs) demandent des efforts logistiques considérables en terme de temps de collecte et de moyen

127 humain. De plus, la plupart des arbovirus sont des virus zoonotiques à déclaration obligatoire, cela  
 128 permet de référencer pour chaque pays : (1) le nombre de cas humains auprès des *Centers for Disease*  
 129 *Control and Prevention* (CDC) ou de l'*European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), (2)  
 130 le nombre de cas animaux auprès de l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) ou *European*  
 131 *Food Safety Authority* (EFSA). Les déclarations des aires de répartitions des principales espèces  
 132 d'arthropodes vectrices d'arbovirus sont disponibles sur le site de vectornet  
 133 (<https://vectornet.ecdc.europa.eu/>).



134

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

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

142 **Etat de l'art**

143 **Outils classiques**

144 **Recherche directe du virus**

145 L'isolement viral est une technique utilisée pour la recherche directe d'un arbovirus. Cette  
146 méthode consiste à isoler et amplifier le virus, à partir d'un prélèvement, en cerveau de souriceau ou  
147 en embryon de poulet ou en culture cellulaire selon le virus recherché. Des techniques moléculaires  
148 comme la *reverse transcription - (RT-) polymerase chain reaction (PCR)* et le séquençage sont ensuite  
149 utilisées pour identifier le virus [26-29]. Cependant l'isolement viral est de moins en moins utilisé car  
150 il est plus onéreux, nécessite des infrastructures de confinement de niveau 3 minimum pour la plupart  
151 des arbovirus et du personnel formé. De plus cette technique est fastidieuse et chronophage. Le  
152 résultat est obtenu en général au bout de 7 jours minimum. L'isolement viral n'est pas une technique  
153 à privilégier en cas d'épidémie où une réponse rapide est attendue.

154 Les examens de laboratoire doivent être en lien avec les éléments cliniques et  
155 épidémiologiques. La technique la plus utilisée lors de la recherche directe d'un virus est la (RT-)PCR  
156 conventionnelle (en point final) s'appliquant sur une multitude d'échantillons : sang, liquide céphalo-  
157 rachidien (LCR), salive, écouvillon nasal, organes (cerveau, foie, rate, cœur ...) et arthropodes. La nature  
158 du prélèvement dépend bien évidemment si le diagnostic est à faire *ante* ou *post mortem*. La (RT-)PCR  
159 conventionnelle est très couramment utilisée en laboratoire puisqu'elle est peu coûteuse, facile à  
160 réaliser et rapide. La technologie de PCR est actuellement l'outil de biologie moléculaire indispensable.  
161 Il s'agit d'une technique, qui peut être hautement sensible et spécifique, pour la détection des acides  
162 nucléiques. La PCR consiste à amplifier de l'ADN *in vitro* et se déroule en trois étapes : dénaturation de  
163 l'ADN par chauffage, hybridation des amorces sens et anti-sens aux extrémités de la séquence cible à  
164 amplifier et une élongation assurée par une ADN polymérase. Ce cycle est répété jusqu'à 50 fois.  
165 Toutefois, la PCR en point final a été, au fil des années, remplacée par la PCR en temps réel ou PCR  
166 quantitative (qPCR) en laboratoire, plus fine et plus fiable. Au cours des dernières décennies, la  
167 technique PCR a évolué, au vu de son usage, et s'est étendue de façon considérable contribuant au



168 développement de la PCR en temps réel. Cette technique est devenue de plus en plus populaire et est  
169 basée sur la détection et la quantification d'un émetteur de fluorescence dont l'émission est  
170 directement proportionnelle à la quantité d'amplicons, augmentant ainsi la sensibilité analytique. La  
171 détection de l'amplicon peut se faire par le biais d'agents qui s'intercalent dans la double hélice  
172 d'ADN (ex : *SYBR Green I*) ou par sondes fluorescentes. Parmi les sondes, plusieurs types existent :  
173 hydrolyse de sondes (*TaqMan*), hybridation de 2 sondes (*HybProbes*), balises moléculaires (*Molecular*  
174 *Beacons*) et amorces scorpions (*Scorpion primers*) [30, 31].

175 La flexibilité de la PCR en temps réel offre plusieurs possibilités telles que les tests en multiplex.  
176 Plusieurs agents pathogènes sont testés en un seul essai sur un même échantillon. Les méthodes  
177 traditionnelles moléculaires ((RT-)PCR conventionnelle, PCR nichée, ...) utilisent beaucoup de réactifs  
178 par réaction et sont mono-spécifiques : un seul agent pathogène est testé à la fois. Certaines infections  
179 virales ne peuvent être discriminées en se basant seulement sur les signes cliniques. ZIKV et CHIKV,  
180 par exemple, sont responsables de signes cliniques similaires chez l'Homme. De plus, plusieurs  
181 arbovirus co-circulent et sont co-endémiques sur une même zone géographique. Dans ces zones, des  
182 tests qui identifient et quantifient rapidement plusieurs virus, sont nécessaires. Selon les techniques  
183 déjà mises en place, des tests dépistent entre deux et sept virus en une seule réaction. Ces méthodes  
184 en multiplex sont utiles pour le diagnostic, le dépistage et la surveillance des arbovirus. Certains  
185 laboratoires ont mis en place des (RT-)PCR multiplex permettant la détection simultanée de plusieurs  
186 virus : CHIKV/DENV/ZIKV/YFV/WNV et ZIKV/DENV/CHIKV à partir de prélèvements issus de patients,  
187 ZIKV/Spondweni (SPOV) sur des prélèvements de patients et sur des moustiques collectés,  
188 WNV/SLEV/Encéphalite équine de l'Ouest (WEEV) sur des pools de moustiques, etc [32-35]. La  
189 spécificité de cette approche offre la possibilité d'identifier les différents génotypes d'un même virus  
190 comme les six génotypes connus du virus CCHF [36]. Beaucoup de ces tests utilisent des sondes  
191 *TaqMan*. Les amorces et les sondes sont spécifiques au virus recherché. La conception de celles-ci est  
192 fait sur des régions conservées du génome, limitant ainsi les réactions croisées avec d'autres virus du  
193 même ordre, famille ou genre si ces régions sont suffisamment variables entre les espèces virales.

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

217 La recherche directe d'un virus est parfois complexe, chez l'Homme ou l'animal. Lors d'une  
218 infection à certains virus comme ZIKV et WNV, la phase de virémie est très courte voire inexistante.  
219 ZIKV est détecté dans le sang pendant la première semaine des signes cliniques mais la fenêtre de

220 détection est plus grande dans le sperme, le liquide amniotique, la salive et l'urine [40]. Pour les virus  
221 neurotropes, le prélèvement à privilégier est le LCR [41] ou l'encéphale en *post-mortem* [42]. Il est  
222 donc important de prendre en considération le tropisme du virus recherché et la technique utilisée  
223 pour le choix du prélèvement. Cependant, un résultat négatif en (RT-)PCR ne signifie pas qu'il faut  
224 écarter une infection virale. À cause d'une phase de virémie très courte chez les hôtes vertébrés, d'une  
225 forte proportion de cas asymptomatiques et des difficultés à déterminer le jour exact du début des  
226 signes cliniques, la recherche directe présente de nombreuses limites.

### 227 **Recherche indirecte du virus**

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

244 Le test de l'inhibition de l'hémagglutination (HIT) a très souvent été utilisé pour la surveillance  
245 sérologique des arbovirus. Le principe de cette technique repose sur la capacité des anticorps présents  
246 dans le sérum à inhiber l'agrégation des érythrocytes induite par le virus [47]. Les avantages de cette  
247 technique sont la rapidité de résultat (quelques heures), un coût unitaire faible et son application à  
248 des prélèvements provenant de différentes espèces animales. Cependant, l'HIT a ses limites puisqu'il  
249 ne distingue pas les isotypes d'anticorps et ne date donc pas l'infection. De plus, des réactions croisées  
250 surviennent au sein de certains sérocomplexes comme le sérocomplexe de l'encéphalite japonaise  
251 comprenant les virus *West Nile* (WNV), de l'encéphalite japonaise (JEV), de l'encéphalite de Murray  
252 Valley (MVEV), de l'encéphalite de Saint Louis (SLEV) et d'Usutu (USUV). La spécificité du test est donc  
253 diminuée, puisque dans certaines zones, les virus sont co-endémiques [46]. Par conséquent, un  
254 résultat positif avec l'HIT doit être ensuite confirmé par séroneutralisation [46, 48]. Selon l'OIE, la  
255 méthode sérologique de référence, la plus spécifique, est la séroneutralisation qui  
256 différencie notamment les infections dues à des virus appartenant à un même sérocomplexe [49]. Le  
257 principe de cette technique consiste à mettre en évidence la présence d'anticorps neutralisants dans  
258 le sérum d'un hôte vertébré via l'observation d'effets cytopathiques du virus sur une monocouche  
259 cellulaire. Les anticorps neutralisants inhibent une ou plusieurs étapes précoces du cycle viral  
260 (attachement du virus à la cellule, endocytose, fusion avec la membrane). La séroneutralisation donne,  
261 comme résultat, un taux d'anticorps neutralisants pour un virus donné au sein de l'hôte vertébré testé.  
262 Cette technique est standard, spécifique et peut être utilisée sur plusieurs espèces animales mais  
263 certaines réactions croisées subsistent encore. La méthode présente les mêmes désavantages que  
264 l'isolement viral (technique longue, infrastructure de confinement de niveau 3 minimum) [43, 46]. De  
265 ce fait, la séroneutralisation n'est pas un outil adéquat pour faire de la surveillance à grande échelle.  
266 Enfin, un personnel formé est nécessaire pour réaliser cette technique car l'interprétation des résultats  
267 est visuelle et subjective.

268 Le test sérologique le plus utilisé, de nos jours, pour mettre en évidence la séroconversion est  
269 le test ELISA, qui est un outil reproductible, rapide (résultat au bout de quelques heures) et peu

270 coûteux. Trois techniques d'ELISA sont couramment utilisées : ELISA de compétition, ELISA IgG indirect  
271 et ELISA de capture ou MAC ELISA (capture des IgM). De plus, des kits commerciaux sont disponibles  
272 et la technique est standardisée pour beaucoup d'arbovirus [43]. La technique ELISA est une technique  
273 immuno-enzymatique qui met en évidence visuellement une réaction antigène-anticorps. Une  
274 réaction colorée est produite par l'action d'une enzyme sur son substrat, l'enzyme étant  
275 préalablement couplée à l'anticorps de révélation. Cependant, les réactions croisées sont encore  
276 problématiques avec ce type de test car la plupart repose sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre les  
277 glycoprotéines d'enveloppe, très immunogènes, pour les virus enveloppés. Afin d'augmenter la  
278 spécificité des tests ELISA, certains kits utilisent des anticorps plus spécifiques tels que ceux dirigés  
279 contre la NS1 pour les flavivirus. De plus, la capture des IgM par MAC ELISA doit être ensuite confirmée  
280 par séroneutralisation d'après le CDC pour certains virus comme ZIKV et d'autres flavivirus [50].

281 La recherche simultanée de plusieurs arbovirus augmenterait l'efficacité de leur diagnostic et  
282 par conséquent leur surveillance. Des tests sérologiques multiplex permettent en une seule fois de  
283 visualiser la séroconversion pour un ou plusieurs virus ou d'autres agents pathogènes. Les tests en  
284 multiplex réduisent également les coûts par réaction. Des outils ont notamment été développés.  
285 Certains sérodiagnostics en multiplex reposent sur la technologie du Luminex®, qui est un système  
286 micro-fluidique utilisant des billes sur lesquelles sont couplés des antigènes. Plusieurs billes portant  
287 des antigènes différents peuvent être utilisées en simultané. Les anticorps contenus dans le sérum  
288 vont alors se fixer sur ces antigènes. La révélation se fait par le biais d'un anticorps secondaire anti-  
289 espèce marqué et d'un fluorochrome. Les avantages que cette technique apporte, par rapport à  
290 d'autres techniques de sérodiagnostic comme le test ELISA ou la séroneutralisation, sont de tester la  
291 réactivité d'un sérum face à plusieurs antigènes en un seul essai, un résultat rapide (un jour) et le non  
292 recours à une infrastructure de confinement de niveau 3 ou 4 [51-53]. Toutefois, des réactions croisées  
293 sont observées notamment pour les virus qui sont proches sur le plan antigénique comme les virus  
294 Louping ill et Encéphalite à tique [43]. Enfin, cette technique nécessite des investissements initiaux  
295 importants (achat de l'appareil : 40K€).

296 Actuellement, les méthodes utilisées pour l'identification des virus reposent pour beaucoup sur  
297 des techniques sérologiques comme les tests ELISA, la séroneutralisation ou des techniques  
298 moléculaires (PCR en temps réel). Le développement de tests en multiplex (sérologique et  
299 moléculaire), dans plusieurs laboratoires, a augmenté l'efficacité de la surveillance des arbovirus mais  
300 cela reste insuffisant, seulement quelques virus étant testés à la fois. Le dépistage à grande échelle  
301 reste limité avec ces techniques. Les techniques sérologiques montrent plus de limites dans la  
302 surveillance des arbovirus. Elles sont applicables seulement sur des échantillons de sérum de qualité  
303 issus de vertébrés supérieurs (non utilisable chez les arthropodes) et leur spécificité est parfois limitée  
304 du fait des réactions croisées qui peuvent survenir avec des virus proches d'un point de vue  
305 antigénique. Les techniques, décrites précédemment, sont toutes avec *a priori*. Les signes cliniques  
306 sont variés et similaires chez les hôtes vertébrés, y compris chez les humains. Les deux principaux  
307 syndromes sont les atteintes neurologiques et les fièvres hémorragiques. Les découvertes récentes de  
308 nouveaux arbovirus au sein des familles virales *Togaviridae*, *Flaviviridae* et *Bunyaviridae* suggèrent  
309 qu'une partie des arbovirus n'a pas encore été identifiée [54]. Ces découvertes démontrent la  
310 nécessité d'avoir des techniques de dépistage rapides et performantes des arbovirus qui facilitent  
311 l'identification et la mise en évidence de nouveaux virus à partir d'échantillons de terrain. L'approche  
312 moléculaire pour l'identification virale est alors indispensable et applicable à tout type d'échantillon  
313 (Homme, animal, arthropode). Les outils classiques sont limités face à la grande variabilité et diversité  
314 des arbovirus.

### 315 **Outils de nouvelle génération**

316 Afin d'optimiser la surveillance, il serait plus avantageux de pouvoir détecter les arbovirus au sein  
317 de leur vecteur pour avoir une image en temps réel de la circulation des arbovirus. La prédiction du  
318 risque d'émergence et/ou de ré-émergence, par conséquent d'épidémie, est ainsi plus efficace. La mise  
319 en place des moyens de lutte et la gestion du risque d'épidémie seraient plus rapides et efficaces.  
320 Cependant les prévalences des arbovirus dans leurs vecteurs arthropodes étant faibles (<1%), un très

321 grand nombre d'arthropodes doit être collecté dans différents sites, puis identifié par des  
322 entomologistes, rendant ces investigations à large échelle rares [55]. Les outils de nouvelle génération  
323 répondent à plusieurs contraintes pour assurer l'efficacité de la surveillance des arbovirus. : ,  
324 sensibilité et spécificité du test, rapidité, rentabilité, application sur différents types d'échantillons  
325 (mammifères/arthropodes) et/ou application directe sur le terrain, dépistage à très large échelle voire  
326 sans *a priori*.

### 327 **(RT)-LAMP**

328 Parmi toutes les innovations pour le diagnostic moléculaire des arbovirus, la technologie LAMP  
329 (Loop-mediated isothermal amplification) rassemble beaucoup d'avantages : rapidité du test, très  
330 faible coût, pas d'investissements initiaux coûteux, grande spécificité, technique facile à mettre en  
331 œuvre, etc. La technologie LAMP n'est pas récente, elle a été mise au point en 2000 [56] mais ce n'est  
332 que depuis environ 10 ans qu'elle est utilisée pour la détection des arbovirus. Cette technologie permet  
333 de faire un diagnostic sensible et plus spécifique que la PCR conventionnelle en un temps très court  
334 (45 à 90 min) sans avoir à extraire les acides nucléiques au préalable. La sensibilité de la (RT)-LAMP est  
335 supérieure à celle de la PCR conventionnelle et comparable à celle de la PCR en temps réel. La  
336 sensibilité et la spécificité de la technique pour chaque virus ciblé sont détaillées dans les différentes  
337 études citées. La limite de détection de la (RT-) LAMP est de quelques copies de génome viral [56]. De  
338 plus, les équipements nécessaires pour réaliser cette technique se résument à un bain marie, pouvant  
339 être portatif. Les techniques de PCR classique ou de PCR en temps réel demandent des équipements  
340 sophistiqués nécessitant un investissement initial coûteux et des maintenances régulières. La  
341 technique de (RT)-LAMP peut représenter un substituant de la PCR dans les laboratoires à faibles  
342 moyens financiers et peut également être utilisée directement sur le terrain. Le principe de la  
343 technique repose sur l'activité de l'ADN polymérase I de la bactérie *Bacillus stearothermophilus* (Bst)  
344 qui ne nécessite pas de variation des températures d'incubation pour l'amplification de la séquence  
345 ADN cible. Le processus est isotherme avec une température de l'ordre de 60-65°C. Afin d'assurer la  
346 spécificité, plusieurs amorces sont utilisées, en général 2 à 3 paires d'amorces : amorces externes,

347 amorces internes et des amorces supplémentaires permettant une amplification cyclique à partir des  
348 structures en boucle. Les différentes étapes du processus sont très bien schématisées dans l'article de  
349 T. Notomi *et al.*, 2000 [56]. La conception des amorces se fait dans les régions les plus conservées des  
350 génomes. L'alignement de différentes séquences d'un même virus est nécessaire pour visualiser ces  
351 régions conservées pour maximiser la spécificité du test. La révélation peut se faire de différentes  
352 manières : à l'œil nu grâce à un indicateur de pH (changement de couleur du mélange réactionnel) ou  
353 sous lampe UV avec l'utilisation d'un intercalant d'ADN, à la turbidité (lors de la précipitation du réactif  
354 pyrophosphate de magnésium), ou par mesure de la fluorescence dans un fluorimètre avec l'utilisation  
355 d'un intercalant d'ADN [57-59]. La révélation à l'œil nu a l'avantage d'être gratuite car elle ne nécessite  
356 pas d'équipement supplémentaire. La technique est également applicable sur des ARN viraux en  
357 utilisant une transcriptase inverse en début de réaction dans le même mélange réactionnel que l'ADN  
358 polymérase Bst [56].

359 L'outil a été mis au point pour le diagnostic de plusieurs agents pathogènes, y compris des  
360 arbovirus. Le développement du test pour le virus DENV a montré une bonne sensibilité à 95% et une  
361 spécificité de 100% dans des échantillons de patients. Les essais ont été conduits sur des cultures  
362 virales mais également sur des échantillons sanguins provenant de patients infectés. Aucune réaction  
363 croisée avec d'autres flavivirus n'a été détectée. La discrimination des 4 sérotypes de DENV est permise  
364 [60]. Le diagnostic de ZIKV avec cette technique est également réalisable. Des essais ont été effectués  
365 en utilisant un bain marie portatif, une révélation à l'œil nu et en intégrant préalablement une étape  
366 de libération des acides nucléiques avec une protéolyse alcaline. La méthode est en adéquation avec  
367 une utilisation sur le terrain, dans des zones rurales endémiques sur différents types d'échantillon tels  
368 que l'urine, la salive et le sérum. De plus, la RT-LAMP ZIKV développée lors de cette étude montre une  
369 sensibilité et spécificité supérieure à celles retrouvées en PCR conventionnelle. La sensibilité du test  
370 est 10 à 100 fois plus élevée et la spécificité est assurée par des amorces qui reconnaissent entre 6 et  
371 8 cibles d'une séquence génétique. L'ADN polymérase Bst est très efficace même en présence  
372 d'inhibiteurs de PCR en forte concentration dans des échantillons bruts. La technique est robuste et



373 fiable. Son développement permet un diagnostic rapide et précoce facilitant par la suite la mise en  
374 place des mesures sanitaires adéquates et des traitements appropriés aux patients dans les zones  
375 endémiques [61]. La (RT)-LAMP est utilisable directement sur les arthropodes. Une étude, en Australie,  
376 a mis au point la technique avec révélation par colorimétrie pour la détection et la surveillance de la  
377 souche wMel de *Wolbachia* directement sur des populations de moustiques *Ae. aegypti* collectés sur  
378 le terrain [62]. Il a été montré que la présence de wMel *Wolbachia* au sein des moustiques pouvait  
379 réduire leur infection par les virus DENV, ZIKV, CHIKV, YFV et Mayaro. La sensibilité du test est  
380 équivalente à celle retrouvée en PCR en temps réel, la technique de référence pour la détection de la  
381 souche wMel de *Wolbachia*. La (RT)-LAMP est alors un bon candidat, peu onéreux, pour remplacer le  
382 test en (RT)-PCR temps réel. Cependant la révélation par colorimétrie est visuelle et peut induire des  
383 biais puisqu'elle est subjective. Des résultats douteux surviennent lorsque le changement de couleur  
384 n'est pas franc mais leur fréquence reste très faible. Dans cette étude, 1% des échantillons était  
385 concerné [62]. La (RT)-LAMP a été mise au point pour d'autres arbovirus tels que JEV sur des cultures  
386 virales, d'échantillons de patients (LCR), de cerveaux de chauve-souris et de selles [63, 64]. En  
387 Californie, la surveillance efficace de WNV, SLEV et WEEV directement au sein de leurs moustiques  
388 vecteurs est possible grâce à la (RT)-LAMP. Les amorces SLEV et WEEV développées dans cette étude  
389 peuvent être combinées et ont une très grande spécificité et sensibilité [65]. La spécificité et la  
390 sensibilité qu'offre la (RT)-LAMP est telle que la discrimination de différentes souches d'un même virus  
391 est réalisable. L'équipe d'Hayasaka *et al* a mis au point la technique pour les 3 souches de TBEV  
392 (*European, Siberian, Far Eastern*) sur des échantillons de souris infectées en laboratoire. Les auteurs  
393 ont également montré que la technique est applicable sur du sang humain et des tiques en mélangeant  
394 ces échantillons avec du virus. L'amplification du gène viral n'est pas inhibée dans ces deux types  
395 d'échantillons [66].

396 La technique de la (RT)-LAMP présente beaucoup d'avantages tels que la rapidité de test, une  
397 sensibilité et une spécificité équivalentes ou plus grandes qu'en PCR conventionnelle, un équipement  
398 peu onéreux (bain marie), réalisable directement sur le terrain, etc. Néanmoins, la conception des

399 amorces et des sondes implique la disponibilité de séquences en nombre suffisant afin d'affiner au  
400 mieux la sensibilité et la spécificité de la méthode. La (RT-)LAMP permet le diagnostic d'un nombre  
401 très limité de virus à la fois. Les tests de (RT-)LAMP seraient à utiliser en ayant une idée du virus ou de la  
402 famille virale à incriminer ou bien en ayant à disposition une série d'amorces différentes pour réaliser  
403 les tests sur le terrain.

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

405 Au vu du nombre élevé d'arbovirus pathogènes pour l'Homme et les animaux, de co-infections  
406 chez les arthropodes, des interactions entre agents pathogènes, de la diffusion des vecteurs suite à  
407 l'intensification des échanges internationaux, ou encore de la modification des activités humaines et  
408 le réchauffement climatique, des nouveaux outils d'investigation à haut débit sont nécessaires voire  
409 indispensables pour assurer au mieux la surveillance des arbovirus. La (RT-)PCR en temps réel à haut  
410 débit semble être la technique qui allie les avantages des techniques multiplex et simplex : dépister  
411 plusieurs virus en un seul essai et avoir une bonne sensibilité et spécificité de test. La méthode haut  
412 débit permet à la fois la surveillance des agents pathogènes les plus répandus et des « oubliés » ou  
413 rares, directement chez le vecteur arthropode. Le volume total d'ADN et/ou d'ARN utilisés est très  
414 faible par échantillon (1,5 à 2,7 µL), ce qui est très avantageux pour les échantillons d'arthropodes pour  
415 lesquels habituellement un faible volume d'ADN et/ou ARN est disponible. Afin de réaliser une  
416 meilleure surveillance épidémiologique des agents pathogènes transmis par des arthropodes, il est  
417 nécessaire de tester un maximum d'agents en une seule fois [67]. L'équipe de Michelet *et al.* a mis au  
418 point un outil moléculaire haut débit, s'appuyant sur la technologie de la (RT)PCR en temps réel pour  
419 la détection des bactéries et parasites chez la tique [68]. Cette dernière est le premier vecteur d'agents  
420 pathogènes en Europe car elle peut transmettre une très grande variété d'agents (bactéries, parasites  
421 et virus) [69]. Dans l'étude, un système micro-fluidique (BioMark™ dynamic array system, Fluidigm)  
422 est utilisé et permet de faire en une seule fois, respectivement, 2304 et 9216 réactions en utilisant des  
423 puces 96.96 et 48.48 (nombre d'échantillons . nombre de cibles). Le volume réactionnel est très faible  
424 (6nL, volume final par réaction individuelle) réduisant considérablement le coût par réaction (0,30€).

425 Les amorces et les sondes *TaqMan*, utilisées dans cette étude, ont été conçues pour chaque agent  
426 pathogène. Leur spécificité a d'abord été testée *in silico* en utilisant le logiciel *Blast* [67, 68]. La  
427 sensibilité de la technique peut être réduite du fait d'un faible volume réactionnel et d'ADN ou d'ARN  
428 par échantillon. Afin de pallier cela, une étape de pré-amplification est préalablement effectuée avec  
429 les mêmes amorces utilisées ensuite pour la PCR en temps réel [68]. Cette technique a ensuite été  
430 étendue aux virus transmis par les tiques [70], puis aux virus transmis par les moustiques [71]. Une  
431 étude menée sur 18 135 nymphes d'*Ixodes ricinus* collectées dans 13 sites européens (France,  
432 Royaume-Uni, Pays-Bas, Danemark et Suède) avait pour but de tester la présence de 21 virus transmis  
433 par les tiques et d'en estimer leur prévalence. Deux virus, Uukuniemi (UUKV) et un *Phlebovirus*, ont  
434 été détectés pour la première fois en Suède et aux Pays Bas. Le virus Eyach (EYAV), appartenant à la  
435 famille *Reoviridae* et au genre *Coltivirus*, a notamment été détecté lui aussi pour la première fois aux  
436 Pays Bas. La prévalence de virus connus chez les populations de tique et responsables de problèmes  
437 sanitaires a été estimée [70]. De plus, grâce à cet outil à haut débit, 64 virus transmis par les  
438 moustiques peuvent être testés/détectés sur un même moustique ou pool de moustiques en une seule  
439 fois. Une surveillance épidémiologique a été réalisée sur 17 958 moustiques collectés dans six pays  
440 (Cambodge, Sénégal, Brésil, Guyane, Guadeloupe et Suriname), incluant des pays qui sont endémiques  
441 pour certains arbovirus et d'autres qui ont connu des épidémies de ZIKV et de fièvre jaune (*yellow*  
442 *fever virus*, YFV). La technique à haut débit a détecté des virus endémiques (ZIKV, YFV) et un virus  
443 inattendu, le virus Trivittatus (TVT), un orthobunyavirus [71]. Les avantages de cet outil sont variés :  
444 prix faible par réaction (0,30€), rapidité (résultats au bout de 4 heures) et la modularité et la flexibilité  
445 du système. Contrairement à d'autres tests où les cibles sont fixes, grâce à cet outil il est possible de  
446 s'adapter à différentes situations épidémiologiques et des cibles peuvent être facilement ajoutées [68,  
447 70, 71]. Là encore l'inconvénient principal réside dans le prix de l'appareil, i.e. 250k€.

448 Les outils de PCR haut débit peuvent également être utilisés pour une approche syndromique des  
449 infections virales chez l'Homme et l'animal. Un nouvel outil de diagnostic moléculaire de (RT-)PCR en  
450 temps réel à haut débit s'appuyant sur la technologie LightCycler 1536® (Roche) a été récemment mis

451 au point [72]. Chez les équidés, les affections nerveuses se classent au 4<sup>ème</sup> rang des causes de  
452 mortalité et représentent un impact sanitaire majeur pour la filière équine [73]. Parmi les virus  
453 responsables d'encéphalites équines, les deux tiers sont zoonotiques et/ou vectorisés par des  
454 arthropodes. Le LightCycler 1536® permet la détection moléculaire d'ARN et d'ADN à haut débit. En  
455 effet, 1536 réactions de (RT-)PCR sont faites en une fois sur une seule plaque. Le volume réactionnel  
456 est faible (0,6 à 2µL), réduisant ainsi le coût (0,065€ / réaction). Il existe une grande flexibilité dans la  
457 programmation. Il est par exemple possible de tester 32 cibles sur 48 échantillons ou encore 1536  
458 cibles sur un seul échantillon. Le produit du nombre de cibles et du nombre d'échantillons doit faire  
459 un total de 1536 [74]. La mise au point de cet outil s'appuie sur les études de (RT-)PCR à haut débit  
460 décrites précédemment. Au cours de cette étude, la méthode a permis, en un seul essai, de détecter  
461 28 génomes viraux et la discrimination de certaines lignées ou génotypes viraux comme pour les  
462 lignées 1 et 2 de WNV. La spécificité est correcte voire très bonne selon les couples d'amorces et sonde  
463 utilisés. Une sensibilité légèrement plus faible a été notée en comparaison avec un outil de RT-PCR en  
464 temps réel simplex. Cette diminution de sensibilité peut être expliquée par la faible quantité utilisée  
465 de matériel biologique avec le LightCycler 1536®. Afin de palier cela, une étape supplémentaire de pré-  
466 amplification pourrait être appliquée. Dans cette étude, les échantillons testés étaient des souches  
467 de références issues de culture cellulaire, d'ADN de synthèse et des échantillons terrains (encéphale,  
468 sang, liquide céphalo-rachidien, écouvillon nasal) pour lesquels l'étiologie infectieuse n'était pas  
469 toujours connue [72].

470 Enfin, les équipements nécessaires pour la réalisation de ces tests de (RT-)PCR en temps réel à  
471 haut débit représentent des investissements initiaux conséquents. La conception des différentes  
472 amorces et sondes implique, là aussi, que les séquences des agents pathogènes soient disponibles et  
473 en nombre suffisant. Enfin, ces techniques nécessitent un personnel formé. Il s'agit de techniques de  
474 pointe disponibles dans un nombre limité de laboratoires mais elles représentent un réel atout pour  
475 les programmes de surveillance des arbovirus. Elles permettent un dépistage à large échelle, pouvant

476 mettre en évidence des arbovirus émergents (nouveaux foyers d'animaux malades) et par conséquent  
477 anticiper des décisions quant aux risques d'émergence dans de nouvelles aires géographiques.

#### 478 **Puces à ADN**

479 La diversité et la variabilité des arbovirus représentent une difficulté de taille pour leur  
480 détection et leur surveillance. Des puces à ADN ont été mises au point pour la détection des arbovirus  
481 au sein des arthropodes, à partir de prélèvements de mammifère, etc. Le principe de la puce à ADN  
482 repose sur l'hybridation par complémentarité entre un ADN à tester (cible) et des fragments  
483 nucléiques (sondes), fixés sur un support solide. Cette réaction permet la détection et l'identification  
484 de la ou les séquence(s) présentes dans l'échantillon, de manière très spécifique. L'analyse se fait grâce  
485 à l'acquisition d'un signal de fluorescence émis. Les hybridations spécifiques sont ainsi localisées sur la  
486 puce puisque la position des différentes sondes est connue [75]. Depuis le développement de la  
487 première puce à ADN sur membrane, tout un éventail de puces à ADN différentes a été développé :  
488 sur lame de verre, électronique, en milieu liquide, à haute densité de billes et à haute densité [75, 76].  
489 Les puces à ADN sont à l'interface entre un diagnostic avec *a priori* et un diagnostic sans *a priori*. Les  
490 sondes immobilisées sur le support solide sont élaborées à partir des banques de données déjà  
491 connues et disponibles mais, du point de vue du manipulateur, le diagnostic est fait sans *a priori*. La  
492 puce à ADN a tout à fait sa place en virologie. Elle a notamment permis la caractérisation du virus SARS-  
493 CoV (severe acute respiratory syndrome-coronavirus) [77]. Elle permet, en outre, une approche  
494 multiplexe avec une part d'*a priori* moindre par rapport aux techniques décrites précédemment. Les  
495 puces sont construites à partir des genres viraux et/ou d'arthropodes et plusieurs genres peuvent être  
496 ajoutés. Un prototype de puce a été élaboré à partir du gène de la protéine NS5 de 33 flavivirus, de  
497 l'ARN ribosomique de 4 genres différents de moustiques et du gène du cytochrome *b* de 8 espèces de  
498 mammifères. Les échantillons utilisés pour cette étude étaient des cultures de virus produites en  
499 laboratoire, des moustiques infectés artificiellement avec 14 virus différents et du sang de mammifères  
500 non infectés (singe, mouton, vache, chien, poule, cochon, chèvre, cheval et homme). Le prototype a  
501 identifié 13 flavivirus sur les 14 utilisés et différencié les 4 genres de moustiques (*Aedes*, *Armigeres*,

502 *Culex* et *Mansonia*) et les mammifères [78]. L'équipe de Grubaugh *et al.* a mis au point une puce à ADN  
503 pour la détection et l'identification de virus appartenant aux genres *Flavivirus*, *Alphavirus*,  
504 *Orthobunyavirus* et *Phlebovirus*. Pour cela, 3 gènes de chaque genre viral ont été utilisés. Au total 12  
505 groupes de sondes ont été conçus, 3 pour chaque genre et des sous-groupes ont été constitués avec  
506 des sondes plus spécifiques pour les différents clades de virus. Par exemple, pour les flavivirus, le gène  
507 utilisé est celui de la NS5. Cet essai a été mené sur 20 flavivirus, 14 alphavirus, 6 phlebovirus et 12  
508 orthobunyavirus. Les limites de détection de la puce ont été estimées en utilisant des moustiques  
509 infectés au laboratoire avec WNV et les virus Sindbis et fièvre de la vallée du Rift (*Rift valley fever virus*,  
510 RVFV). . Tous les virus ont été détectés et la discrimination des virus proches, comme les différentes  
511 lignées de JEV et DENV, a été permise grâce à la grande spécificité de la puce. La sensibilité de la puce  
512 semble légèrement supérieure à celle de la PCR conventionnelle et de la PCR en temps réel. Cette  
513 puce à ADN a été mise au point dans le but de faire un dépistage à grande échelle dans un temps  
514 réduit. Les auteurs ont testé, en une seule expérimentation, 1 445 moustiques de terrain collectés en  
515 Thaïlande avec une sensibilité comparable aux autres techniques de PCR [79].

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

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

524 Le choix des virus à détecter dépend des signes cliniques observés chez le patient et des  
525 contextes épidémiologique et épidémique où il se trouve. Des facteurs anthropiques (urbanisation,  
526 déforestation, mondialisation : échanges internationaux, ...), climatiques (réchauffement climatique),

527 biologiques (variabilité génétique des virus, ...) sont parfois à l'origine d'émergence d'arbovirus dans  
528 de nouvelles aires géographiques. Les techniques moléculaires en multiplex et à haut débit testent un  
529 grand nombre de virus mais ne mettent pas en évidence de nouveaux virus émergents non  
530 caractérisés. Les techniques de séquençage à haut débit (NGS) sont utilisées pour faire du diagnostic  
531 et de la surveillance sans *a priori*.

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

553 converti en ATP par l'ATP sulfurylase lors de l'incorporation d'un dNTP complémentaire. Cet ATP agit  
554 comme un catalyseur pour la luciférase qui convertit la luciférine en oxyluciférine, générant ainsi de la  
555 lumière [83]. Selon les plateformes utilisées pour les deux méthodes décrites précédemment, la  
556 capacité de séquençage, la tailles des *reads* et le temps d'obtention diffèrent. La technique Illumina  
557 offre une capacité de séquençage comprise entre 8 et 600 giga bases, la taille des *reads* entre 100 à  
558 300 bases et le temps d'obtention d'une séquence varie entre 14 et 27 jours. Le pyroséquençage, quant  
559 à lui, a une capacité comprise entre 100 méga bases et 32 giga bases. La taille des *reads* est entre 100  
560 et 700 bases et le temps d'obtention d'une séquence entre 4h et 7h. Pour l'analyse, l'alignement des  
561 *reads* génère des séquences et leurs chevauchements sont appelés contigs. Une séquence complète  
562 est obtenue à partir de l'assemblage de ces contigs. Cependant, les techniques de séquençage NGS  
563 conduisent à l'analyse d'un nombre important de petits fragments. La qualité du séquençage est  
564 dépendante de la longueur et de la continuité des contigs et enfin de la profondeur du séquençage qui  
565 déterminent le pourcentage de couverture de la séquence. Des trous dans les séquences obtenues  
566 peuvent être observés. L'analyse des séquences nécessitent des outils bio-informatiques performants,  
567 adaptés à l'objectif de l'étude et un personnel formé en bio-informatique.

568 Ces techniques NGS ont déjà fait leur preuve et mis en évidence la présence de certains virus  
569 dans de nouvelles aires géographiques ainsi que la découverte de nouveaux virus émergents. EYAV a  
570 notamment été mis en exergue au sein de tiques collectées en France dans les régions Alsace et  
571 Ardennes lors d'une étude sur le virome de la tique la plus présente en Europe, *Ixodes ricinus*. Le  
572 séquençage a été effectué avec le séquenceur Illumina HiSeq2000. Les contigs obtenus (395 pour les  
573 échantillons d'Alsace et 150 pour ceux des Ardennes) ont révélé la présence de différents virus  
574 appartenant à différents genres viraux tels que *Nairovirus*, *Phlebovirus*, *Orthobunyavirus*, *Coltivirus*,  
575 *Vesiculovirus*, *Sigmavirus*, etc Parmi les contigs, 19 correspondaient aux 12 segments d'un génome  
576 viral appartenant au genre *Coltivirus*. EYAV a été isolé, à partir d'une tique, en cerveau de souriceau  
577 *Interferon- $\alpha/\beta$  receptor* (IFNAR<sup>-/-</sup>) pour la première fois en France. Une prévalence pour ce virus de  
578 0,35% à 5,26% a été observée au sein des tiques collectées selon leur stade (larves, nymphes et



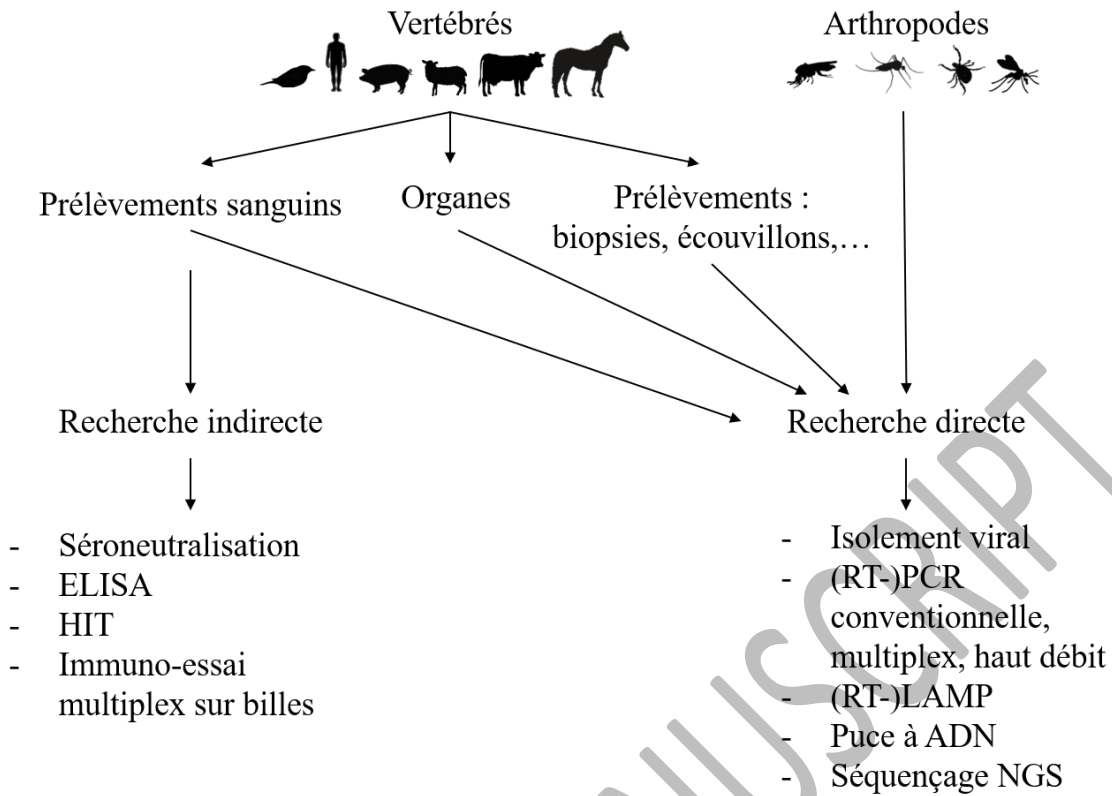
579 adultes). Cette étude a également mis en évidence la présence de deux nouveaux virus : un *Nairovirus*  
580 et un *Phlebovirus* mais qui n'ont pu être isolés [84]. La technique de séquençage NGS haut débit  
581 représente un outil moderne pour la surveillance des arbovirus au sein de leurs vecteurs arthropodes.  
582 Elle peut être combinée avec du *barcoding* moléculaire. Le procédé de *metabarcoding* a un champ  
583 d'application très large et peut être notamment utilisé pour la surveillance des vecteurs arthropodes.  
584 Le séquençage simultané d'un très grand nombre d'échantillons est possible. L'équipe de Batovska *et*  
585 *al.* a mis au point le *metabarcoding* pour la surveillance des moustiques et du virus *Ross river* (RRV) en  
586 Australie. Dans cette étude, le *metabarcoding* identifie les 3 espèces de moustiques (collectés sur  
587 terrain) utilisées pour l'étude : *Aedes camptorhynchus*, *Anopheles annulipes* et *Aedes notoscriptus*.  
588 L'identification des différentes espèces de moustiques et de RRV se base, respectivement, sur la sous-  
589 unité I de la cytochrome c oxydase (COI) et le gène de la glycoprotéine E2. Après amplification de ces  
590 gènes d'intérêt, des séquences *barcodes* sont ajoutées aux ADNc obtenus. Le séquençage a ensuite  
591 été effectué avec un séquenceur MiSeq illumina. La sensibilité de la technique est telle que RRV a été  
592 détecté dans un pool contenant 1000 moustiques avec seulement un moustique infecté[85].

593 Les techniques NGS sont en perpétuelle évolution, la 3<sup>ème</sup> génération de séquençage est  
594 dorénavant disponible. Contrairement au séquençage de 2<sup>ème</sup> génération, la 3<sup>ème</sup> génération ne  
595 nécessite pas d'étape d'amplification de l'ADN ou de l'ARN ou d'étape de rétro-transcription pour les  
596 ARN. Il existe 3 technologies de séquençage mises au point : via des nanopores par détection des bases  
597 successives d'une molécules d'ADN (lecture directe), en temps réel avec synthèse du brin d'ADN  
598 complémentaire par le biais d'une polymérase et basée sur des techniques de microscopie [86]. Le  
599 séquençage de 3<sup>ème</sup> génération a déjà sa place dans le domaine de la virologie. Il a notamment été  
600 utilisé pour la surveillance du virus Ebola via la technologie du MinION (séquençage par nanopores)  
601 [87]. Son format aussi grand qu'une clé USB et sa lecture directe, sans étape de pré-amplification au  
602 préalable, offrent la possibilité de l'utiliser directement sur le terrain. Le séquençage se fait au niveau  
603 de nanopores protéiques placés sur une membrane présentant une résistance électrique. Ces  
604 nanopores sont traversés par un courant ionique. Lorsque des acides nucléiques passent dans le

605 nanopore, ce courant est perturbé. La perturbation est caractéristique d'une base et la séquence est  
606 établie à partir de son enregistrement [88]. Le MinION est déjà utilisé pour la surveillance de certains  
607 arbovirus comme RRV. Ce virus a pu être détecté et identifié à partir d'un seul moustique infecté[89].  
608 Le séquençage haut débit a permis de faire un bond en avant en terme de surveillance des arbovirus.  
609 Les 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> générations de séquençage permettent en un temps record d'obtenir des séquences  
610 de génomes complets à la fois de virus mais également d'arthropodes. Les génomes complets de  
611 beaucoup d'arthropodes vecteurs sont dorénavant disponibles sur des bases de données comme  
612 VectorBase (<https://www.vectorbase.org/>) ou bien InsectBase [90]. De ce fait, l'analyse de séquences  
613 est plus rapide et optimisée, la différenciation entre séquences attendues ou non est possible, ce qui  
614 permet de faire un tri plus rapide et de retirer les séquences « exogènes » dans les analyses.

Tableau 1: Récapitulatif des différentes méthodes de diagnostic des arbovirus

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



617

618

Figure 2: Prise en charge de l'échantillon selon sa nature lors d'un dépistage d'un ou des arbovirus

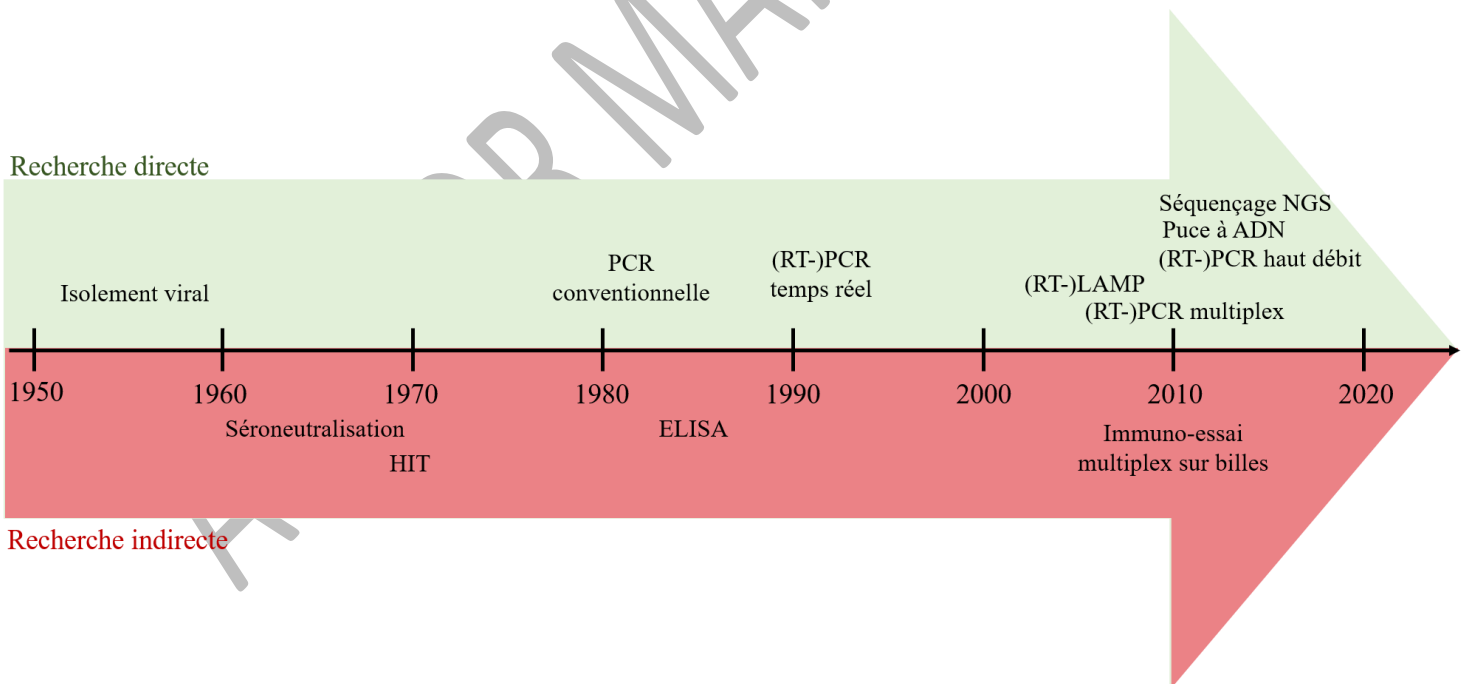


Figure 3: Représentation chronologique du développement des grands outils utilisés pour la détection des arbovirus

## 619 **Enjeux majeurs pour les prochaines décennies**

620 Dans cette revue, les outils classiques et de nouvelle génération, utilisés pour la surveillance des  
621 arbovirus, ont été décrits et sont applicables de manière générale en virologie. Le tableau 1 les résume  
622 et la figure 2 représente la prise en charge d'un échantillon selon sa nature. Au vu du nombre  
623 d'arbovirus déjà identifiés et de leur grande variabilité génétique, il est nécessaire voire indispensable  
624 d'avoir des outils ayant une grande flexibilité pour leur surveillance. Les virus ont des grandes capacités  
625 d'adaptation qui leur permettent d'émerger dans de nouvelles zones géographiques et/ou de franchir  
626 les barrières d'espèces. Au fil des décennies, la surveillance des arbovirus a considérablement évolué  
627 grâce à toutes les technologies innovantes qui ont vu le jour. Les techniques sont, aujourd'hui, plus  
628 spécifiques, sensibles et rapides (figure 3). De plus, le coût par réaction est maintenant très faible,  
629 offrant la possibilité de tester un grand nombre d'échantillons. Certaines techniques sont directement  
630 utilisables sur le terrain, d'autres permettent de balayer un éventail très large d'arbovirus au sein d'un  
631 seul arthropode ou encore de tester sans *a priori* dans le but de mettre en évidence de nouveaux  
632 arbovirus émergents. Les techniques moléculaires sont, maintenant, très performantes, les rendant  
633 incontournables et indispensables pour la surveillance des arbovirus. Elles ont également l'avantage  
634 d'être utilisables directement sur les vecteurs arthropodes, permettant de prédire et d'alerter quant  
635 à une éventuelle épidémie. Beaucoup de ces techniques ont été mises au point avec, comme matériel  
636 biologique, des moustiques et des tiques mais elles sont applicables sur d'autres vecteurs tels que les  
637 mouches du genre *Culicoides* et les phlébotomes.

638 Un accès aux techniques innovantes et rapides comme la LAMP pour tous les laboratoires, en  
639 particulier dans les zones endémiques pour certains virus représentant des risques sanitaires  
640 importants, améliorerait considérablement la rapidité de gestion des épidémies et permettrait, en  
641 conséquence, de donner le traitement le plus approprié aux patients. Des kits commerciaux pour la  
642 détection rapide de certains arbovirus existent déjà sur le marché. Par exemple, le kit SD Boline  
643 Dengue Duo (Standard Diagnostics, Corée du Sud) permet, en une quinzaine de minutes, la détection

644 simultanée du virus de la Dengue ainsi que les IgM et IgG associés. Ce test est un dosage immuno-  
645 chromatographique, les échantillons qui peuvent être utilisés sont le sang total, le sérum et le plasma  
646 [91]. Malheureusement ces types de kits rapides adaptables au terrain, bien qu'ils soient très utiles en  
647 épidémiologie, ne détecteront pas un nouveau virus émergent.

648 Toutes les techniques de nouvelles générations ne sont malheureusement pas utilisées de  
649 manière uniforme sur l'ensemble du globe. La standardisation de ces techniques dans des laboratoires  
650 de référence régionaux serait un avantage pour une surveillance plus efficace. Pour les technologies  
651 de pointe telles que les PCR en multiplex, à haut débit ou bien de séquençage, il serait préférable de  
652 privilégier des centres experts pour maintenir un niveau d'analyse suffisant. De plus, ces technologies  
653 représentent des investissements initiaux colossaux pour certains laboratoires. C'est pourquoi, il serait  
654 recommandé d'identifier des lieux stratégiques où la surveillance est plus que nécessaire pour  
655 implanter ces technologies via des plateformes et ainsi optimiser le transport des échantillons collectés  
656 sur le terrain. La plupart des arbovirus nécessitent des structures de confinement de niveau 3 pour  
657 être manipulés. De ce fait le transport d'échantillons potentiellement infectés représentent un risque  
658 biologique important et ils doivent être congelés pour leur bonne conservation. Toutes les procédures  
659 mises en place représentent des coûts importants et des charges de travail en plus. Ainsi, des  
660 protocoles d'envoi d'échantillons doivent être élaborés pour simplifier le transport de ces échantillons  
661 vers les centres de référence. Un protocole a notamment été mis en place pour le transport  
662 d'échantillons potentiellement infectés par le virus de la fièvre aphteuse [92]. Le virus est alors inactivé  
663 sur « un dispositif d'écoulement latéral » après un traitement à l'acide citrique à 0,2%. La détection et  
664 le typage du virus après cette inactivation sont toujours possibles. De ce fait, tous risques biologiques  
665 sont écartés et les procédures d'envoi allégées [92]. Un autre système a été mis au point pour faciliter  
666 le stockage et le transport d'ARN: la carte *Flinders Technology Associates (FTA®)*. Les virus sont  
667 inactivés et les ARN libérés sont fixés et préservés sur une matrice. L'utilisation de cette carte a  
668 notamment été validée avec des moustiques infectés collectés sur le terrain [93]. Toutes ces

669 améliorations de stockage, de transport et de préservation des échantillons augmentent également  
670 l'efficacité de la surveillance des arbovirus.

671

## 672 **Références**

- 673 1. Kuno G, Chang G. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights  
674 into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clinical*  
675 *Microbiology Reviews* 2005;18(4):608-37.
- 676 2. Karabatsos N. International catalogue of arboviruses, including certain other viruses of  
677 vertebrates. 3rd, editor. San Antonio, Texas: American Society of Tropical Medicine and Hygiene for  
678 The Subcommittee on Information Exchange of the American Committee on Arthropod-borne Viruses;  
679 1985.
- 680 3. Weaver SC, Costa F, Garcia-Blanco MA, Ko AI, Ribeiro GS, Saade G *et al.* Zika virus: History,  
681 emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Research* 2016;130:69-80.
- 682 4. Weaver SC, Forrester NL. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread.  
683 *Antiviral Research* 2015;120:32-39.
- 684 5. Rushton J, Lyons N. Economic impact of Bluetongue: a review of the effects on production.  
685 *Veterinaria italiana* 2015;51:401-6.
- 686 6. Rodhain F. Le fonctionnement des systèmes virus-vecteurs. *Annales de la Société Belge de*  
687 *Médecine Tropicale* 1991;71:189-99.
- 688 7. Weaver SC, Barrett ADT. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral  
689 disease. *Nature Reviews Microbiology* 2004;2:789-801.
- 690 8. Caron M, Paupy C, Grard G, Becquart P, Mombo I, Nso BBB *et al.* Recent introduction and rapid  
691 dissemination of chikungunya virus and dengue virus serotype 2 associated with human and mosquito  
692 coinfections in gabon, central africa. *Clinical Infectious Diseases* 2012;55:45-53.
- 693 9. Gould EA, Higgs S. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases.  
694 *TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE* 2009;103:109-21.
- 695 10. Gould EA, Pettersson J, Higgs S, Charrel R, de Lamballerie X. Emerging arboviruses: Why today?  
696 *One Health* 2017;4:1-13.
- 697 11. Kamal M, Kenawy MA, Rady MH, Khaled AS, Samy AM. Mapping the global potential  
698 distributions of two arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus* under changing climate. *PLoS*  
699 *ONE* 2018;13:1-21.
- 700 12. Durand B, Lecollinet S, Beck C, Martínez-López B, Balenghien T, Chevalier V. Identification of  
701 Hotspots in the European Union for the Introduction of Four Zoonotic Arboviroses by Live Animal  
702 Trade. *PLoS ONE* 2013;8:1-16.
- 703 13. Drake JW. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proceedings of the National*  
704 *Academy of Sciences* 2006;90:4171-75.
- 705 14. Domingo E, Perales C. Quasispecies and virus. *European Biophysics Journal* 2018;47:443-57.
- 706 15. Manrubia SC, Escarmís C, Domingo E, Lázaro E. High mutation rates, bottlenecks, and  
707 robustness of RNA viral quasispecies. *Gene* 2005;347:273-82.
- 708 16. Forrester NL, Guerbois M, Seymour RL, Spratt H, Weaver SC. Vector-Borne Transmission  
709 Imposes a Severe Bottleneck on an RNA Virus Population. *PLoS Pathogens* 2012;8(9).
- 710 17. Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A single mutation in Chikungunya virus  
711 affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathogens* 2007;3:1895-906.
- 712 18. Loftin KC, Diallo AA, Herbert MW, Phaltankar PG, Yuan C, Greife N *et al.* Five-year surveillance  
713 of West Nile and eastern equine encephalitis viruses in Southeastern Virginia. *Journal of*  
714 *Environmental Health* 2006;68:33-40.

- 715 19. Chaintoutis SC, Dovas CI, Papanastassopoulou M, Gewehr S, Danis K, Beck C *et al.* Evaluation  
716 of a West Nile virus surveillance and early warning system in Greece, based on domestic pigeons.  
717 *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2014;37:131-41.
- 718 20. May L, Chretien JP, Pavlin JA. Beyond traditional surveillance: Applying syndromic surveillance  
719 to developing settings-opportunities and challenges. *BMC Public Health* 2009;9:1-11.
- 720 21. Elbers ARW, Backx A, Mintiens K, Gerbier G, Staubach C, Hendrickx G *et al.* Field observations  
721 during the Bluetongue serotype 8 epidemic in 2006. II. Morbidity and mortality rate, case fatality and  
722 clinical recovery in sheep and cattle in the Netherlands. *Preventive Veterinary Medicine* 2008;87:31-  
723 40.
- 724 22. Faverjon C, Vial F, Andersson MG, Lecollinet S, Leblond A. Early detection of West Nile virus in  
725 France: Quantitative assessment of syndromic surveillance system using nervous signs in horses.  
726 *Epidemiology and Infection* 2017;145:1044-57.
- 727 23. Veldhuis A, Brouwer-Middelesch H, Marceau A, Madouasse A, Van der Stede Y, Fourichon C *et*  
728 *al.* Application of syndromic surveillance on routinely collected cattle reproduction and milk  
729 production data for the early detection of outbreaks of Bluetongue and Schmallenberg viruses.  
730 *Preventive Veterinary Medicine* 2016;124:15-24.
- 731 24. Thompson PN, Etter E. Epidemiological surveillance methods for vector-borne diseases. *Revue*  
732 *Scientifique et Technique* 2015;34:235-47.
- 733 25. Johnson N, de Marco MF, Giovannini A, Ippoliti C, Danzetta ML, Svartz G *et al.* Emerging  
734 mosquito-borne threats and the response from European and Eastern Mediterranean countries.  
735 *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2018;15(12).
- 736 26. Tesh RB. A Method for the Isolation and Identification of Dengue Viruses, using Mosquito Cell  
737 Cultures. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1979;28:1053-59.
- 738 27. Lwande OW, Lutomiah J, Obanda V, Gakuya F, Mutisya J, Mulwa F *et al.* Isolation of tick and  
739 mosquito-borne arboviruses from ticks sampled from livestock and wild animal hosts in Ijara District,  
740 Kenya. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2013;13:637-42.
- 741 28. Clavijo A, Heckert RA, Dulac GC, Afshar A. Isolation and identification of bluetongue virus.  
742 *Journal of Virological Methods* 2000;87:13-23.
- 743 29. David-West TS. Method for accelerated identification of arboviruses after inoculation of mice.  
744 *Applied microbiology* 1972;23:437-40.
- 745 30. Tse C, Capeau J. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel.  
746 *Annales de Biologie Clinique* 2003;61:279-93.
- 747 31. Poitras E, Houde A. La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and*  
748 *Biotechnology* 2002;2:2-11.
- 749 32. Brault AC, Fang Y, Reisen WK. Multiplex qRT-PCR for the detection of western equine  
750 encephalomyelitis, St. Louis encephalitis, and west nile viral RNA in mosquito pools (diptera: Culicidae).  
751 *Journal of Medical Entomology* 2015;52:491-99.
- 752 33. Colombo TE, Versiani AF, Dutra KR, Rubiato JGD, Galvão TM, Negri Reis AF *et al.* Performance  
753 of CDC Triplex qPCR during a dengue outbreak in Brazil. *Journal of Clinical Virology* 2019.
- 754 34. Liu SQ, Li X, Deng CL, Yuan ZM, Zhang B. Development and evaluation of one-step multiplex  
755 real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of Zika virus and Chikungunya virus. *Journal of*  
756 *Medical Virology* 2018;90:389-96.
- 757 35. Rademan R, Markotter W, Paweska JT, Jansen van Vuren P. Multiplex real-time RT-PCR for  
758 detection and distinction of Spondweni and Zika virus. *Journal of Virological Methods* 2019;266:72-76.
- 759 36. Sas MA, Vina-Rodriguez A, Mertens M, Eiden M, Emmerich P, Chaintoutis SC *et al.* A one-step  
760 multiplex real-time RT-PCR for the universal detection of all currently known CCHFV genotypes. *Journal*  
761 *of Virological Methods* 2018;255:38-43.
- 762 37. Villinger J, Mbaya MK, Ouso D, Kipanga PN, Lutomiah J, Masiga DK. Arbovirus and insect-  
763 specific virus discovery in Kenya by novel six genera multiplex high-resolution melting analysis.  
764 *Molecular Ecology Resources* 2017;17:466-80.



- 765 38. Naze F, Le Roux K, Schuffenecker I, Zeller H, Staikowsky F, Grivard P *et al.* Simultaneous  
766 detection and quantitation of Chikungunya, Dengue and West Nile viruses by multiplex RT-PCR assays  
767 and Dengue virus typing using High Resolution Melting. *Journal of Virological Methods* 2009;162:1-7.
- 768 39. Dong D, Fu SH, Wang LH, Lv Z, Li TY, Liang GD. Simultaneous detection of three arboviruses  
769 using a triplex RT-PCR enzyme hybridization assay. *Virologica Sinica* 2012;27:179-86.
- 770 40. Ohst C, Saschenbrecker S, Stiba K, Steinhagen K, Probst C, Radzimski C *et al.* Reliable Serological  
771 Testing for the Diagnosis of Emerging Infectious Diseases. In: Vasudevan SG, editor. *Dengue and Zika:*  
772 *Control and Antiviral Treatment Strategies.* Hilgenfeld ed. Singapore: Springer Singapore; 2018. p. 265-  
773 76.
- 774 41. Ferese R, Scorzolini L, Campopiano R, Albano V, Griguoli AM, Giardina E *et al.* PCR-based  
775 approach for qualitative molecular analysis of six neurotropic pathogens. *Acta Virologica* 2017;61:273-  
776 79.
- 777 42. Tritz P, Leblond A, Pronost S, Couplier M, Levy M, Lecollinet S. Diagnostic différentiel épidémio-  
778 clinique et de laboratoire des affections nerveuses d'origine infectieuse. *Pratique Vétérinaire Équine*  
779 2014;N° Spécial:68-76.
- 780 43. Beck C. *Nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques contre les flavivirus neurotropes*  
781 *en médecine vétérinaire.* Maisons-Alfort: Paris-Saclay; 2017.
- 782 44. Rossi SL. West Nile Virus. *Clinics in Laboratory Medicine* 2010;30:47-65.
- 783 45. Kuno G. Persistence of arboviruses and antiviral antibodies in vertebrate hosts: its occurrence  
784 and impacts. *Reviews in Medical Virology* 2001;11:165-90.
- 785 46. Beck C, Jimenez-Clavero MA, Leblond A, Durand B, Nowotny N, Leparc-Goffart I *et al.*  
786 *Flaviviruses in europe: Complex circulation patterns and their consequences for the diagnosis and*  
787 *control of west nile disease.* *International Journal of Environmental Research and Public Health*  
788 2013;10:6049-83.
- 789 47. Clarke DH, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with  
790 arthropod-borne viruses. *American Journal of Public Health and the Nations Health* 1958;7:561-73.
- 791 48. Sukhavachana P, YUILL TM, Russell PK. Assay of arbovirus neutralizing antibody by micro  
792 methods. *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene* 1969;63:1969.
- 793 49. OIE. *Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres 2019.* Paris2019  
794 [updated 26/06/2019; cited 2020 24/08/2020]; 8:[Available from:  
795 <https://www.oie.int/fr/normes/manuel-terrestre/acces-en-ligne/>.
- 796 50. CDC, editor. *Zika MAC-ELISA*2018.
- 797 51. Rogier EW, Moss DM, Mace KE, Chang M, Jean SE, Bullard SM *et al.* Use of bead-based serologic  
798 assay to evaluate chikungunya virus epidemic, Haiti. *Emerging Infectious Diseases* 2018;24:995-1001.
- 799 52. Beck C, Desprès P, Paulous S, Vanhomwegen J, Lowenski S, Nowotny N *et al.* A High-  
800 Performance Multiplex Immunoassay for Serodiagnosis of Flavivirus-Associated Neurological Diseases  
801 in Horses. *BioMed Research International* 2015;2015.
- 802 53. Beck C, Leparc-Goffart I, Desoutter D, Debergé E, Bichet H, Lowenski S *et al.* Serological  
803 evidence of infection with dengue and zika viruses in horses on French pacific Islands. *PLoS Neglected*  
804 *Tropical Diseases* 2019;13:1-14.
- 805 54. Junglen S, Drosten C. Virus discovery and recent insights into virus diversity in arthropods.  
806 *Current Opinion in Microbiology* 2013;16:507-13.
- 807 55. Vecteurs CNdEsl, editor. *Surveillance et contrôle des Culicoides vecteurs de fièvre catarrhale*  
808 *du mouton en France métropolitaine*2012; Montpellier.
- 809 56. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N *et al.* Loop-mediated  
810 isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 2000;28.
- 811 57. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification  
812 reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical*  
813 *Research Communications* 2001;289:150-54.
- 814 58. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene  
815 sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols* 2008;3:877-82.

- 816 59. Lopez-Jimena B, Wehner S, Harold G, Bakheit M, Frischmann S, Bekaert M *et al.* Development  
817 of a single-tube one-step RT-LAMP assay to detect the Chikungunya virus genome. *PLoS Neglected*  
818 *Tropical Diseases* 2018;12:1-14.
- 819 60. Lopez-Jimena B, Bekaert M, Bakheit M, Frischmann S, Patel P, Simon-Loriere E *et al.*  
820 Development and validation of four one-step real-time RT-LAMP assays for specific detection of each  
821 dengue virus serotype. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2018;12:1-22.
- 822 61. Wang X, Yin F, Bi Y, Cheng G, Li J, Hou L *et al.* Rapid and sensitive detection of Zika virus by  
823 reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods*  
824 2016;238:86-93.
- 825 62. Gonçalves DDS, Hooker DJ, Dong Y, Baran N, Kyrylos P, Iturbe-Ormaetxe I *et al.* Detecting wMel  
826 *Wolbachia* in field-collected *Aedes aegypti* mosquitoes using loop-mediated isothermal amplification  
827 (LAMP). *Parasites and Vectors* 2019;12:1-5.
- 828 63. Chen Z, Liao Y, Ke X, Zhou J, Chen Y, Gao LL *et al.* Comparison of reverse transcription loop-  
829 mediated isothermal amplification, conventional PCR and real-time PCR assays for Japanese  
830 encephalitis virus. *Molecular Biology Reports* 2011;38:4063-70.
- 831 64. Parida MM, Santhosh SR, Dash PK, Tripathi NK, Saxena P, Ambuj S *et al.* Development and  
832 evaluation of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and real-  
833 time detection of Japanese encephalitis virus. *Journal of Clinical Microbiology* 2006;44:4172-78.
- 834 65. Wheeler SS, Ball CS, Langevin SA, Fang Y, Coffey LL, Meagher RJ. Surveillance for western  
835 equine encephalitis, St. Louis encephalitis, and West Nile viruses using reverse transcription loop-  
836 mediated isothermal amplification. *PLoS ONE* 2016;11:1-17.
- 837 66. Hayasaka D, Aoki K, Morita K. Development of simple and rapid assay to detect viral RNA of  
838 tick-borne encephalitis virus by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *Virology*  
839 *Journal* 2013;10:1.
- 840 67. Cabezas-Cruz A, Pollet T, Estrada-Peña A, Allain E, Bonnet SI, Moutailler S. Handling the  
841 Microbial Complexity Associated to Ticks. In: Abubaka M, Kanchana Perera P, editors. *Ticks and tick-*  
842 *borne pathogens*: IntechOpen; 2019.
- 843 68. Michelet L, Delannoy S, Devillers E, Umhang G, Aspan A, Juremalm M *et al.* High-throughput  
844 screening of tick-borne pathogens in Europe. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2014;4:1-  
845 13.
- 846 69. Bonnet S, George J-C, Boulanger N. L'interface tique-hôte et la transmission des pathogènes.  
847 In: IRD, editor. *Tiques et maladies à tiques*. Marseille2015. p. 165-91.
- 848 70. Gondard M, Michelet L, Nisavanh A, Devillers E, Delannoy S, Fach P *et al.* Prevalence of tick-  
849 borne viruses in *Ixodes ricinus* assessed by high-throughput real-time PCR. *Pathogens and Disease*  
850 2018;76:1-13.
- 851 71. Moutailler S, Yousfi L, Mousson L, Devillers E, Vazeille M, Vega-Rúa A *et al.* A new high-  
852 throughput tool to screen mosquito-borne viruses in zika virus endemic/epidemic areas. *Viruses*  
853 2019;11.
- 854 72. Migné C, Delannoy S, Lecollinet S, Gaudaire D, Tapprest J, Yousfi L *et al.*, editors. Amélioration  
855 du diagnostic des encéphalites virales équine. Congrès: Journées sciences et innovations équine JSIE,  
856 Ifce, Saumur (France), 23 et 24 mai 2019; 2019; Saumur, France: Le Pin au Haras : IFCE.
- 857 73. Lecollinet S, Pronost S, Couplier M, Beck C, Gonzalez G, Leblond A *et al.* Viral equine  
858 encephalitis, a growing threat to the horse population in Europe? *Viruses* 2019;12.
- 859 74. ROCHE. LightCycler® 1536 System.
- 860 75. Berthet N, Leclercq I, Vallaëys T, Gessain A, Manuguerra JC. Les puces à ADN en virologie:  
861 concepts de base et applications pour la détection des virus. *Virologie* 2013;17:61-80.
- 862 76. Berthet N. La puce à ADN de reséquençage : un outil rapide pour mieux identifier et  
863 comprendre une émergence virale et bactérienne. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*  
864 2013;197:1669-82.
- 865 77. Wang D, Urisman A, Liu YT, Springer M, Ksiazek TG, Erdman DD *et al.* Viral discovery and  
866 sequence recovery using DNA microarrays. *PLoS Biology* 2003;1(2):257-60.

867 78. Grubaugh ND, Petz LN, Melanson VR, McMenemy SS, Turell MJ, Long LS *et al.* Evaluation of a  
868 field-portable DNA microarray platform and nucleic acid amplification strategies for the detection of  
869 arboviruses, arthropods, and bloodmeals. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*  
870 2013;88:245-53.

871 79. Grubaugh ND, McMenemy SS, Turell MJ, Lee JS. Multi-Gene Detection and Identification of  
872 Mosquito-Borne RNA Viruses Using an Oligonucleotide Microarray. *PLoS Neglected Tropical Diseases*  
873 2013;7.

874 80. Carpi G, Cagnacci F, Wittekindt NE, Zhao F, Qi J, Tomsho LP *et al.* Metagenomic profile of the  
875 bacterial communities associated with *Ixodes ricinus* ticks. *PLoS ONE* 2011;6.

876 81. Bonnet SI, Binetruy F, Hernández-Jarguín AM, Duron O. The tick microbiome: Why non-  
877 pathogenic microorganisms matter in tick biology and pathogen transmission. *Frontiers in Cellular and*  
878 *Infection Microbiology* 2017;7:1-14.

879 82. Illumina I. Illumina sequencing Technology. 2010.

880 83. Cummings PJ, Ahmed R, Durocher JA, Jessen A, Vardi T, Obom KM. Pyrosequencing pour  
881 l'identification microbienne et Caractérisation. *JoVE* 2013.

882 84. Moutailler S, Popovici I, Devillers E, Vayssier-Taussat M, Eloit M. Diversity of viruses in *Ixodes*  
883 *ricinus*, and characterization of a neurotropic strain of *Eyach* virus. *New Microbes and New Infections*  
884 2016;11:71-81.

885 85. Batovska J, Lynch SE, Cogan NOI, Brown K, Darbro JM, Kho EA *et al.* Effective mosquito and  
886 arbovirus surveillance using metabarcoding. *Molecular Ecology Resources* 2018;18:32-40.

887 86. Blervaque R. Séquenceurs haut débit 3ème génération ou le séquençage d'ADN simple  
888 molécule. *Biorigami* 2012.

889 87. Quick J, Loman NJ, Duraffour S, Simpson JT, Severi E, Cowley L *et al.* Real-time, portable  
890 genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature* 2016;530(7589):228-32.

891 88. Technologies ON. A nanopore is a very small hole. 2008.

892 89. Batovska J, Lynch SE, Rodoni BC, Sawbridge TI, Cogan NO. Metagenomic arbovirus detection  
893 using MinION nanopore sequencing. *Journal of Virological Methods* 2017;249:79-84.

894 90. Yin C, Shen G, Guo D, Wang S, Ma X, Xiao H *et al.* InsectBase: A resource for insect genomes  
895 and transcriptomes. *Nucleic Acids Research* 2016;44:D801-D07.

896 91. Wang SM, Sekaran SD. Early diagnosis of dengue infection using a commercial dengue duo  
897 rapid test kit for the detection of NS1, IGM, and IGG. *American Journal of Tropical Medicine and*  
898 *Hygiene* 2010;83(3):690-95.

899 92. Romey A, Relmy A, Gorna K, Laloy E, Zientara S, Blaise-Boisseau S *et al.* Safe and cost-effective  
900 protocol for shipment of samples from Foot-and-Mouth Disease suspected cases for laboratory  
901 diagnostic. *Transboundary and Emerging Diseases* 2018;65(1):197-204.

902 93. Hall-Mendelin S, Hewitson GR, Genge D, Burtonclay PJ, De Jong AJ, Pyke AT *et al.* FTA Cards  
903 Facilitate Storage, Shipment, and Detection of Arboviruses in Infected *Aedes aegypti* Collected in Adult  
904 Mosquito Traps. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2017;96(5):1241-43.

905