



HAL
open science

Réponse des chiroptères aux environnements : diversité virale et potentiel d'adaptation

Arielle Salmier

► **To cite this version:**

Arielle Salmier. Réponse des chiroptères aux environnements : diversité virale et potentiel d'adaptation. Biologie animale. Université de Guyane, 2016. Français. NNT : 2016YANE0009 . tel-01527554

HAL Id: tel-01527554

<https://theses.hal.science/tel-01527554>

Submitted on 24 May 2017

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.

École doctorale

« Diversités, santé et développement en Amazonie »

**Thèse pour le doctorat en
Physiologie et biologie des organismes-populations-
interactions**

Arielle SALMIER

**Réponses des chiroptères aux
environnements :
diversité virale et potentiel d'adaptation**

Sous la direction du Dr. Anne LAVERGNE, Ph. D., HDR

Soutenue le 13 décembre 2016 à Cayenne

Jury :

Jean-François COSSON, DR, HDR, INRA CBGP Montpellier, Rapporteur

Jean-Claude MANUGUERRA, DR, HDR, Institut Pasteur Paris, Rapporteur

Alain FRANC, DR, HDR, INRA Biogeco Bordeaux, Examineur

Mathieu NACHER, PU-PH, MD, HDR, EPAT Cayenne, Examineur, Président du jury de thèse

Brigitte CROAU-ROY, PrCE-HDR, EDB Université Paul Sabatier Toulouse, Examineur

Anne LAVERGNE, IR, HDR, Institut Pasteur Cayenne, Directrice de thèse

*À ma mère, merci pour le tout le soutien,
ce travail est aussi le tien*

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	III
Remerciements	v
Résumé du manuscrit	vii
Abstract of the manuscript.....	x
Avant-propos	xii
Organisation du manuscrit.....	xiii
Liste des figures.....	xiv
1. DIVERSITÉ, INTERACTIONS, ÉVOLUTION : LES CHIROPTÈRES, UN MODÈLE	1
1.1. Diversité biologique et adaptation.....	2
<i>A. Facteurs évolutifs et adaptation</i>	<i>4</i>
i. Les forces génomiques.....	5
ii. La sélection naturelle	6
• La sélection négative	6
• La sélection positive	7
• La sélection balancée.....	7
iii. Le flux génique	9
iv. La dérive génétique	9
<i>B. Les relations hôtes-pathogènes.....</i>	<i>11</i>
i. Interactions sociales	11
ii. Interactions trophiques.....	15
iii. Perturbations et diversité biologique	16
<i>C. Les chiroptères : diversité et adaptation</i>	<i>17</i>
1.2. Diversité biologique des chiroptères	19
<i>A. Richesse spécifique et classification.....</i>	<i>19</i>
<i>B. Socialité, reproduction et longévité.....</i>	<i>21</i>
<i>C. Les chiroptères en Guyane</i>	<i>22</i>
1.3. Chiroptera et microorganismes.....	24
<i>A. Diversité de microorganismes non-viraux.....</i>	<i>24</i>
<i>B. Diversité des microorganismes viraux.....</i>	<i>25</i>
i. Rhabdoviridae, Rage et facteurs environnementaux.....	26
• Les lyssavirus de chauves-souris.....	27
• RABV en Amérique Latine	29
ii. Autres virus de chauves-souris.....	30

1.4. Chiroptera, coévolution et adaptation.....	30
A. Système immunitaire de l'hôte.....	32
B. Immunité innée.....	34
C. Immunité adaptative.....	35
i. Le complexe majeur d'histocompatibilité, CMH.....	37
ii. Variabilité du CMH.....	41
iii. CMH chez les chauves-souris.....	42
1.5. Modèles d'étude.....	43
i. Les Phyllostomidae.....	43
• Carollia perspicillata (Linné, 1758).....	44
• Desmodus rotundus (Geoffroy, 1810).....	45
ii. Les Molossidae (Gervais, 1856).....	46
• Molossus molossus (Pallas, 1766).....	46
1.6. Objectifs de la thèse.....	47
2. DIVERSITÉ VIRALE DES CHIROPTÈRES.....	48
2.1. Environnement et caractères spécifiques, déterminants de la diversité virale ?.....	49
A. Résumé de l'étude virome.....	49
B. Article de recherche.....	51
2.2. Circulation de la rage en Guyane, quels facteurs biologiques et écologiques ?.....	110
A. Résumé de l'étude rage.....	110
B. Article de recherche.....	112
3. DIVERSITÉ IMMUNITAIRE DES CHIROPTÈRES.....	136
3.1. Environnement, déterminant majeur de l'adaptation ?.....	137
A. Résumé de l'étude CMH.....	137
B. Article de recherche.....	139
4. DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	169
4.1. Les déterminants de diversité et distribution virale.....	171
4.2. Les déterminants de la transmission virale.....	174
4.3. Impact de la structure spatiale des populations et socialité.....	175
4.4. Potentiel d'adaptation locale chez les chauves-souris.....	178
4.5. Perspectives et considérations futures.....	180
5. BIBLIOGRAPHIE.....	183
6. ANNEXES.....	198

Remerciements

Si l'on m'avait dit avant que faire une thèse était un sport d'endurance, je n'aurai sûrement pas compris ! Après quatre années de « dur » labeur, c'est avec une grande fierté que j'apprécie l'aboutissement de mon travail de recherche. Je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail, que ce soit par des collaborations, des discussions scientifiques (même en anglais !☺), ou au contraire par des moments d'échanges totalement déconnectés de la science, des chauves-souris, des viromes ou du « CMH » !!

La première personne que je souhaite remercier avec vivacité c'est toi Anne ! Sans toi, ce travail n'aurait pu être ce qu'il est aujourd'hui. Je te remercie de m'avoir accordé ta confiance, ton soutien, tes conseils, ta disponibilité à toute heure et la liste est encore longue ! Merci de m'avoir donné la liberté de mener mes investigations et d'explorer des méthodes qui ne t'étaient pas forcément familières.

Tous mes remerciements au Laboratoire d'Excellence du Centre d'Étude de la Biodiversité Amazonienne (Labex CEBA) et au Fond Social Européen (FSE) pour avoir nous avoir accordé votre confiance et accepté de cofinancer de ma thèse.

J'exprime également toute ma gratitude à messieurs Jean-François Cosson et Jean-Claude Manuguerra, qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de cette thèse, ainsi que messieurs Alain Franc, Mathieu Nacher et madame Brigitte Crou-Roy pour avoir accepté un rôle d'examineur au sein de ce jury.

Un grand merci à Vincent Lacoste, directeur du Laboratoire des Interactions Virus-Hôtes, pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe. Merci pour les conseils sur les approches expérimentales, merci pour la relecture de mes nombreuses œuvres écrites et surtout merci pour tes suggestions et remarques pertinentes. Même si je ne connaissais pas toujours tes références musicales ou cinématographiques... (tu sais : le temps que les moins de vingt ans ne peuvent pas connaître...) ça me faisait bien rire ! ☺

Toute ma gratitude à Benoît de Thoisy, directeur de l'unité de primatologie, pour l'accompagnement scientifique sur le terrain (avec ses longues nuits où l'on jubilait d'avoir attrapé une chauve-souris vampire...) ou pendant le traitement des données et l'interprétation des résultats. Je reste toujours bluffée par tes connaissances en écologie. Je ne pense pas que je serai capable de m'aventurer seule en forêt... et les chauves-souris me font toujours peur en vol... Mais ! Le lancer de molosses n'a plus aucun secret pour moi et je sais reconnaître les mangues maintenant hein ! ☺ j'ai bien appris en quatre ans !

Un énorme merci à Édith Darcissac, ingénieur de recherche au LIVH, pour l'accompagnement au cours de cette thèse. Merci pour ton œil critique et tes remarques pertinentes. J'ai beaucoup apprécié nos échanges, qu'ils soient scientifiques ou non. Ta contribution m'aura été d'un très grand

secours ! Je te remercie pour ta disponibilité, même dans les derniers moments ! Tu rêveras de CMH, diversité virale et chauves-souris pendant un moment... mais c'est pour le bien de tous ! ☺

Toute ma reconnaissance à Éliane Bourreau, directrice de l'unité de recherche d'immunologie. Comme toujours tes remarques m'ont été très utiles ! Merci pour les échanges scientifiques de qualité et pour tous les conseils. Profite bien de ta retraite ! Je sais qu'elle ne diminuera en rien ta fougue pour les voies de régulation des interleukines !

Un grand merci à Sourakhata Tirera, ingénieur en bio-informatique au LIVH, pour le traitement des données NGS, pour ta disponibilité, pour les suggestions afin d'optimiser le traitement des échantillons. Merci également pour tous nos échanges à la salle café ou dans d'autres recoins de la Guyane !

À Damien Donato, technicien au LIVH, merci pour ton implication et tes idées, toujours dans une optique d'amélioration du travail effectué. Merci pour ta participation active pour l'étude du virome, pour nos échanges scientifiques, tes remarques et suggestions intéressantes.

Une pensée spéciale à Marie-Claude, Gersande, Samantha, Sarkis, Édouard, Claudiane, Tani, les « d'jeun's » de Pasteur ! Merci pour l'entraide, le soutien mutuel et les moments heureux que nous avons passés durant ces quelques années. Merci également pour les échanges scientifiques et autres que nous avons eus. Attention Samantha c'est bientôt ton tour ! ☺ Bon courage à tous pour vos projets respectifs ! On se retrouve, pour certains, dans cinq ans au Canada... dans ma villa... ! ☺

Un merci également à Nicole Guinguincoin, Béatrice Volney, Yassamine Lazrek, « les parasitos ! ». Merci pour la bonne humeur, les petits potins et autres échanges des plus agréables.

Enfin que serait une thèse sans les remerciements à la famille !! Un immense merci à ma mère et à ma grand-mère. Merci pour l'hospitalité et le soutien quand je rédigeais, jusqu'à pas d'heure ! (Quoique... maman tu dormais le plus souvent hein ! ☺). Je sais que la dernière année n'a pas été facile pour vous... Je passais beaucoup moins de temps avec vous, j'étais beaucoup moins drôle par moments... Merci d'avoir toujours été là pour moi, de m'avoir toujours poussé à aller de l'avant. Je vous aime, vous êtes les « *potomitan* » de ma vie.

Une pensée spéciale aux cousins ! Kendjy, Keylann, Ludivine ! Même si vous étiez très demandeurs, vous m'avez permis de me changer les idées. C'était très difficile par moments de vous faire comprendre que je travaillais... oui quand on rédige, pour les enfants de 3-6 ans ce n'est pas du travail... ah la la ces « d'jeun's ».

Et surtout merci à moi-même, pour avoir tenu à vivre cette aventure malgré tous les racontars négatifs sur ce qu'est une thèse. Je pense avoir été bien entourée, que ce soit au labo ou à la maison. Même si parfois j'étais dans ma bulle ! Un grand merci pour l'investissement scientifique, en espérant que l'aventure continuera toujours avec autant de vigueur ! Vive la science, vive les chauves-souris ! ☺

Résumé du manuscrit

La *biodiversité* est essentielle au maintien de la vie sur Terre. L'étude de la biodiversité s'intéresse au vivant à tous les niveaux d'organisation (des gènes aux écosystèmes dans lesquels évoluent les espèces ainsi que la variété de processus vitaux dans ces derniers) classés par des critères évolutifs et écologiques. Les interactions trophiques, sociales, et les facteurs évolutifs (ex. les forces génomiques, la sélection naturelle, les flux de gènes, la dérive génétique) sont les principaux moteurs de la biodiversité. Les variations génétiques et phénotypiques observées au sein d'une espèce reflètent les processus d'adaptation en réponse à ces moteurs de biodiversité dans des contraintes environnementales particulières. Les chauves-souris constituent l'ordre des *Chiroptera* et sont les seuls mammifères capables de vol actif. Elles sont également d'excellents indicateurs de biodiversité. Ces animaux sont, par ailleurs, reconnus comme réservoirs naturels de nombreux microorganismes, dont certains pathogènes, responsables de maladies sévères chez l'homme. À ce jour, plus de 1 300 espèces de chauves-souris ont été décrites dans des habitats multiples et avec une grande diversité de comportements sociaux. Cette grande diversité d'espèces reflète l'importante diversité des caractéristiques biologiques, de l'histoire évolutive et de la capacité d'adaptation de cet ordre. Les études immunobiologiques laissent à penser que les chauves-souris présentent des stratégies antimicrobiennes plus efficaces que les autres mammifères, influencées par leurs caractéristiques spécifiques et par les contraintes pathogéniques associées aux environnements.

L'objectif de cette thèse était de mieux comprendre, en utilisant la diversité virale et la circulation du virus rabique (RABV) comme proxy, comment les contraintes bioécologiques, liées à la phylogénie de l'hôte et à son environnement, pouvaient impacter la diversité des virus de chauves-souris, et subséquentement, induire une adaptation locale des gènes de l'immunité. Pour répondre à cette question, plusieurs objectifs secondaires ont été définis.

Le premier objectif était de caractériser la diversité de populations virales hébergées par différentes communautés de chauves-souris appartenant à deux espèces néotropicales : *Desmodus rotundus* et *Molossus molossus*. Ces chauves-souris évoluent en sympatrie dans les environnements forestiers et urbains de Guyane. Le deuxième objectif était d'évaluer l'impact de l'environnement sur la diversité virale hébergée et de mettre en évidence les déterminants bioécologiques de cette diversité. Le troisième objectif était d'identifier, grâce à un modèle d'étude d'interaction RABV-hôtes, les facteurs prédictifs du maintien et de la circulation du virus à l'échelle des communautés de chauves-souris. Enfin, le quatrième objectif de ce travail était d'explorer la diversité génétique des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de trois espèces de chauves-souris néotropicales : *D. rotundus*, *M. molossus* et *Carollia perspicillata*, pour identifier les principaux moteurs du polymorphisme du CMH, et subséquentement, du potentiel d'adaptation en milieu naturel et perturbé des espèces étudiées.

La diversité virale a été caractérisée à partir de 298 échantillons de salive et fèces collectés dans les communautés de *D. rotundus* et *M. molossus*. Cette étude a permis l'identification de 48 familles virales, dont 14 familles de virus infectant les vertébrés. Les comparaisons des diversités virales, aux niveaux spécifiques et environnementaux, montrent que les interactions trophiques et les habitats sont les principaux moteurs de la diversité observée. De plus, les résultats montrent que la diversité de familles virales était plus importante dans les échantillons de fèces collectés en milieu forestiers, probablement liée à une diversité de proies plus importante, comparée aux milieux urbains, suggérant une meilleure capacité de transmission des virus par les guanos de chauves-souris.

Le modèle d'étude d'interaction RABV-hôtes a permis l'investigation, sur une période de quatre ans, de 995 individus appartenant à 30 espèces de chauves-souris. Ces individus ont été capturés dans 24 sites localisés en forêt primaire, lisières, zones anthropisées et urbaines en Guyane. Les données sérologiques ont révélé une circulation du RABV dans les communautés desmodines ainsi que dans 13 autres espèces de chauves-souris, avec une séroprévalence variant de 0 à 20%. Ces résultats suggèrent qu'il existe une importante diversité d'espèces-hôtes pour le virus rabique sur le territoire. Le suivi temporel des communautés de vampires montre des phénomènes de séroconversion et de diminution de l'immunité humorale, suggérant une exposition au RABV fréquente, probablement associée aux interactions sociales qui se produisent dans les différentes communautés. Ces résultats mettent également en évidence la capacité de l'hôte à contrôler et éliminer le virus. Le régime alimentaire, la sélection du gîte, les types de colonies et de végétation jouaient également un rôle dans la séropositivité pour le RABV. Le régime alimentaire hématophage, les colonies monospécifiques et les habitats forestiers présentant une végétation dense ont été identifiés comme facteurs clés pour le maintien de RABV. Ces résultats, dans un contexte d'accroissement constant des perturbations des habitats naturels, soulignent la nécessité de poursuivre la surveillance de la circulation du RABV dans les populations des chauves-souris vampires.

Enfin, l'analyse de 103 chauves-souris appartenant aux espèces *C. perspicillata*, *D. rotundus* et *M. molossus*, capturés dans 14 sites répartis en forêt primaire, lisières, zones anthropisées et urbaines, a permis d'identifier 19 allèles *DRB* pour *C. perspicillata*, 30 pour *D. rotundus* et 28 pour *M. molossus*. Nous avons identifié un mode de diversification par duplication du locus du CMH pour plusieurs individus des espèces *C. perspicillata* et *D. rotundus*. Ces résultats ont révélé, pour ces deux espèces, une plus grande plasticité des gènes *DRB* dans la course aux armements entre l'hôte et les pathogènes. Les patrons de diversité du *DRB* étaient semblables à ceux des marqueurs neutres (D-loop) pour *C. perspicillata* et *M. molossus*. Ces résultats suggèrent que l'introgession agit comme une force supplémentaire dans la mise en place de la diversité du *DRB*. En revanche, les patrons de diversités neutres et fonctionnelles étaient différents pour l'espèce *D. rotundus* pour laquelle une structuration génétique des populations a été soulignée. En outre, un avantage hétérozygote a été détecté. Ces résultats suggèrent que les pressions d'agents pathogènes associées aux caractéristiques environnementales sont un moteur de diversité pour les gènes *DRB* de cette espèce. La mise en

évidence de signatures de sélection positive propres, aussi bien à chaque espèce qu'à l'environnement dans lequel elles évoluent, confirme l'hypothèse que l'environnement est l'un des moteurs principaux de la diversité pour le *DRB*.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse montre que les composantes environnementales sont des facteurs clés des diversités virales et immunitaires. Associées aux caractéristiques spécifiques, elles jouent un rôle dans le maintien de ces diversités et déterminent les capacités d'adaptation des chauves-souris. Néanmoins, les processus démographiques ne doivent pas être occultés. En effet, ils semblent également contribuer au maintien des virus dans un environnement donné. Ce travail apporte ainsi des éléments de compréhension des mécanismes de maintien et de mise en place des diversités virales et immunitaires qui influencent l'adaptation locale des chauves-souris.

Abstract of the manuscript

Biodiversity is an essential component sustaining life on earth. The study of biodiversity includes the variety of life at all levels of organization—earth's species, their genes, the ecosystem in which they live as well as the variety of processes sustaining life therein—classified by both evolutionary and ecological criteria. Trophic and social interactions as well as evolutionary factors (e.g. genomic forces, natural selection, gene flow, genetic drift) are the main drivers of biodiversity. Therefore, both genetic and phenotypic variations within a species reflect the adaptation processes resulting from these key drivers under specific environmental constraints. Bats belong to the order *Chiroptera* and are the only mammals capable of true flight. They are recognized as excellent biodiversity indicators. Furthermore, these animals have been described as natural reservoirs and source of infection for several microorganisms, including pathogens responsible for severe human diseases. Currently, more than 1,300 different bat species are described with different habitats and sociality, reflecting a high diversity of bioecological features, life histories and adaptation capacity. Immunobiological studies suggest that bats present more effective anti-microbial strategies highly influenced by their biological traits as well as by the environmental-associated pathogen pressures.

The aim of this thesis was to better understand, using viral diversity and circulation of the rabies virus as a proxy, how bioecological constraints related to the phylogeny and the environment where they evolve, could impact the diversity of hosted viral communities and subsequently induce a local adaptation of immune genes. To answer this question, different objectives were designed.

The first objective was to characterize the viral populations hosted by different bat communities belonging to two neotropical bat species, *Desmodus rotundus* and *Molossus molossus*. These bat species evolve in sympatry in forest and urban areas in French Guiana. Secondly, we aimed to assess the environmental impact on the viral diversity harbored by these two bat species and identify the bioecological determinants involved. The third objective was to identify—through a RABV model of virus-host interaction—the predictive factors responsible for the maintenance and circulation of this virus at a community scale. Finally, the fourth aim was to explore the genetic diversity of MHC (*Major Histocompatibility Complex*) genes of three neotropical species (*D. rotundus*, *M. molossus* and *Carollia perspicillata*) to identify the main drivers of MHC polymorphism, and subsequently the adaptive potential of the three investigated species, in both natural and disturbed environments.

The characterization of viral diversity was performed on 298 saliva and stool samples collected from *D. rotundus* and *M. molossus* communities and allowed the identification of 48 viral families, including 14 viral families infecting vertebrates. Comparative analyses of viral diversity at both species and environmental scales revealed that trophic interactions and habitats were the main shapers of viral diversity. Furthermore, the diversity of viral families was more important in stool

samples collected in forest areas. These results revealed a better viral transmission capacity through fecal drops in these areas likely due to a higher diversity of preys compared to urban areas.

The RABV virus-host interaction model investigated a sample of 995 individuals belonging to 30 bat species collected during a 4-year period. These individuals were trapped in 24 sites distributed in pristine forests, edge habitats, anthropized and urban areas. Serological surveys revealed the presence of RABV in *D. rotundus* communities as well as in 13 other bat species (seroprevalence ranged from 0 to 20%), revealing a high diversity of hosts for this virus in French Guiana. The temporal monitoring of vampire communities revealed time-dependent seroconversion and waning immunity, suggesting frequent exposure to RABV likely associated with social interactions in the different communities. These results also highlighted the host's ability to control and eliminate the virus. The diet, the types of roost and colonies as well as the forest vegetation played a role in RABV seropositivity. The hematophagous diet, monospecific colonies and dense forest habitats were identified as key drivers of the maintenance of RABV, highlighting the necessity to further monitor RABV circulation in vampire bat populations, in a context of an increasing landscape disturbance.

Lastly, the genetic diversity of MHC genes was assessed on 103 samples from *C. perspicillata*, *D. rotundus* and *M. molossus* species, trapped in 14 sites distributed in pristine forests, edge habitats, anthropized and urban areas. This analysis allowed identifying 19 *DRB* alleles for *C. perspicillata*, 30 for *D. rotundus* and 28 for *M. molossus*. We identified a mode of MHC diversification through locus duplication for several individuals from *C. perspicillata* and *D. rotundus* species. These results revealed a greater plasticity of *DRB* genes in the arms-race between host and pathogens in these species. The patterns of *DRB* diversity were similar to those of neutral markers (D-loop) for *C. perspicillata* and *M. molossus*. These results revealed that introgression acted as an additional force in shaping *DRB* diversity. In contrast, *DRB* and D-loop diversity patterns were different for *D. rotundus* for which a geographical structure was highlighted. Furthermore, a heterozygous advantage was spotted. These results suggested that environmental-associated pathogen pressures were the main driver of *DRB* diversity for this species. The area-specific and species-specific signatures of positive selection highlighted in our samples, corroborated that environment and contrasting pathogen pressures strongly contributed to *DRB* diversity.

Altogether, the results obtained during this thesis showed that environmental components were key factors of both viral and immune diversities. Associated with species characteristics, environment plays a key role in shaping both diversities and determines the adaptation ability of bats. Nevertheless, demographic processes should not be overshadowed as they seem to contribute to the maintenance of viruses in a given environment. This work sheds light on the mechanisms maintaining and shaping both viral and immune diversities and subsequently influencing the local adaptation of bats.

Avant-propos

Cette thèse s'inscrit dans le cadre de l'obtention du titre de Docteur en Sciences, mention Physiologie et biologie des organismes-populations-interactions au sein de l'École Doctorale ED 587 *Diversités, santé et développement en Amazonie* de l'Université de Guyane.

Les travaux menés au cours de ma thèse ont porté sur la caractérisation de la diversité génétique de la chaîne *bêta* du gène *DR* (*DRB*) du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II de trois espèces de chauves-souris communes de Guyane française. En parallèle, la diversité virale de deux de ces trois espèces a été déterminée. J'ai également participé à une étude portant sur le rôle des facteurs bioécologiques dans la circulation du virus de la rage dans les populations de chiroptères de Guyane. La finalité de mon projet était d'appréhender les facteurs majoritairement impliqués dans les interactions entre les chauves-souris et les virus et de mettre en évidence les relations entre la distribution des populations de chauves-souris, leur diversité virale et la modification de leurs habitats naturels.

Les expérimentations ont été effectuées au sein du Laboratoire des Interactions Virus-Hôtes (LIVH) de l'Institut Pasteur de Cayenne, sous la responsabilité du Dr. Anne LAVERGNE entre octobre 2012 et octobre 2016. L'obtention du virome a été effectuée par séquençage Illumina® à la plateforme PF1 de l'Institut Pasteur de Paris. Cette thèse s'inscrit dans la dynamique de recherche actuelle du LIVH et s'insère dans plusieurs projets menés par le laboratoire en collaboration avec des équipes locales, nationales et internationales. Les résultats apportés par mon travail de thèse sont valorisés par trois articles de recherche (accepté ou en cours de publication) qui font l'objet de chapitres dans ce manuscrit.

Les différents axes de cette thèse m'ont permis d'approfondir mes connaissances en immunologie et de comprendre les grands principes fondamentaux en écologie. Ils m'ont également permis de renforcer mes techniques de biologie moléculaire, de découvrir l'univers de la métagénomique, ainsi que de mettre en place, réviser et perfectionner des protocoles d'études, que ce soit pour le traitement des échantillons ou celui des données.

Organisation du manuscrit

Le manuscrit de thèse comprend quatre grandes parties :

* une introduction (**Partie 1**, « *Diversité, interactions, évolution : les chiroptères, un modèle* »), qui présente (i) les principes généraux afférents à la mise en place de la biodiversité et aux mécanismes évolutifs associés (ii) la description des chiroptères en tant que réservoirs majeurs de microorganismes dont les virus, de leurs caractères bioécologiques, de la diversité des microorganismes hébergés par ces mammifères et des processus de réponse à l'infection. Elle présente pour finir les modèles d'étude et objectifs de ce travail.

* deux articles de recherche sur la diversité virale des chauves-souris et la circulation du virus rabique (**Partie 2**, « *Diversité virale des chiroptères*, est organisée en deux grands chapitres ») rédigés pour le chapitre **2.1**, sous un format d'article soumis au journal PLOS ONE et pour le chapitre **2.2**, sous format publié sous la référence : de Thoisy, B., Bourhy, H., Delaval, M., Pontier, D., Dacheux, L., Darcissac, E., Donato, D., Guidez, A., Larrous, F., Lavenir, R., **Salmier, A.**, Lacoste, V., Lavergne, A. (2016). Bioecological Drivers of Rabies Virus Circulation in a Neotropical Bat Community. PLOS Neglected Tropical Diseases, 10(1), e0004378. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004378>.

* un article de recherche sur la diversité du gène *DRB* du CMH de classe II (**Partie 3**, « *Diversité immunitaire des chiroptères* »), également sous format publié sous la référence : Salmier, A., de Thoisy, B., Crouau-Roy, B., Lacoste, V., & Lavergne, A. (2016). Spatial pattern of genetic diversity and selection in the MHC class II *DRB* of three Neotropical bat species. BMC Evolutionary Biology, 16, 229. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0802-1>.

* une discussion générale (**Partie 4**, « *Discussion générale et perspectives* ») sur les principaux résultats de cette thèse et les perspectives amenées par ce travail.

Liste des figures

Figure 1 : Principales composantes de la diversité biologique sur Terre.....	3
Figure 2 : Forces génomiques influençant la diversité génétique.	5
Figure 3 : Différents types de sélection naturelle.	8
Figure 4 : La dérive génétique.....	10
Figure 5 : Triade d'interaction des facteurs causaux dans la transmission de maladie infectieuse.	14
Figure 6 : Relations phylogénétiques des chiroptères.....	20
Figure 7 : Distribution spatiale et richesse spécifique des chiroptères dans le monde.....	22
Figure 8 : Distribution géographique des lyssavirus de chauves-souris à travers le globe.....	28
Figure 9 : La réponse immunitaire.	33
Figure 10 : Structure des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classes I et II.	39
Figure 11 : <i>Carollia perspicillata</i>	44
Figure 12 : <i>Desmodus rotundus</i>	45
Figure 13 : <i>Molossus molossus</i>	46

1.

**DIVERSITÉ, INTERACTIONS, ÉVOLUTION :
LES CHIROPTÈRES, UN MODÈLE**

1.1. Diversité biologique et adaptation

Inventée et introduite pour la première fois en 1980 par le biologiste américain, Thomas E. Lovejoy, la *diversité biologique* ou *biodiversité* est définie comme étant « la variété et la variabilité de tous les organismes vivants. Ceci inclut la variabilité génétique au sein des espèces et de leurs populations, la variabilité des espèces et de leurs formes de vie, la diversité des complexes d'espèces associées et de leurs interactions, et celle des processus écologiques qu'ils influencent ou dont ils sont les acteurs (dite diversité écosystémique) (Wilson et al. 1988) » (Figure 1). Que ce soit à une échelle individuelle ou une échelle plus large, la biodiversité englobe plusieurs niveaux de complexité. On distingue : (1) la diversité génétique, sous-jacente à la diversité des phénotypes observés, et par conséquent des espèces. Elle inclut la variété des gènes, des allèles et des structures chromosomiques trouvés au sein d'une même espèce, d'une population, d'une communauté écologique, biome, etc. ; (2) la diversité spécifique, qui est la plus évidente, et fait référence à la variété des espèces trouvées dans un milieu donné ; (3) la diversité des écosystèmes, qui intègre l'ensemble des milieux de vie présents sur Terre. Les écosystèmes de la zone intertropicale hébergent la plus grande partie de la diversité biologique mondiale actuelle. Les notions d'interactions, de dépendance et de rétroactivité entre les différents éléments qui constituent ces écosystèmes y sont très importantes ; (4) la diversité fonctionnelle qui englobe l'ensemble des processus se déroulant dans les écosystèmes dont, entre autres, les interactions trophiques qui permettent le maintien de la vie dans ces derniers.

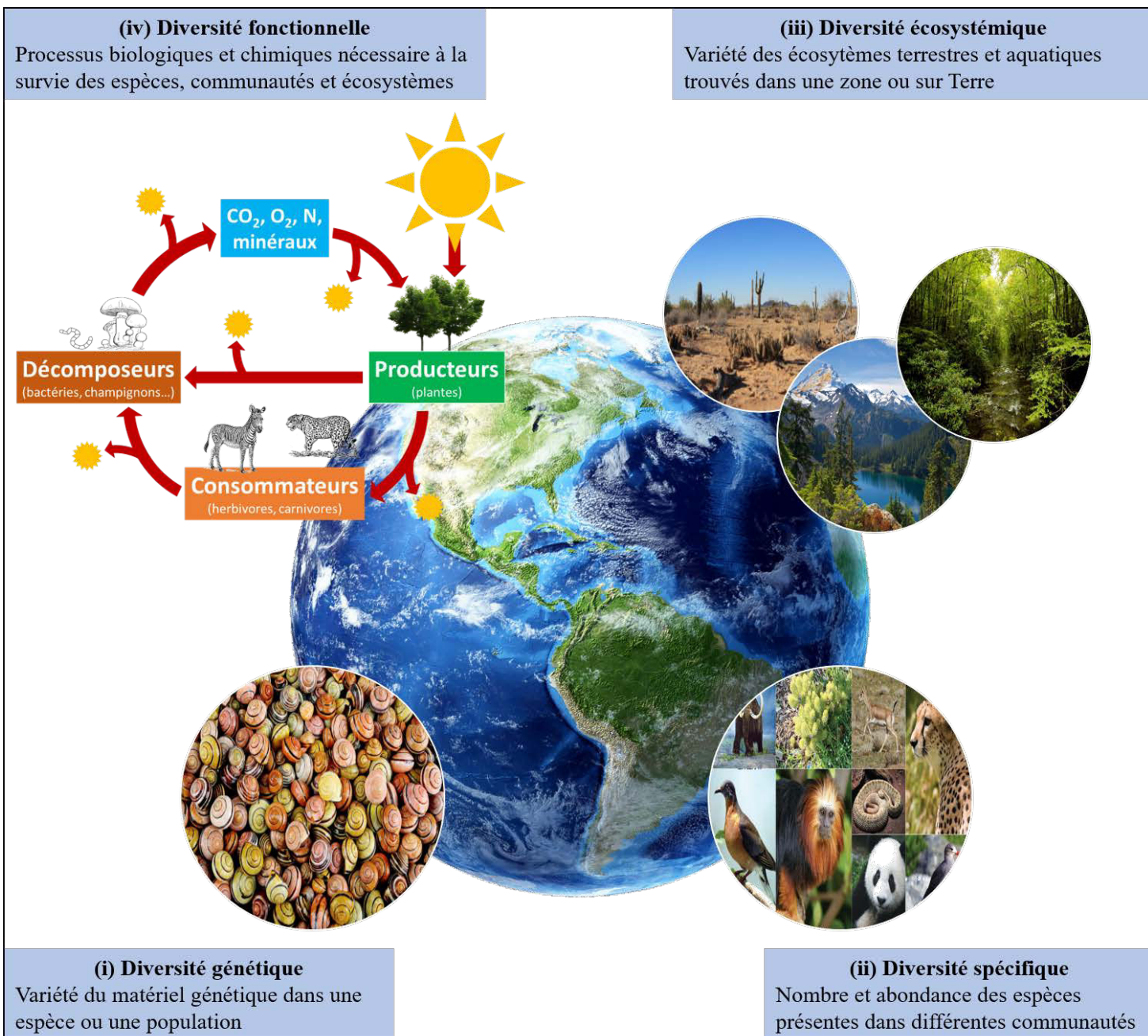


Figure 1 : Principales composantes de la diversité biologique sur Terre. Adapté de Miller et Spoolman (2009). La diversité biologique inclut la variété (i) des gènes, (ii) des espèces, (iii) des écosystèmes dans lesquels vivent ces espèces, et (iv) l'ensemble des mécanismes nécessaires à la vie se déroulant dans ces écosystèmes.

Essentielle à la viabilité, au potentiel évolutif et au succès reproducteur (*fitness*) des populations naturelles, la diversité biologique est un élément fondamental au maintien de la vie sur Terre et un moteur d'adaptation dans une situation de variabilité environnementale (Frankham et al. 2002; Miller et Spoolman 2009). Sa préservation est d'autant plus importante que toute modification, même minime, en son sein peut induire des changements dans le maintien des niches écologiques des espèces. Autrement dit, l'équilibre de l'ensemble des caractéristiques physiologiques, écologiques et démographiques nécessaires à la survie d'un organisme, d'une espèce, d'un groupe, d'une population, etc. dans son milieu, le rôle de chaque individu dans ce dernier, est dépendant de la bonne préservation de la biodiversité. Les diversités génotypiques observées dans un organisme, une espèce, un groupe, etc. reflèteraient les effets des facteurs évolutifs (mutations, recombinaisons, sélection naturelle, flux génique, dérive génétique, etc.) et des phénomènes d'adaptation en réponse à ces derniers afin de rétablir l'équilibre et ainsi d'assurer la pérennité des individus.

A. Facteurs évolutifs et adaptation

Les facteurs évolutifs ont un impact sur la diversité génétique des populations. On reconnaît quatre phénomènes majeurs : (1) les forces génomiques basées sur des phénomènes aléatoires (mutations et recombinaisons) touchant le génotype des individus qui induisent des polymorphismes chromosomiques et alléliques ; (2) la sélection naturelle de certains phénotypes induite par les pressions environnementales existant dans l'écosystème dans lequel évolue l'individu ; (3) le flux génique ; (4) la dérive génétique. Ces quatre mécanismes, bien qu'indépendants, vont également être influencés par l'histoire démographique des espèces et populations étudiées (les effets de modification des densités ou de migration des populations). Toutes modifications soudaines de la taille d'une population induisent un changement dans la diversité de celle-ci. Dans les populations ayant souffert d'évènements qui ont conduit à une réduction drastique du nombre d'individus, tels que les épidémies, goulots d'étranglement, etc., on observera une diversité génétique très diminuée par rapport à la population d'origine. A l'inverse, une population dite en expansion pourra voir sa diversité génétique augmenter. Les phénomènes migratoires contribuent également à la diversité par l'apport de nouveaux allèles dans les populations.

i. Les forces génomiques

Produites au cours des divisions cellulaires et basées sur les modifications directes du matériel génétique, elles sont à l'origine de la diversité génétique d'un individu, d'une espèce ou d'une population donnée, et induisent dans certains cas une diversité phénotypique.

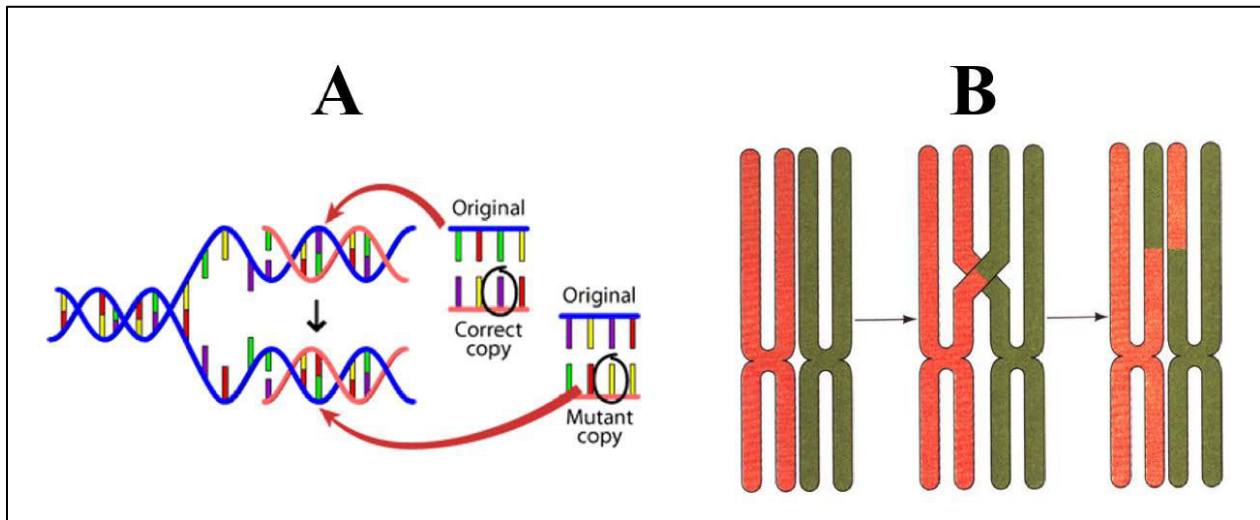


Figure 2 : Forces génomiques influençant la diversité génétique. (A) Mutations génétiques. (B) Mécanisme de recombinaison chromosomique.

Engendrées au cours des processus de réplication ou de réparation, les mutations, premières forces génomiques (Figure 2A), provoquent le remplacement d'un nucléotide par un autre et peuvent induire un phénotype différent selon leur nature. Une mutation synonyme (d_S), ou silencieuse, n'indira pas de modifications dans la séquence protéique, du fait de la redondance du code génétique (le nouveau codon code le même acide aminé que le codon original), ou parce qu'elle touche une région non codante de l'ADN, ou un intron. A l'inverse, une mutation non synonyme (d_N), ou non silencieuse, induira une modification de la séquence protéique (le nouveau codon code un acide aminé différent du codon original). Outre le remplacement nucléotidique, il existe les phénomènes dits *indels*, c'est-à-dire d'insertion ou de délétion d'un ou plusieurs nucléotides, les phénomènes d'échanges d'une fraction d'ADN entre deux chromosomes non-homologues, dits translocations, ou encore les phénomènes d'inversion qui peuvent atteindre plusieurs milliers de paires de bases (Vasseur 2011).

Réalisés au cours de la méiose, les mécanismes de recombinaison intra ou inter-chromosomiques, deuxièmes forces génomiques (Figure 2B), induisent un brassage génétique qui assure la dissemblance entre les individus. Lorsque s'effectue une association préférentielle (plus souvent ou moins souvent que ne le voudrait le hasard) entre les allèles de plusieurs marqueurs, on peut avoir un déséquilibre de liaison dans certaines régions bien précises du génome, avec des recombinaisons possibles dans ces mêmes régions. L'existence de ce déséquilibre de liaison est favorisée, entre autres, par la proximité physique des *loci* ou par une pression de sélection simultanée sur plusieurs marqueurs. La recombinaison contribue au déséquilibre de liaison suite à la modification de l'association des allèles portés par les chromosomes.

ii. La sélection naturelle

Basée sur le principe d'évolution darwinien, la sélection naturelle permet de favoriser les individus les mieux adaptés, et contribue ainsi à la viabilité et au maintien des espèces auxquelles ces individus appartiennent. Elle est à la base des phénomènes adaptatifs locaux (Kaltz et Shykoff 1998). On distingue trois types de sélection naturelle : (1) la sélection négative ou purificatrice, à l'origine d'une diminution de la diversité génétique et d'une augmentation relative du nombre d'allèles rares ; (2) la sélection positive qui, à l'instar de la négative, entraîne une diminution de la diversité génétique et une augmentation du nombre d'allèles rares et est marquée par des signatures de sélection propres ; et (3) la sélection balancée, à l'origine d'une augmentation de la diversité génétique et du nombre d'allèles à fréquences intermédiaires et d'une diminution de la différenciation entre les populations.

• *La sélection négative*

Lorsqu'une mutation non avantageuse apparaît dans un environnement donné, sa fréquence est très vite diminuée jusqu'à tendre à sa disparition en faveur de l'allèle sauvage (Figure 3B). Ces mutations sont éliminées d'autant plus rapidement qu'elles ont un effet délétère sur l'organisme qui les porte : c'est la sélection négative ou purificatrice. Les signatures de sélection négative sont généralement plus marquées sur les gènes remplissant des fonctions essentielles pour l'organisme (immunité,

métabolisme, etc.). Elle sert de sentinelle pour la viabilité et le maintien d'une population dans un environnement et constitue un marqueur de l'importance de certains gènes.

- *La sélection positive*

Lorsqu'une mutation confère un phénotype avantageux à un organisme dans un environnement donné (meilleure *fitness*), si elle est héritable, sa fréquence a tendance à augmenter. Ceci est d'autant plus vrai lorsqu'il s'agit de gènes d'importance pour l'organisme. Avec le temps, cette mutation va se fixer dans la population, c'est la sélection positive (Figure 3A). Ainsi, tout gène soumis à ce type de sélection portera, localement ou tout le long de sa séquence, des mutations altérant la protéine, qui présenteront des fréquences élevées dans une population donnée. Paradoxalement, elle permet également le maintien de la fréquence de maladie récessive malgré une sélection totale contre les homozygotes. C'est l'avantage sélectif des hétérozygotes, également appelé *overdominance*. En effet, les hétérozygotes ont une *fitness* supérieure à celle des homozygotes normaux et transmettent donc, à la génération suivante, un excès d'allèles mutés. C'est le cas de la drépanocytose et du déficit en G6PD, deux maladies du globule rouge particulièrement répandues en Afrique, les hétérozygotes étant résistants au paludisme, facteur de mortalité majeur dans ces régions (Ruwende et al. 1995).

- *La sélection balancée*

Lorsqu'à un locus donné on observe des variants alléliques de fréquences intermédiaires on parle de sélection balancée (Figure 3C). Le phénotype hétérozygote procure la meilleure *fitness* à la population. L'exemple typique est celui des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité où la sélection balancée confère un avantage sélectif et permet le maintien d'un polymorphisme élevé de ces gènes et le maintien d'allèles pendant de longue période de temps (Hughes et Yeager 1998).

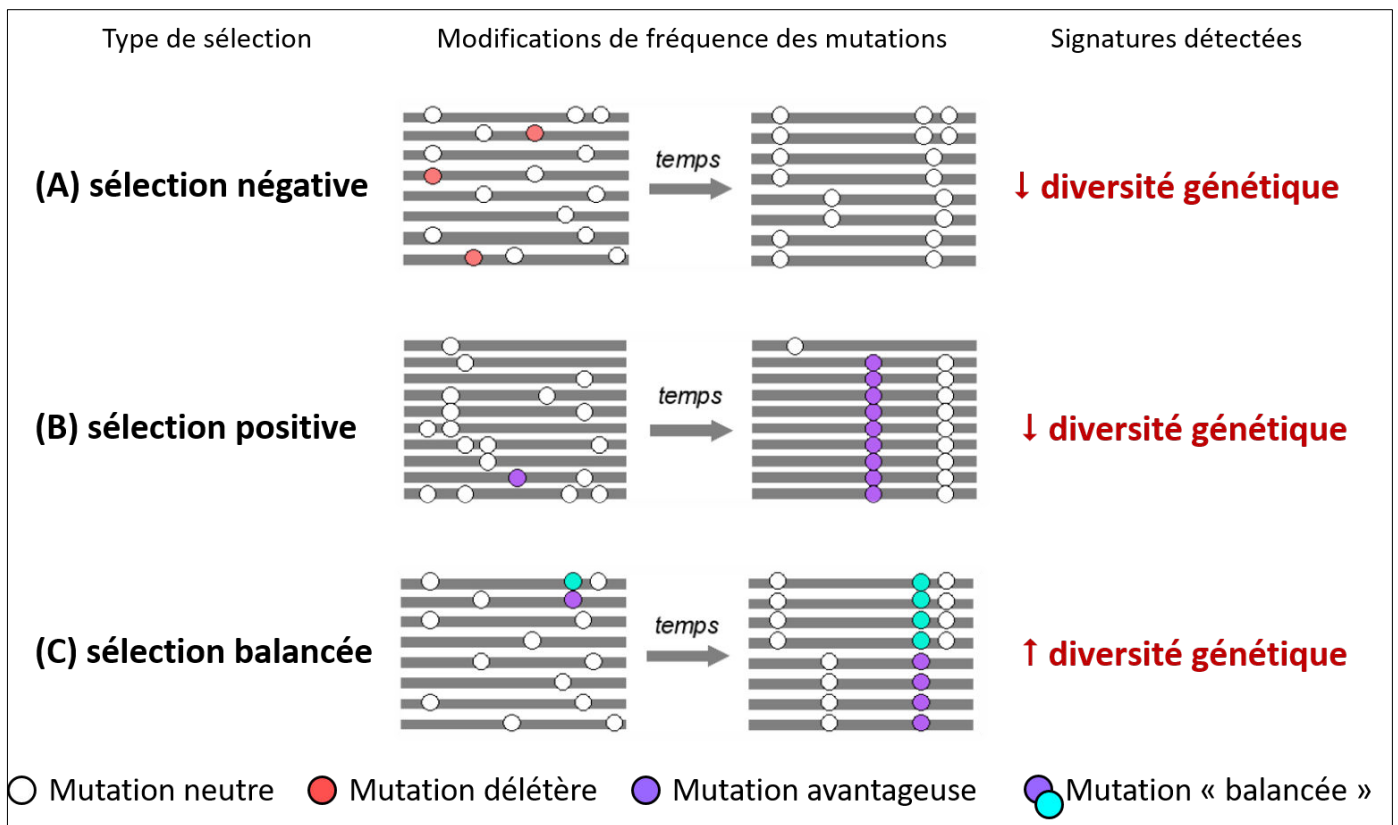


Figure 3 : Différents types de sélection naturelle. Adapté de Toussaint et al. (2012). Chaque type de sélection et les effets associés sur la diversité sont représentés. La distribution des mutations (ronds) sur les chromosomes (barres grises) est représentée avant et après sélection. (A) Sélection purificatrice ou négative, une mutation délétère (rond noir) pour l'organisme est progressivement éliminée. Elle contribue à l'augmentation du nombre d'allèles rares et diminue la diversité génétique. (B) Sélection positive, une mutation avantageuse (rond rouge) devient plus fréquente dans la population et peut engendrer des variations neutres (rond bleu). Elle contribue à l'augmentation du nombre d'allèles rares, du déséquilibre de liaison et de la différenciation entre les populations. La sélection positive diminue la diversité génétique. (C) Sélection équilibrée ou balancée, les mutations confèrent un avantage sélectif et augmentent la *fitness* des individus hétérozygotes pour celles-ci par rapport à des individus homozygotes. Elle contribue au maintien de la diversité dans une population, augmente le nombre d'allèles à fréquences intermédiaires et diminue la différenciation entre les populations.

iii. Le flux génique

Également appelé *flux* ou *migration de gènes*, le flux génique correspond à la transmission efficace de caractères héréditaires d'une population à une autre population, en général par des migrations d'individus. Les flux géniques peuvent également s'appliquer aux échanges de gènes entre individus au sein d'une même population. Ils ont généralement lieu au sein d'une même espèce, bien que différents exemples de flux de gènes interspécifiques existent (Ronfort et al. 2005). Ils ont un rôle prépondérant dans l'organisation de la diversité génétique, qu'elle soit au niveau de l'individu, au sein d'une population, de l'espèce, etc. (caractère multiéchelles) et contribue à l'homogénéisation des fréquences alléliques entre les populations. Ainsi, en fonction de l'intensité des échanges, les populations seront plus ou moins semblables. Les flux géniques représentent ainsi un facteur évolutif majeur, au même titre que les forces génomiques, la sélection naturelle ou la dérive génétique.

iv. La dérive génétique

Phénomène purement aléatoire, la dérive génétique survient pendant le croisement au hasard des gamètes mâles et femelles lors de la fécondation (Figure 4). Elle contribue à la modification des fréquences alléliques existantes dans une population au cours des générations. Au cours de l'évolution, lorsqu'apparaît un allèle ne conférant pas d'avantage de survie ou de reproduction (allèle neutre), le devenir de ce dernier est déterminé par la dérive génétique. Ainsi, il pourra disparaître, être fixé ou tout simplement fluctuer, c'est-à-dire qu'il ne se fixera pas mais ne disparaîtra pas. Toutefois, le phénomène de dérive génétique est fortement dépendant de la taille de la population efficace, c'est-à-dire du nombre d'individus qui contribue de façon efficace à la reproduction dans une population où les rencontres s'effectuent de manière aléatoire. En effet, l'impact de la dérive génétique dans une population sera proportionnel à sa taille. Par exemple, un allèle non neutre et faiblement désavantageux peut se fixer par dérive dans une petite population.

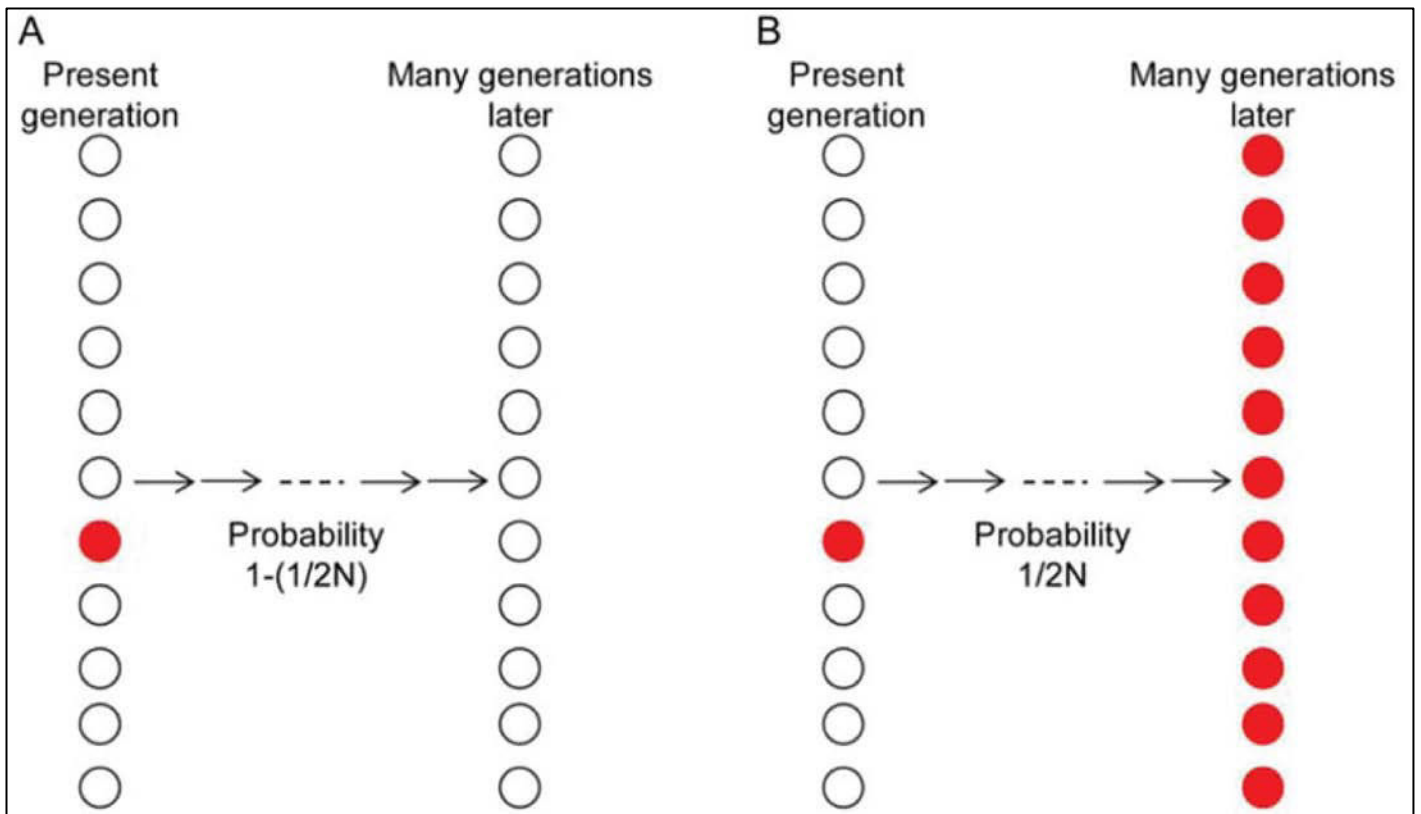


Figure 4 : La dérive génétique. Extrait de Vasseur (2011), adapté de (Hartl et Clark 2007). Un nouvel allèle (rond rouge) dans une population diploïde de taille efficace de population (N) a une probabilité de disparition (A) de $1-(1/2N)$ et une probabilité de fixation (B) de $1/2N$. L'impact de la dérive génétique est donc beaucoup plus important dans les populations de petite taille.

B. Les relations hôtes-pathogènes

Tout au long de leur existence, les êtres vivants hébergent une diversité importante d'agents biologiques (virus, bactéries, champignons, protozoaires, etc.) avec lesquels ils développent des interactions privilégiées, durables et maintenues dans les générations successives. Ces êtres vivants sont qualifiés d'organismes hôtes. Les relations étroites et durables ainsi mises en place confèrent un environnement adéquat à l'agent biologique et nécessaire au maintien du cycle de vie de ce dernier. Toute évolution de l'organisme hôte se répercutera sur celle des microorganismes qu'il héberge et *vice versa*. Il est admis que la circulation, le maintien et la biodiversité des microorganismes dans un milieu sont pondérés par la proximité entre les organismes et par les contacts établis entre les hôtes. Les interactions sociales établies entre les hôtes sont par nature hétérogènes dans leur fréquence, leur type et leur intensité (Duboscp et Heeb 2015). Elles peuvent être observées aussi bien entre les individus d'une même espèce (relations intraspécifiques) qu'entre les individus d'espèces différentes (relations interspécifiques). La prépondérance des interactions inter- et/ou intraspécifiques induit alors de la diversité chez les microorganismes, mais également chez les hôtes dont les capacités d'adaptation, entre autres immunologiques, sont mises à l'épreuve.

i. Interactions sociales

Les **relations intraspécifiques** sont observées au sein d'une population, c'est-à-dire dans un ensemble d'individus appartenant à la même espèce et vivant dans un territoire donné. Cela comprend les phénomènes de coopération ou de compétition, avec partage du territoire, et parfois une organisation en société hiérarchisée dans laquelle chaque individu a un rôle qui lui est propre dans le groupe social établi. Les relations intraspécifiques permettent, entre autres, l'orientation des comportements sociaux, l'organisation des comportements de reproduction, de protection et de nourrissage, ainsi que la compétition pour les ressources en cas de manque. La transmission des microorganismes dans les groupes sociaux intraspécifiques sera influencée par la prévalence des microorganismes et par les densités de populations, indicatrices de l'intensité et de la diversité des échanges sociaux (Altizer et al. 2003).

Les **relations interspécifiques** sont multiples et de caractéristiques différentes : bénéfique, neutre ou nuisible. Depuis le partenariat indispensable jusqu'à un certain degré de parasitisme bien supporté par l'hôte, en passant par le cas où l'association n'est vitale que pour l'un des deux partenaires. Parmi les plus connues et étudiées, on peut citer la prédation, la compétition et les relations symbiotiques telles que le mutualisme, le parasitisme et le commensalisme.

La symbiose, le mutualisme et le commensalisme sont des interactions biologiques durables entre les protagonistes, sans effets délétères. Lorsque l'ensemble des organismes impliqués tirent profit de la relation, on parle de mutualisme ou de relation à bénéfices réciproques. Lorsque la relation est obligatoire, c'est-à-dire nécessaire à la survie des protagonistes, on parle de relation symbiotique. À l'inverse, lorsque la relation à bénéfices réciproques n'est pas obligatoire, c'est-à-dire que l'arrêt de ce type de relation ne met en pas jeu la survie des protagonistes impliqués, on parle de relation mutualiste. Les interactions mutualistes sont vitales pour les écosystèmes terrestres et semblent avoir favorisé l'évolution d'une grande partie de la biodiversité (van Beneden 1876).

Lorsqu'une adaptation des espèces associées est nécessaire on parle de commensalisme. L'agent biologique se développe au sein de son hôte, sans en affecter ses capacités de survie et reproduction. Néanmoins, à la différence du mutualisme, le bénéfice relationnel est unilatéral, l'hôte n'obtient ni avantage, ni désavantage (Poreau 2014). Toute modification chez une des espèces impliquées dans la relation peut influencer la survie et la reproduction de l'autre. Tout comme le mutualisme, les relations commensales contribuent au maintien de la biodiversité (i) de l'hôte, par la multiplication des mécanismes de protection/défenses de l'hôte et (ii) de l'agent biologique, par la multiplication des mécanismes d'échappement aux défenses de son hôte. L'ensemble de ces relations sont à l'équilibre. Toutefois, l'équilibre reste fragile et sujet aux perturbations affectant les environnements dans lesquels évoluent l'hôte et l'agent biologique.

Le parasitisme est non-mutualiste et délétère pour l'hôte dont la *fitness* est réduite par l'apparition de la maladie. La présence de l'agent biologique impacte les fonctions reproductrices et le comportement de l'hôte, pouvant conduire, à terme, à sa mort. À l'inverse, la *fitness* de l'agent biologique augmente

par l'exploitation d'hôtes multiples (adaptation nécessaire à chaque hôte rencontrée) nécessaire à sa survie et à sa transmission.

Dans le cadre de la compétition, les protagonistes partagent une même niche écologique (ou habitat) et la même ressource alimentaire. Ce type d'interaction contribue fortement à la diversité biologique des protagonistes lorsque ceux-ci doivent, lorsque les ressources viennent à manquer, coloniser une nouvelle niche écologique pour subsister.

Enfin, les relations neutres ou neutralisme sont une absence d'interaction entre les espèces.

À l'instar des transmissions intraspécifiques de microorganismes, les transmissions interspécifiques sont dépendantes de la prévalence et des densités de populations. Toutefois, les capacités de passage interespèces seront dépendantes des caractéristiques intrinsèques des microorganismes (virulence, adaptabilité, capacité de répllication dans le nouvel hôte, etc.), des hôtes (système immunitaire, âge, exposition, etc.) et des contraintes environnementales. Ce sont les trois déterminants de l'émergence de maladies infectieuses dans une population donnée (Figure 5).

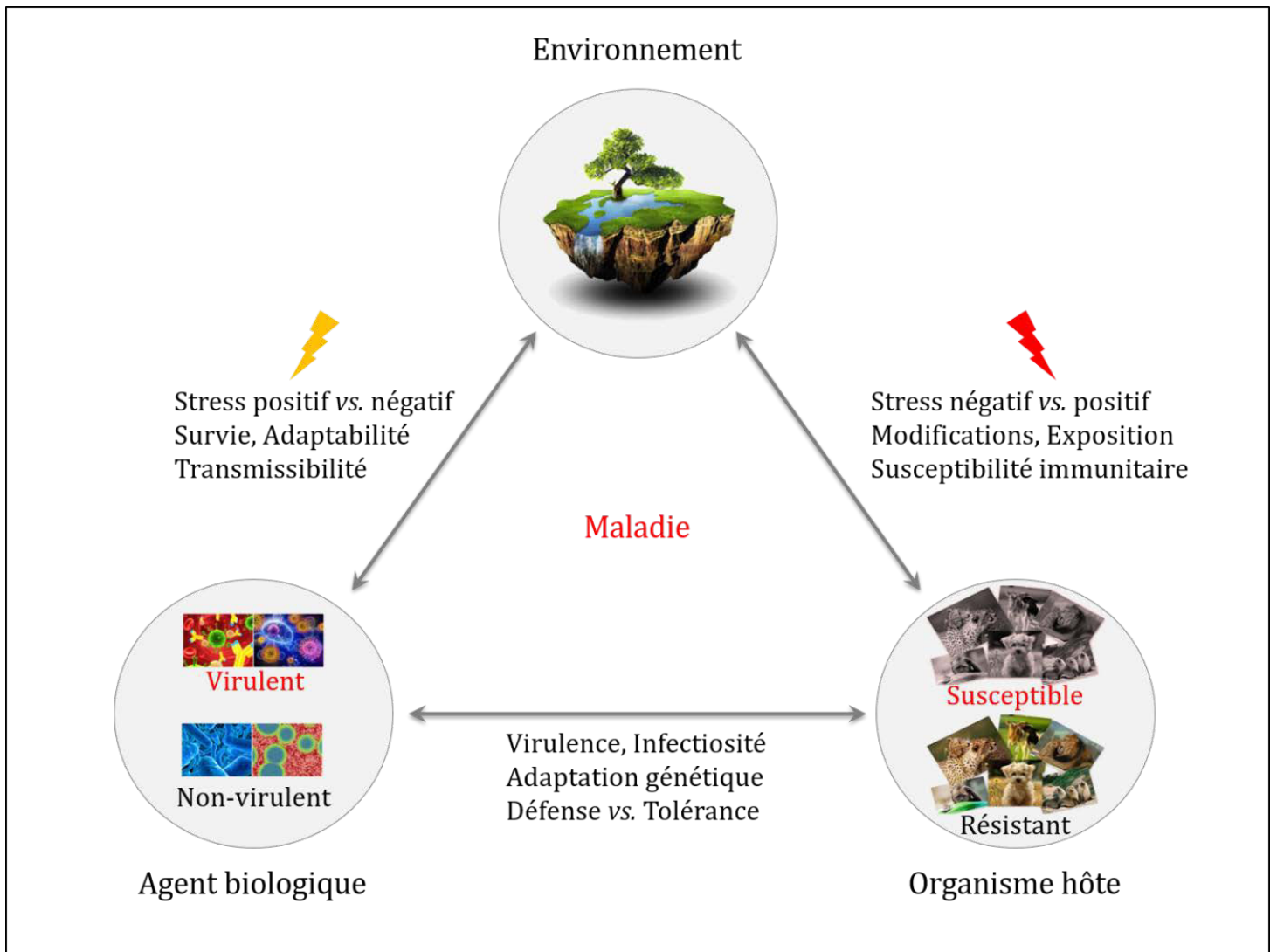


Figure 5 : Triade d'interaction des facteurs causaux dans la transmission de maladies infectieuses. Les conditions environnementales sont un moteur majeur de diversité biologique. Elles induisent des pressions qui favorisent ou défavorisent aussi bien le développement, les capacités de survie, d'adaptation, de transmission, etc. des agents biologiques que les capacités de résistance aux agents biologiques des organismes hôtes. Pour exemple, un environnement trop froid ou trop sec peut diminuer les capacités immunitaires de l'hôte (stress négatif) et parallèlement favoriser l'adaptation de certains agents biologiques (stress positif). Les conditions environnementales jouent également un rôle dans l'établissement, la fréquence et l'intensité des interactions, qu'elles soient entre les hôtes ou entre les agents biologiques et les hôtes.

Selon la nature de ses relations avec l'agent biologique, l'organisme hôte pourra être primaire (aussi appelé hôte définitif), réservoir secondaire (aussi appelé intermédiaire), de prédilection, amplificateur ou simplement constituer une impasse biologique pour l'agent biologique (*dead-end host*). L'hôte primaire permet à l'agent biologique d'atteindre sa maturité et d'effectuer sa reproduction sexuée et asexuée lorsque les conditions le permettent. En effet, lorsque l'agent biologique prolifère chez l'organisme hôte de manière prépondérante, il s'ensuit chez ce dernier la mise en place de mécanismes de défenses intrinsèques pour contrôler ou éliminer cet agent biologique. À l'inverse, lorsque cette prolifération est sans conséquence chez l'organisme hôte (absence d'apparitions de maladies ou de symptômes), il s'ensuit une relation durable de l'agent biologique avec son organisme hôte qui est alors qualifié de réservoir naturel.

Quelle que soit la nature de ces interactions, leur équilibre dynamique constitue un moteur de la diversité pour chaque être. En effet chaque composante d'un écosystème agit de façon rétroactive sur les propriétés, le fonctionnement et l'évolution des éléments qui le composent. Ainsi, en fonction de la nature de l'élément, *i.e.*, qu'il soit isolé ou inclus dans un système plus ou moins complexe, un écosystème et ses éléments constitutifs présenteront des propriétés totalement différentes. Si l'on considère l'échelle la plus fine de l'écosystème, chaque élément peut être considéré comme un sous-système, *i.e.*, l'agent biologique et son hôte. Ainsi, la diversité biologique observée pour chaque élément, est alors la résultante de l'action des sous-systèmes et du système plus vaste dans lequel il s'insère.

ii. Interactions trophiques

Les relations *trophiques* prédateurs/proies se caractérisent par un équilibre dynamique : le nombre de prédateurs est défini par le nombre de proies disponibles dans l'écosystème. Elles sont garantes de la viabilité, de la stabilité et du bon fonctionnement des écosystèmes (Jiang et al. 2009). À une échelle individuelle, c'est-à-dire lorsque l'on considère un prédateur et une proie, on constate que ce type de relation est à bénéfice unilatéral : seul le prédateur est bénéficiaire, sa proie est tuée, mangée et son information génétique disparaît et n'induit aucun changement chez le prédateur. Toutefois, le

prédateur est tributaire de la présence et du nombre de proies dans un environnement donné, ce qui nécessite des adaptations particulières à ses proies. En effet, selon les contraintes environnementales et les pressions de sélection, le prédateur (à l'échelle d'une population ou d'une espèce) peut être amené à se spécialiser sur un type de ressource alimentaire, on parle d'espèce spécialisée (ou spécialiste). Sinon, le prédateur peut être amené à devenir généraliste, c'est-à-dire qu'il sera capable de subsister dans des conditions environnementales plus variées et d'utiliser une plus grande variété de ressources alimentaires (Gary et Thorpe 2009; Miller et Spoolman 2009). Ainsi, lorsque les ressources viennent à manquer on peut observer : une diminution du nombre de prédateurs spécialistes, une modification de leur niche spatiale, c'est-à-dire un déplacement des populations de prédateurs vers un autre écosystème où se trouve la proie dont ils sont spécialistes ou une généralisation. À une échelle plus large (populations), les relations prédateurs/proies sont bénéfiques : elles permettent un maintien de l'écosystème à l'état d'*équilibre* en régulant le nombre de proies ; elles assurent également la pérennité des populations de proies en assurant une sélection sur les individus les plus faibles, malades ou âgés et limitent ainsi l'expansion des maladies (Genovart et al. 2010).

iii. Perturbations et diversité biologique

L'accroissement rapide et continu des modifications environnementales des milieux naturels menace le maintien de la biodiversité et est à l'origine de l'appauvrissement en richesse spécifique, de la diminution des ressources et des phénomènes d'émergence de maladies infectieuses (Frankham 2005; Keesing et al. 2010; Hooper et al. 2012). L'augmentation des densités humaines et des activités subséquentes (ex. déforestation, agriculture massive, chasse, mouvement de populations) est la principale cause des changements environnementaux. Du fait de la rapidité de ces phénomènes, les populations naturelles doivent s'adapter sur un nombre de génération restreint. Si l'échelle de temps est incompatible avec l'évolution des espèces, et donc avec leur capacité à s'adapter, les perturbations peuvent induire une diminution de la taille efficace des populations. Il s'ensuit une diminution de leur diversité génétique, à l'origine de la *fitness*, et une augmentation du risque d'extinction (Miller et Spoolman 2009). Bien que certaines espèces montrent un potentiel d'adaptation rapide en réponse aux fortes pressions de sélection induites par ces changements (Thompson 1998; Hairston et al. 2005;

Stuart et al. 2014), la modification de leur dynamique dans un environnement donné engendre des effets néfastes, souvent à l'origine d'une perte de diversité (Ostfeld 2009). Ainsi, l'étude de la biodiversité et plus particulièrement de la diversité génétique des hôtes et des microorganismes qu'ils hébergent, joue un rôle crucial dans la compréhension des facteurs impliqués dans les processus d'adaptation. De même, du fait des relations d'interdépendance établies dans les différents milieux, la mesure de l'impact des modifications de ces derniers sur la biodiversité est essentielle.

C. Les chiroptères : diversité et adaptation

Trouvant leur origine il y a plus de 70 millions d'années (dos Reis et al. 2014), les chiroptères (*Chiroptera*), constituent un ordre de la classe des mammifères (*Mammalia*). Ubiquiste, l'ordre des chiroptères est remarquable pour sa grande diversité et ses capacités d'adaptation. Il représente près d'un quart des espèces vivantes de mammifères connues à ce jour, soit le deuxième ordre le plus important, après celui des rongeurs (Fenton et Simmons 2015b). Cet ordre suscite, tant par sa richesse spécifique que par la diversité des caractéristiques biologiques et écologiques de ses membres, ces dernières années, un fort intérêt de la part de la communauté scientifique.

Seuls mammifères capables de vol actif, grâce à leurs membres antérieurs modifiés en ailes (*patagium*), les chauves-souris jouent un rôle primordial dans le maintien de la diversité des écosystèmes dans lesquels elles évoluent, du fait, entre autres, de leur capacité à disperser graines et pollens par le vol et à réguler les populations d'arthropodes (Kunz et al. 2011). Elles représentent de bons indicateurs de l'état écologique des milieux naturels. Espèces longévives, capables de vivre plus d'une trentaine d'années (Wilkinson et South 2002) et connaissant peu de prédateurs au cours de leur existence, elles présentent également des systèmes sociaux très variés dans l'espace et le temps (Kunz et Fenton 2006). En effet, bien que l'on dénombre quelques espèces solitaires, la plupart des chauves-souris sont grégaires, vivant en groupes ou en communautés mono ou multispécifiques. Celles-ci induisent ainsi une grande variabilité d'interactions, qu'elles soient interspécifiques ou intraspécifiques. En sus de leurs caractéristiques bioécologiques, les chauves-souris sont décrites comme réservoirs d'une importante diversité de microorganismes dont certains sont pathogènes pour

l'homme ou d'autres animaux (Calisher et al. 2006; Wang et al. 2011; Brook et Dobson 2015; Moratelli et Calisher 2015).

Les chauves-souris joueraient ainsi un rôle majeur dans l'émergence de pathogènes du fait de : (i) leur longue histoire évolutive avec les microorganismes qu'elles hébergent ; (ii) leur capacité de dispersion des agents biologiques par le vol ; (iii) leur longévité permettant une production/excrétion sur de longues périodes et (iv) leur structure sociale complexe et leur densité de population pouvant être importante. Ces caractères, qui font des chiroptères des hôtes privilégiés, engendreraient une diversité importante des microorganismes et influeraient leur transmission et leur maintien dans l'environnement. Ces caractéristiques influeraient aussi sur la capacité d'adaptation des chauves-souris et leurs aptitudes immunitaires (Brook et Dobson 2015). Dans un contexte d'urbanisation grandissante, les perturbations des environnements sont intimement associées aux mécanismes d'émergence. Les réponses des chiroptères (modification du comportement, sélection de gîtes, adaptation locale, etc.) aux modifications des écosystèmes dans lesquels elles évoluent ont un impact direct sur la diversité des espèces réservoirs ainsi que des pathogènes associés. Pour exemple, en Malaisie, en 1998, une épidémie d'encéphalite touche à la fois le porc et l'homme et entraîne le décès de plus d'une centaine de personnes et l'abattage d'un million de porcs. Une chauve-souris frugivore, communément appelée Roussette, est identifiée comme étant le réservoir d'un nouvel agent zoonotique, le virus Nipah (Yob et al. 2001). Quelques années plus tard, en 2002, dans le sud de la Chine, une épidémie d'un nouveau syndrome, le syndrome respiratoire aigu sévère, plus connu sous son acronyme SRAS, éclate. Cette épidémie, à l'origine de plus de 800 décès et de plus de 6 000 personnes infectées de par le monde, a eu de graves conséquences sanitaires et économiques à l'échelle mondiale (Keogh-Brown et Smith 2008). Là encore, les chauves-souris sont incriminées et un nouveau coronavirus identifié (Wang et al. 2006). Les exemples d'émergence de zoonoses ayant pour origine les chauves-souris sont nombreux. Les chauves-souris impliquées dans ces phénomènes ne présentent pas, semble-t-il, dans la plupart des cas, de signes cliniques. Cet état « asymptotique » semble lié à la mise en place de réponses immunitaires innées et adaptatives adaptées (Baker et al. 2013a; Brook et Dobson 2015).

Toutes ces raisons font que la diversité biologique des espèces réservoirs, leur évolution, leur réponse immune et leur adaptation à des environnements contrastés (que l'on considère les environnements physiques extrinsèques ou bien les environnements intrinsèques constitués par une diversité de microorganismes) doivent être prises en compte afin de mieux appréhender les mécanismes impliqués dans le maintien et la transmission des microorganismes.

1.2. Diversité biologique des chiroptères

A. Richesse spécifique et classification

L'ordre des chiroptères comprend à ce jour plus de 1300 espèces et près de 200 genres connus répartis en vingt familles. Les familles de Vespertilionidae, Phyllostomidae, Pteropodidae et Molossidae comprennent les plus grandes richesses spécifiques, avec pas moins de 110 espèces répertoriées dans chacune de ces familles (Fenton et Simmons 2015b). Les chiroptères possèdent des caractéristiques biologiques très diverses et ont développé, au cours de leur évolution, des habitudes comportementales, alimentaires et écologiques très variées (Agnarsson et al. 2011; dos Reis et al. 2014; Fenton et Simmons 2015a). Ils peuvent parcourir de longues distances que ce soit lors de migrations des colonies ou pour trouver nourriture et gîte (Fleming et Eby 2003). Cette particularité leur a permis, entre autres, de coloniser l'ensemble des écosystèmes terrestres répertoriés, exception faite des zones polaires et de certaines îles océaniques difficiles d'accès.

La systématique des chiroptères fut longtemps basée sur des caractéristiques morphologiques ainsi que sur l'absence/présence d'écholocation. Deux groupes étaient ainsi distingués : (i) les chauves-souris de petite taille (22-135 cm d'envergure), de faibles masses corporelles (2-160 grammes), capables d'écholocation sophistiquée (laryngée) nécessaire à leur orientation, appelées *microchiroptères* ; et (ii) les chauves-souris de grandes tailles (40 cm-2,20 m d'envergure), de masse corporelle plus importante (15-1500 grammes), appelées *mégachiroptères*. Cette classification impliquait alors une origine unique du vol et de l'écholocation chez les chauves-souris (Jones et Teeling 2006). Depuis, les données moléculaires ont révélé l'existence de relations phylogénétiques étroites entre les microchiroptères appartenant à la superfamille des Rhinolophoidea et à la famille des Pteropodidae

avec les mégachiroptères, formant ainsi le nouveau clade des *Yinpterochiroptera* (Teeling 2005). Selon cette classification, les superfamilles des Emballonuroidea, Noctillionoidea et Vespertillionoidea, ayant toutes pour particularité d'utiliser l'écholocation laryngée, forment le clade des *Yangochiroptera* (Teeling 2005) (Figure 6). Ces nouvelles données suggèrent ainsi une possible évolution convergente de l'écholocation ou une origine unique de cette caractéristique, avec une perte subséquente chez les mégachiroptères (Jones et Teeling 2006).

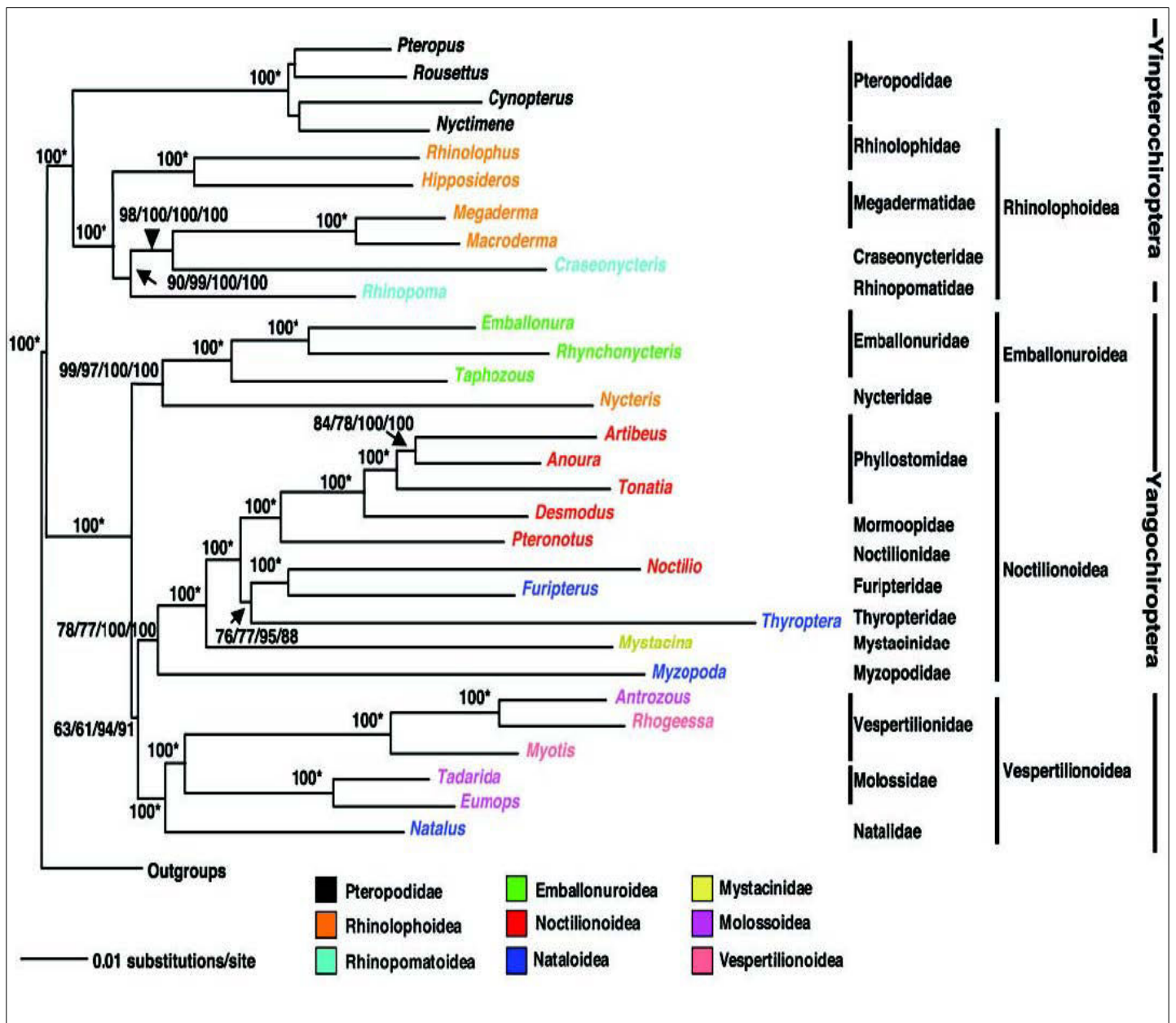


Figure 6 : Relations phylogénétiques des chiroptères. Extrait de Teeling (2005).

B. Socialité, reproduction et longévité

Bien que l'on dénombre quelques espèces solitaires, la structure sociale des chiroptères est en générale très marquée. Ces systèmes sociaux font partis des plus complexes et des plus diversifiés au sein des mammifères (Perony et al. 2015). Toutefois, l'ensemble des facteurs impliqués dans l'organisation de ces systèmes ne sont pas totalement connus. La plupart des espèces sont grégaires, les femelles effectuent l'élevage commun des progénitures dans des colonies appelées maternités. Les mâles, plus solitaires, forment des groupes entre eux ou vivent en harem (petits groupes composés d'un mâle et d'une dizaine de femelles) (Kunz 1982). Des études ont mis en évidence une socialité maintenue toute l'année chez les chauves-souris des zones tropicales par rapport à celles des zones tempérées où les contacts peuvent se limiter à des périodes plus ou moins courtes au cours de l'année (McCracken et al. 2006). L'utilisation de l'habitat et la sélection des gîtes chez les chauves-souris sont dépendantes de la diversité et de l'abondance des nids, de la distribution, de l'abondance des ressources alimentaires mais aussi des dépenses énergétiques liées à la taille des chauves-souris et aux caractéristiques environnementales (McCracken et al. 2006; Perony et al. 2015).

La taille des colonies est très variable, les plus grandes colonies peuvent compter plusieurs millions d'individus. Leur composition et stabilité est également variable que ce soit entre les espèces ou entre individus d'une même espèce (Perony et al. 2015). Par ailleurs, la cohabitation entre les différentes espèces de chauves-souris (association interspécifique) dans les grands abris protégés tels que les grottes n'induisent pas forcément de modifications de la structure sociale de chacune des espèces (Fenton et Simmons 2015a). Les chauves-souris vivent en moyenne entre dix et vingt-cinq ans et certains individus peuvent vivre jusqu'à plus d'une trentaine d'années. Le système de reproduction varie selon les espèces. Néanmoins, contrairement aux autres mammifères de petite taille, les chauves-souris ont des taux de reproduction plus bas, d'une à deux portées par an, plus proches de ce que l'on observe pour les grands mammifères (Fenton et Simmons 2015a). La durée des périodes de gestation, également variable entre les espèces (en moyenne 5 à 8 semaines), est pondérée par les conditions climatiques. La prise en charge des petits, jusqu'à l'émancipation, peut se faire de façon individuelle (mère – petit) ou dans les maternités.

C. Les chiroptères en Guyane

Les forêts tropicales humides sont, en général, les écosystèmes qui présentent la plus grande richesse spécifique (faune et flore comprises). Les forêts tropicales d'Amérique du Sud, abritent la plus grande diversité de chauves-souris, que ce soit en nombre de familles, de genres ou d'espèces (Figure 7) (Fenton et Simmons 2015b). Du fait de l'hétérogénéité du milieu, de la diversité des habitats et de la multiplicité des niches ; ces forêts permettent la coexistence de nombreuses espèces. Celles-ci se partagent les différentes niches écologiques et sont donc le siège de nombreuses interactions intra- et interspécifiques (Delaval 2004). En Guyane, territoire au climat équatorial, située en Amérique du Sud, on dénombre à ce jour 197 espèces de mammifères dont 106 espèces appartiennent à l'ordre des chiroptères et au sous-ordre des *Yangochiroptera* (Catzeflis 2015). À titre de comparaison, on dénombre trois fois plus d'espèces en Guyane que pour l'ensemble de l'Europe.

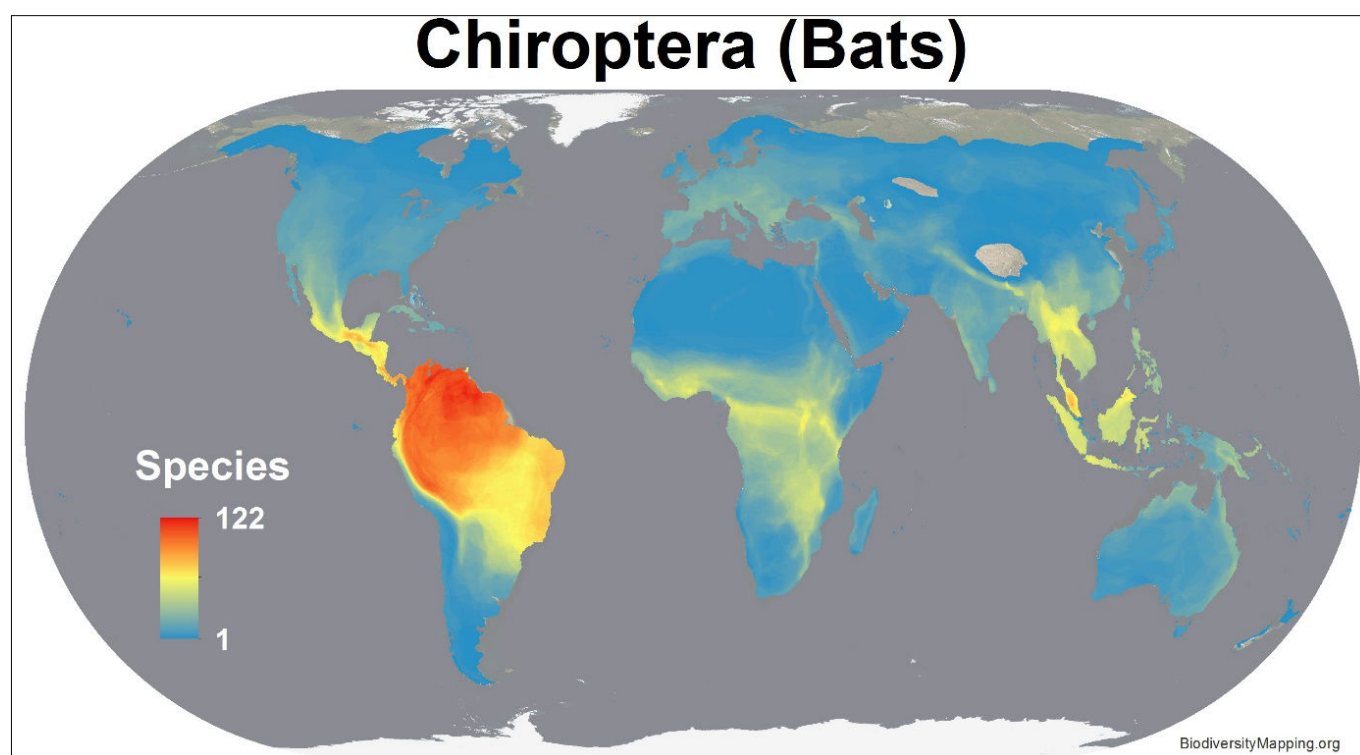


Figure 7 : Distribution spatiale et richesse spécifique des chiroptères dans le monde. D'après les données de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature.

Les 106 espèces de chauves-souris retrouvées en Guyane sont réparties en neuf familles et en 55 genres dont 34 appartiennent à la famille des Phyllostomidae (endémique aux néo-tropiques), soit plus de 60% des espèces. Sur certaines zones du département, plus de 80 espèces peuvent coexister sur quelques kilomètres de forêt, représentant ainsi l'une des plus grandes diversités mondiales (Office National des Forêts et Groupe Chiroptères de Guyane 2013). La diversité des chiroptères, en particulier celle des Phyllostomidae, est reflétée notamment par une diversité importante de leurs régimes alimentaires, de leurs systèmes sociaux, de la sélection des gîtes, des zones de chasse, rythmes d'activités et de leurs stratégies de reproduction ce qui permet de minimiser la compétition entre les espèces. Les gîtes fréquentés par les chauves-souris présentent également une grande variété. Ils sont soit localisés dans les milieux naturels tels que les grottes, les abris sous-roche, les troncs d'arbres, écorces ou divers feuillages, ou localisés dans des espaces anthropisés tels que les habitations, sous les ponts, dans les carbets, etc.

Bien que peu d'études soient disponibles, l'impact des modifications environnementales sur la dynamique des populations de chauves-souris en Guyane est bien documenté. (Brosset et al. 1996) et (Delaval 2004) ont pu mettre en évidence une diminution de la biodiversité dans les zones déboisées et un changement des niveaux de peuplement de chauves-souris (en composition et en nombre) dépendant de la nature du milieu et du degré de perturbation. Une explosion démographique d'espèces opportunistes appartenant notamment à certaines familles des Phyllostomidae (ex. *Artibeus spp.*, *Carollia perspicillata*, *Sturnira sp3*), Molossidae (ex. *Molossus molossus*, *Myotis nigricans*) et Vespertilionidae (ex. *Eptesicus furinalis*) est alors favorisée. De même, ils rapportent une dominance de la sous-famille Carollinae (Miller, 1924) dans les forêts fragmentées, les lisières et les forêts continues proches de milieux ouverts, avec une surreprésentation de l'espèce *C. perspicillata*, également rapportée par (Fleming 1988). À l'inverse, à peine une vingtaine d'espèces sont répertoriées dans les milieux très perturbés (Brosset et al. 1996).

1.3. *Chiroptera* et microorganismes

Les caractéristiques particulières des chauves-souris favorisent leurs capacités à être des hôtes d'agents infectieux (Olival et al. 2012). L'association entre les chauves-souris et les zoonoses est reconnue depuis plus d'un siècle, depuis l'identification du virus de la rage chez des chauves-souris vampires (Carini 1911). Avec l'émergence de nouvelles maladies humaines et animales et le rôle potentiel des chauves-souris dans leur transmission et dans le maintien des pathogènes à l'origine de ces maladies, les chiroptères suscitent un intérêt grandissant dans la communauté scientifique. Ainsi, la connaissance sur les microorganismes qu'elles abritent ne cesse d'augmenter.

A. Diversité de microorganismes non-viraux

De nombreuses études ont mis en évidence le rôle des chauves-souris dans la transmission inter-espèces de microorganismes non-viraux tels que les bactéries, les parasites et les champignons bien que tous ne soient pas connus comme étant des agents zoonotiques.

Les études ont montré une grande diversité de bactéries présentes dans le sang et les selles des chauves-souris, dont certaines ont été identifiées comme pouvant induire des maladies mortelles chez l'homme. Les pathologies, les plus rencontrées et décrites, correspondent à la leptospirose et à la salmonellose (Vashi et al. 2009; Bessa et al. 2010; Mühldorfer 2013; Dietrich et al. 2015). Des études de surveillance à grande échelle ont mis en évidence que plus d'un quart des chauves-souris de la famille des Pteropodidae étudiées en Australie étaient séropositives pour les anticorps anti-leptospirose et qu'il existait une transmission active de leptospires dans l'environnement (Smythe et al. 2002; Cox et al. 2005). L'avènement des techniques de séquençage de nouvelle génération (haut débit) a également permis l'identification de nouvelles bactéries infectieuses pour l'homme chez des chauves-souris insectivores en Finlande, soulignant la transmission active de pathogènes bactériens encore méconnus (Veikkolainen et al. 2014).

Les parasites transmis par les chauves-souris ont été identifiés, pour la plupart, à partir de prélèvements sanguins. Parmi les parasites, on retrouve diverses espèces de plasmodies (Riel et al. 1951; Kaay 1964; Schaer et al. 2013) et des espèces de trypanosomes du groupe *Cruzi* (Argibay et al. 2016; da Costa et al. 2016). La diversité et la charge de parasites retrouvées chez les chauves-souris fluctuent en fonction des caractéristiques bioécologiques mais aussi en fonction de la nature et du niveau de fragmentation des habitats dans lesquels elles évoluent (Gay et al. 2014).

À l'instar des bactéries et des parasites, les chauves-souris hébergent un grand nombre de champignons dont certains pathogènes pour l'homme. Le plus connu, *Histoplasma capsulatum*, est responsable de l'histoplasmosse. L'inoculation du champignon se fait essentiellement par l'inhalation de spores contenues dans les poussières de déjections de chauves-souris (Emmons 1958). Les chauves-souris hébergent également des champignons non pathogènes pour l'homme mais délétères pour elles-mêmes. *Pseudogymnoascus destructans* est responsable d'une épizootie émergente nommée « syndrome du nez blanc » ou « white nose syndrome ». Il est à l'origine de la mort de millions de chauves-souris en Amérique du Nord (Blehert et al. 2009; Blehert 2012). Cette infection semble être mieux tolérée par les chauves-souris d'Europe, toutefois les déterminants environnementaux et bioécologiques (tel que le comportement) dans les communautés en hibernation restent à investiguer. Les récentes études montrent que les chauves-souris possédant à la fois des traits physiques de masse importante et ayant des habitudes de sélection de gîtes dans les endroits les plus secs et/ou les plus froids ont moins de chance de développer la maladie, du fait de variations métaboliques plus élevées qui gênent le développement du champignon. Elles présentent donc un avantage sélectif par rapport aux autres chauves-souris (Wibbelt et al. 2010; Hayman et al. 2016; Zukal et al. 2016).

B. Diversité des microorganismes viraux

Les virus de la rage (*Lyssavirus*, *Rhabdoviridae*), Hendra et Nipah (*Henipavirus*, *Paramyxoviridae*), Ebola (*Ebolavirus*, *Filoviridae*), Sars-CoV et MERS-CoV (*Betacoronavirus*, *Coronaviridae*) font l'objet de toutes les attentions depuis la mise en évidence de l'implication des chauves-souris dans leur transmission active et dans leur maintien dans l'environnement (Brook et Dobson 2015).

L'accroissement des perturbations environnementales dans les habitats naturels des chauves-souris, et leur consommation dans certaines régions augmentent, de façon exponentielle, le danger de transmission virale interespèces (Plowright et al. 2014; Allocati et al. 2016). Du fait de son importance aussi bien d'un point de vue économique que sanitaire en Amérique Latine, seule la famille *Rhabdoviridae* sera développée dans ce chapitre.

i. *Rhabdoviridae*, Rage et facteurs environnementaux

La famille des *Rhabdoviridae* inclut une importante diversité de virus de pathogénicité connue pour les hommes, les animaux et les plantes. Cette famille virale appartient à l'ordre des *Mononegavirales* et comprend, à ce jour, 64 espèces virales réparties en treize genres, dont un non assigné (ICTV, Juillet 2015). Le genre *Lyssavirus* comprend la plus grande variété d'espèces (14 décrites, plus un membre supposé), suivi des genres *Cytorhabdovirus*, *Nucleorhabdovirus* et *Vesiculovirus* où l'on dénombre une dizaine d'espèces. Les rhabdovirus sont des virus à ARN linéaire d'environ 11-15 kb, en taille. Le génome comprend cinq à six cadres ouverts de lecture codant cinq à six protéines. Le virion des rhabdovirus est constitué de deux unités structurales : une hélice complexe de ribonucléoprotéine interne (RNP) et une enveloppe lipidique dérivée de la membrane de la cellule hôte au cours de bourgeonnement. La RNP inclut le génome ARN étroitement associé à une nucléoprotéine (N). La phosphoprotéine fortement phosphorylée (P) et l'ARN polymérase ARN-dépendante (L) sont également liées à la RNP. La position exacte de la protéine de matrice (M) reste controversée, et peut être soit contenu dans le canal central de la RNP ou bien noyée dans la couche interne de la membrane du virion. Les glycoprotéines (G) servent à la liaison aux récepteurs cellulaires et font saillie à travers la membrane du virion (Kuzmin et al. 2009). Dans le cadre de ma thèse, seuls les lyssavirus seront développés.

- *Les lyssavirus de chauves-souris*

Les lyssavirus ont pour hôtes les mammifères et les vertébrés. À ce jour, quatorze espèces dont le génome a été caractérisé intégralement ainsi qu'un fragment de séquence phylogénétiquement proche des autres lyssavirus ont été décrites. Les quatorze espèces ont été rapportées chez les chauves-souris (Kuzmin et Rupprecht 2015). Bien que peu de données soient disponibles sur l'épidémiologie et l'écologie des lyssavirus, il est évident que ces mammifères sont fréquemment exposés à ces derniers. Par ailleurs, (Banyard et al. 2011) et (Streicker et al. 2010) suggèrent, chez les chauves-souris, une distribution des lyssavirus dépendante de caractères spécifiques associant les caractères phylogénétiques et spatiaux (Figure 8).

Les lyssavirus sont très différents en termes de génétique, pathogénicité et immunogénicité (capacité à déclencher des réactions croisées). Sur la base des distances génétiques et de l'immunogénicité, on distingue deux phylogroupes au sein des lyssavirus. Le phylogroupe I inclut les espèces *Rabies virus* (RABV), *European bat lyssaviruses type 1* (EBLV-1) et *type 2* (EBLV-2), *Duvenhage virus* (DUVV), *Australian bat lyssavirus* (ABLV), *Aravan virus* (ARAV), *Khujand virus* (KHUV), *Irkut virus* (IRKV), et *Bokeloh bat lyssavirus* (BBLV). Le phylogroupe II comprend les espèces *Lagos bat virus* (LBV), *Mokola virus* (MOKV) et *Shimoni bat virus* (SHIBV). D'autres espèces : *West Caucasian bat virus* (WCBV), *Ikoma lyssavirus* (IKOV), and *Lleida bat virus* (LLEBV) n'ont pour l'instant pas encore été attribué à un phylogroupe particulier. Les membres du genre *Lyssavirus*, autre que RABV, engendrent pour la plupart des symptômes proches de ce dernier et constituent également des agents responsables d'encéphalite mortelle aigüe chez l'homme (Banyard et al. 2011; Calisher et Ellison 2012; Kuzmin et Rupprecht 2015).

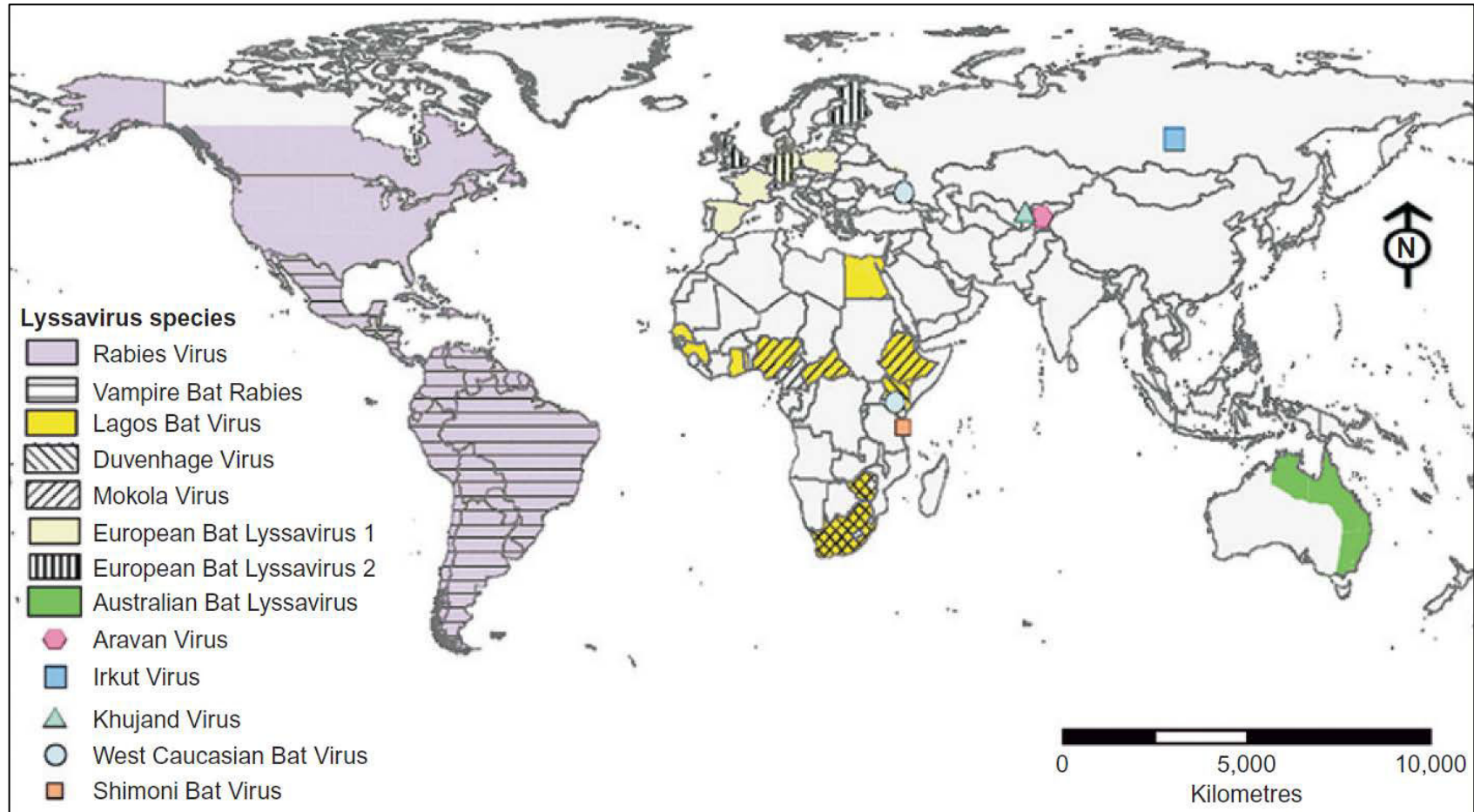


Figure 8 : Distribution géographique des lyssavirus de chauves-souris à travers le globe. Extrait de Banyard et al. (2011). Les pays sont colorés en fonction des différentes espèces de lyssavirus identifiées chez les chauves-souris. Les symboles indiquent la détection d'un seul isolat dans les pays respectifs.

• *RABV en Amérique Latine*

RABV est l'agent étiologique principal de la rage dans le monde. Deux cycles de transmissions du virus sont reconnus : le cycle selvatique faisant intervenir des carnivores sauvages et des chauves-souris et le cycle domestique impliquant principalement le chien comme réservoir. En Amérique Latine, les chauves-souris sont le réservoir majeur de RABV qui représente un problème majeur de santé publique et économique (Banyard et al. 2011). Le premier lien entre les chauves-souris et cette maladie remonte à 1911, date à laquelle l'implication majeure de la chauve-souris vampire *D. rotundus* du fait de son régime alimentaire, en Amérique Centrale et en Amérique du Sud a été mise en évidence (King et Turner 1993). L'augmentation de l'agriculture, et plus particulièrement des zones d'élevage, a fortement contribué à l'augmentation des populations de chauves-souris vampires, et parallèlement à l'incidence de la rage dans les régions concernées (Johnson et al. 2014; Escobar et al. 2015). Les mécanismes déterminants dans la transmission du virus dans les populations de chiroptères ne sont pas encore bien compris. Aguilar-Sienten et collaborateurs rapportent, au cours d'une infection expérimentale où les doses de virus rabique administrés étaient jusqu'à 10^6 fois supérieures aux doses létales, que seuls trois individus appartenant à l'espèce *D. rotundus* sur un groupe de quatorze testés ont survécu et excrété le virus (Aguilar-Setien et al. 2005). Les facteurs déterminants dans la transmission du virus seraient liés notamment aux interactions sociales qui permettraient d'acquérir dès le plus jeune âge une immunité contre ce dernier. Les programmes de suivi de la rage en Amérique Latine ont mis en évidence la présence du virus dans une grande diversité d'espèces de chauves-souris frugivores, insectivores, telles que *Artibeus* sp., *Eptesicus* sp. *Tadarida* sp. *Molossus* sp. *Myotis* sp. etc., suggérant une large distribution et la circulation du virus en Amazonie (Almeida et al. 2011; Rosa et al. 2011; Silva et al. 2011; Costa et al. 2013; Escobar et al. 2015). De même, plusieurs espèces se sont révélées être des réservoirs de lignées distinctes de la rage, augmentant ainsi la nécessité de comprendre les processus de dissémination et de maintien du virus chez les chauves-souris dans leur globalité. En Guyane, plus d'une dizaine de cas de rage desmodine ont été répertoriés entre 1984 et 2011 chez des animaux domestiques et un cas humain a été rapporté pour la première fois en 2008. La caractérisation de la séquence virale de ce dernier a montré qu'il s'agissait d'un virus d'origine desmodine (Meynard et al. 2012).

ii. Autres virus de chauves-souris

Outre les virus susmentionnés, l'avènement des nouvelles techniques de biologie moléculaire dont, entre autres, celles de séquençage haut débit, a permis l'identification ou l'isolement de plus de 200 virus chez les chauves-souris. Cependant, tous ne sont pas pathogènes chez l'homme. Parmi l'importante diversité de virus décrite, la plupart sont des virus à ARN, probablement liés à leur grandes capacités d'adaptation et à leur taux de mutation plus élevé que les virus à ADN (Calisher 2015; Moratelli et Calisher 2015; Allocati et al. 2016). À ce jour, l'identification de nouvelles séquences virales incluses dans les familles virales suivantes : *Adenoviridae*, *Arenaviridae*, *Astroviridae*, *Bornaviridae*, *Bunyaviridae*, *Caliciviridae*, *Circoviridae*, *Coronaviridae*, *Dicistroviridae*, *Filoviridae*, *Flaviviridae*, *Hepadnaviridae*, *Hepeviridae*, *Herpesviridae*, *Nodaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Papillomaviridae*, *Paramyxoviridae*, *Parvoviridae*, *Picobirnaviridae*, *Picornaviridae*, *Polyomaviridae*, *Poxviridae*, *Reoviridae*, *Retroviridae*, *Togaviridae*, *Totiviridae*. Li et collaborateurs soulignent que l'importante variabilité virale mise en évidence chez les chauves-souris est également le reflet de leurs habitudes alimentaires, surtout lors du criblage viral à partir d'échantillons de fèces (Li et al. 2010). En Guyane, outre la séquence du virus de la rage isolée et caractérisée en 2016 (Lavergne et al. 2016), une étude conduite sur 22 espèces de chauves-souris a permis l'identification de huit nouveaux polyomavirus, dont trois distincts identifiés pour la seule espèce *Artibeus planirostris* (Fagrouch et al. 2012). Toutefois, malgré la grande diversité de chauves-souris trouvées dans le territoire, les données de diversité globale ne sont pas disponibles.

1.4. *Chiroptera*, coévolution et adaptation

Du fait de leur capacité à héberger un nombre important de microorganismes sans développer de symptômes, différentes hypothèses ont été avancées quant à la particularité du système immunitaire des chauves-souris. En effet, des infections expérimentales ont révélé pour les virus de la rage et de la dengue, une quasi absence de signes cliniques, renforçant ainsi l'idée de la singularité du système immunitaire de ces mammifères (Aguilar-Setien et al. 2005; Baker et Zhou 2015). Wang et collaborateurs ont émis l'hypothèse que la capacité des chauves-souris à évoluer dans un état *a priori*

asymptomatique serait le fruit d'un équilibre induit par une longue histoire évolutive entre les chauves-souris et les virus (Wang et al. 2011). Il en résulterait une relation de type symbiotique dans laquelle les microorganismes ayant coévolué avec les chauves-souris leur confèreraient une protection contre d'autres agents pathogènes ou même contre les prédateurs, en échange d'un milieu de vie. Par ailleurs, le caractère ancien des virus de chauves-souris par rapport aux virus d'autres mammifères semblent corroborer cette hypothèse (Schneeberger et Voigt 2016).

Il est admis que la diversité d'une espèce hôte et celle des microorganismes qu'elle porte est proportionnelle à la variabilité des interactions entre les deux parties et reflète les processus d'adaptation concomitants de l'espèce hôte en réponse aux microorganismes et inversement. On parle de processus de « coévolution ». Combes définit la coévolution entre hôtes et microorganismes comme un *enchaînement de pressions sélectives réciproques*, processus dynamique et continu par lequel chaque protagoniste développe de nouvelles adaptations lui permettant de ne pas être distancé par « l'autre » (Combes 2003). Autrement dit, les microorganismes évoluent pour optimiser l'exploitation de leurs hôtes tandis que ces derniers évoluent pour minimiser, voire éviter, la perte de *fitness* induite par la présence des parasites. Il en résulte une *course aux armements*, reflet des pressions sélectives réciproques que les parasites et les hôtes exercent les uns sur les autres, et ce, sur de très longues périodes de temps (Ebert et Hamilton 1996). Cette course aux armements pousse les hôtes à perfectionner leur système de défense, afin que ce dernier soit capable de reconnaître et d'éliminer les parasites les plus fréquents et virulents. Les parasites, quant à eux, perfectionnent leur stratégie d'évitement vis-à-vis de la réponse immunitaire, afin de survivre dans le milieu hostile créé par l'hôte, en s'adaptant au génotype-hôte le plus fréquent dans la population. L'adaptation de l'hôte induite par le parasite est alors proportionnelle aux pressions qu'il exerce et inversement (Potts et Wakeland 1990).

Les microorganismes à l'origine de pathologies humaines et animales sont appelés microorganismes pathogènes ou, plus brièvement pathogènes. Toutefois, tous ne sont pas létaux, en particulier ceux qui ont évolué pendant des milliers d'années dans les mêmes populations de mammifères-hôtes et qui, par conséquent, ne peuvent plus modifier leur caractère pathogénique sans risquer de compromettre

l'équilibre établi avec le système immunitaire de l'hôte (Janeway et al. 2009). Par ailleurs, chez une espèce-hôte donnée, la diversité des réactions individuelles à un même agent pathogène telles que la présence ou non de symptômes associés à l'infection, le degré de sévérité de l'infection, sa localisation, et bien d'autres paramètres, reflète le polymorphisme génétique au sein de l'espèce étudiée. Ce dernier joue un rôle déterminant dans la susceptibilité ou la résistance individuelle aux agents infectieux (Revillard 2001). Nous nous intéresserons donc aux mécanismes de défense de l'hôte et plus particulièrement au système immunitaire de celui-ci.

A. Système immunitaire de l'hôte

Des barrières naturelles (peau, muqueuses, membranes, etc.) aux réponses immunitaires spécifiques, l'hôte dispose d'un éventail de stratégies lui permettant aussi bien de prévenir l'entrée d'un parasite que de combattre et éliminer celui-ci, s'il parvenait à passer ses premières défenses. Doté d'une extraordinaire plasticité, le système immunitaire est le garant de la survie de l'organisme et n'a cessé de se développer au cours de l'évolution des espèces (Du Pasquier 1991). Son rôle principal est d'assurer le maintien de l'intégrité et de l'équilibre de l'organisme hôte, grâce à un ensemble de mécanismes de défenses et de régulation. Ceux-ci lui permettent d'une part de reconnaître et contrôler les constituants appartenant à l'organisme (ou « soi »), et d'autre part de lutter efficacement contre les agressions extérieures (ou « non-soi »), dues aux pathogènes, agents allergènes, toxines, etc. et d'éliminer les constituants du « soi modifié », tels que les cellules cancéreuses, apoptotiques, etc. (Chaplin 2010). L'immunité est généralement divisée en deux catégories agissant de concert pour protéger l'organisme : l'immunité innée et l'immunité adaptative qui se différencient par plusieurs caractéristiques comme la vitesse et la spécificité de la réaction. Les études montrent que les chauves-souris possèdent les effecteurs des deux immunités, comme tous les mammifères, bien que celles-ci semblent présenter quelques différences leur conférant des avantages dans la clairance des microorganismes. Parce que les chauves-souris passent la majorité de leur temps dans leur habitat, ce dernier joue un rôle important dans leur écologie et évolution (McCracken et al. 2006). Allen et collaborateurs ont ainsi pu mettre en évidence que la variabilité observée dans les réponses immunologiques fonctionnelles, innées et adaptatives, chez les Tadarides du Brésil (*Tadarida*

brasiliensis) et la fréquence et distribution d'individus immunocompétents seraient fortement liées aux facteurs écologiques et plus particulièrement à la nature du gîte des chauves-souris (Allen et al. 2009).

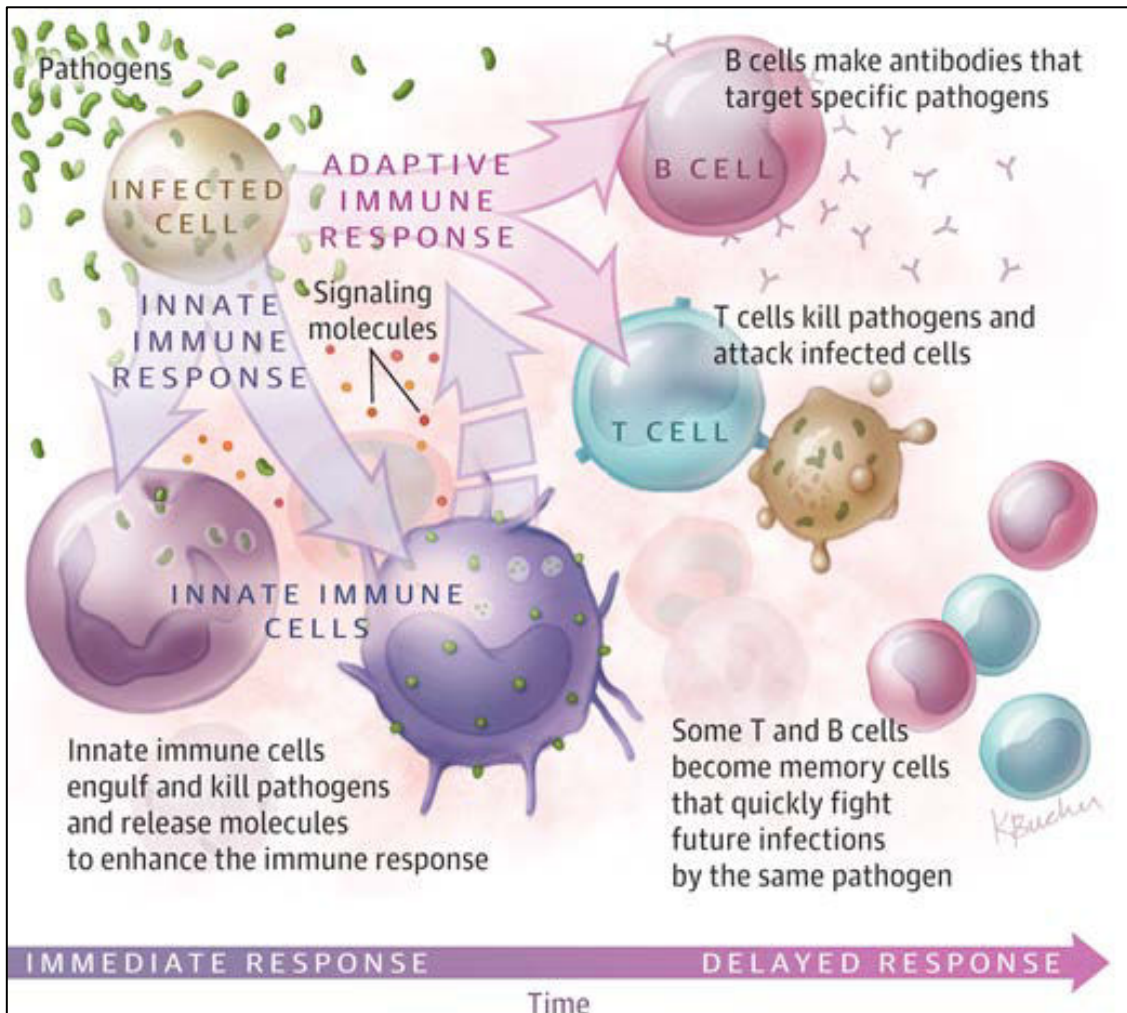


Figure 9 : La réponse immunitaire. Extrait de (Thompson 2015). Suite à l'entrée d'agents infectieux (ou pathogènes) dans l'organisme, se met en place, dans un premier temps, la réponse immunitaire innée. Elle permet l'élimination des pathogènes et la mise en place d'une cascade de signalisation qui stimule et augmente la réponse immunitaire. En cas de persistance dans le temps des agents infectieux dans l'organisme, se met en place la réponse immunitaire adaptative qui permet une élimination ciblée et la mise en place d'une réponse immunitaire mémoire. Cette dernière induira une action plus rapide du système immunitaire lors d'une prochaine rencontre avec le même agent infectieux.

B. Immunité innée

Première ligne de défense de l'hôte (Figure 9), l'immunité innée est hautement conservée. Elle préexiste à toute exposition aux agents infectieux, c'est-à-dire que ces effecteurs (les PRRs, *Pattern recognition Receptors*) sont présents spontanément dans l'organisme (Murphy et al. 2012b). Ainsi, l'immunité innée est activée dans les minutes qui suivent la rencontre avec les pathogènes. Son rôle principal est d'empêcher la propagation de l'infection et de permettre l'élimination rapide de l'agent responsable dans l'organisme. Elle reflète ainsi l'importance du système immunitaire dans la lutte contre les agressions extérieures et la survie de l'organisme. Elle serait responsable de la réponse asymptomatique des chauves-souris à l'infection virale et permettrait le contrôle rapide de la réplication virale (Papenfuss et al. 2012).

Des études menées chez *Pteropus alecto* et *Rousettus leschenaultii* ont montré l'existence de PRRs et parmi lesquels des *Toll-like receptors* (TLRs) 1 à 10 et d'un TLR supplémentaire nommé TLR 13 (chez *P. alecto*) qui pourrait correspondre à un pseudogène du fait de l'absence de codon d'initiation. Leurs activités semblent dépendante de l'espèce (Iha et al. 2010; Cowled et al. 2011; Papenfuss et al. 2012). Ces récepteurs membranaires sont très conservés chez les chauves-souris et reconnaissent un panel très large de PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) viraux, à l'instar des autres espèces de mammifères. Leur expression suit le même patron que pour les autres mammifères. Zhang et collaborateurs soulignent toutefois la rapidité de l'évolution du TLR7, impliqué dans la reconnaissance virale, chez deux espèces de chauves-souris, *P. alecto* et *Myotis davidii*, soutenant ainsi l'hypothèse des conséquences bénéfiques induites par la coévolution entre les virus et les chauves-souris (Zhang et al. 2013). Les *RIG-like receptors* (RLRs) et *NOD-like receptors* (NLRs) ont également été mis en évidence. Ces effecteurs semblent avoir subi une évolution rapide à l'instar des TLRs. Toutefois, le rôle spécifique de ces effecteurs n'est pas encore totalement élucidé. D'autres effecteurs de l'immunité innée appartenant à la famille des interférons et les microRNAs, ainsi que neutrophiles, éosinophiles, basophiles, macrophages, cellules folliculaires dendritiques, etc. ont été identifiés. Ces effecteurs semblent présents dans des ratios similaires à la souris mais présentent des

caractéristiques morphologiques plus petites dont l'importance n'a pas encore été déterminée. Néanmoins, l'implication de ces effecteurs dans le contrôle de la réplication virale a été démontrée chez la souris et *T. brasiliensis*, chez qui l'inhibition de l'activité de la PKR (protéine-kinase ARN dépendante) et du facteur d'initiation 2a induit une réactivation du virus Ebola (Strong et al. 2008). A *contrario*, les cellules NK (*Natural Killer*) n'ont pas encore été identifiées histologiquement et deux classes majeures de récepteurs des NK semblent absentes des transcriptomes et génomes de chauves-souris (Baker et al. 2013b).

Bien que l'on dénombre beaucoup moins d'études sur la réponse immunitaire adaptative des chauves-souris, les premiers résultats semblent indiquer que ces animaux possèdent des avantages qualitatifs et quantitatifs dans l'efficacité de la réponse et dans le maintien de la mémoire immunologique.

C. Immunité adaptative

Seconde ligne de défense de l'hôte (Figure 9), l'immunité adaptative permet l'élimination d'agents infectieux persistants dans l'organisme, malgré la réponse innée. Caractéristique des animaux supérieurs, elle met en jeu des cellules spécialisées, les lymphocytes, cellules clés de l'immunité adaptative, capables de reconnaître et mémoriser des structures spécifiques de souches particulières et de variants pathogéniques, afin d'apporter la réponse adéquate à chaque cas (Parkin et Cohen 2001). Produits dans la moelle osseuse au cours de l'hématopoïèse, les lymphocytes circulent dans le sang, les vaisseaux lymphatiques et résident dans les organes lymphoïdes secondaires. En fonction de leur activité, on distingue deux populations : les lymphocytes B (LB), sécréteurs d'immunoglobulines (anticorps), conduisant à une immunité à médiation humorale et les lymphocytes T (LT), schématiquement divisés en cellules auxiliaires ($CD4^+$). Ces deux populations sont impliquées, entre autres, dans l'orientation de la réponse immune, dans l'activation des macrophages et dans la différenciation des LT en cellules cytotoxiques ($CD8^+$), conduisant à une immunité à médiation cellulaire (Bergereau 2010). Les lymphocytes sont capables de reconnaître spécifiquement des antigènes par leurs récepteurs BCR (pour *B-cell receptor*) ou TCR (pour *T-cell receptor*). Cette reconnaissance se fait à l'état natif, c'est-à-dire sans intermédiaire pour les LB, et *via* une présentation

de l'antigène, qu'il soit d'origine intracellulaire ou extracellulaire, par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), pour les LT. Les CPA peuvent être des cellules dendritiques, des monocytes, des macrophages ou des LB (Owen et al. 2014). Parmi les CPA, seules les cellules dendritiques dites CPA « professionnelles » sont capables de stimuler les LT naïfs et ainsi d'initier la réponse immunitaire adaptative aux antigènes qu'elles présentent. En revanche, l'ensemble des CPA est capable d'activer les LT mémoires. Le ligand reconnu par le TCR est un complexe formé à la surface d'une CPA par : une protéine de surface spécifique de l'hôte, appelée molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et un peptide antigénique (Bergereau 2010; Owen et al. 2014). L'activation des sous-populations de LT ($CD4^+$ ou $CD8^+$) est déterminée par la classe des molécules du CMH présentant l'antigène. Les LT $CD4^+$ sont activés suite à une présentation de l'antigène en association avec le CMH de classe II, tandis que les LT $CD8^+$ sont activés suite à une présentation de l'antigène en association avec le CMH de classe I. Suite à son activation et à l'orientation vers la réponse spécifique adaptée (humorale ou cytotoxique), les lymphocytes prolifèrent (expansion clonale) afin d'être le plus efficace possible contre l'agent infectieux, d'où le laps de quelques jours nécessaires à sa mise en place. Les récepteurs produits et exposés à la surface membranaire des effecteurs de l'immunité adaptative, qu'il soit BCR, TCR, ou CMH, sont codés par des gènes qui font l'objet d'un réarrangement somatique aléatoire de l'ADN : la recombinaison V (D) J (Schatz 2004; Owen et al. 2014). Au cours de ce processus, chaque segment de gène est recombinaison avec un autre afin de former un gène unique dont le produit donne un récepteur antigénique ou un anticorps unique, et assure ainsi la spécificité du récepteur exprimé à son antigène. Du fait de cette spécificité à un type de pathogène, allergène, toxine, etc., il existe une grande diversité de récepteurs et de populations cellulaires associées, ce qui donne à l'organisme la capacité de reconnaître une multitude d'antigènes différents (Murphy et al. 2012a). Bien que plus longue dans son déclenchement, contrairement à la réponse innée, la réponse adaptative permet la mise en place d'une « mémoire immunologique » qui permet une mobilisation plus rapide des effecteurs de l'immunité lors d'une nouvelle rencontre avec le même pathogène, même des décennies après la primo-infection. La vaccination repose sur ce principe (Male et Brostoff 2007; Chaplin 2010).

Les chauves-souris semblent présenter l'ensemble des effecteurs connus dans l'immunité adaptative. Toutefois, des caractéristiques dépendantes du sous-ordre ont été mises en évidence. Les chiroptères présentent les immunoglobulines de type M, G, A et E. Néanmoins, seules les *Yangochiroptera* présentent le type D (Butler et al. 2011, 2014). Par ailleurs, la spécificité du répertoire d'anticorps des chauves-souris ne suit pas le même processus de génération *via* le réarrangement somatique mais dépend plutôt d'une diversité combinatoire, résultante de leur histoire évolutive avec les virus (Baker et Zhou 2015). La présence d'anticorps spécifiques de virus émergents tels que ceux d'Ebola, du SRAS, de la rage, etc. et la transmission verticale ont également été mis en évidence chez les chauves-souris ce qui suggère que ces dernières sont non seulement capables de neutraliser ces virus mais aussi, du fait de leur transmission dans les communautés, d'assurer la pérennité de la descendance en assurant une immunité contre ces virus (Plowright et al. 2014).

Du fait de son rôle capital dans l'immunité adaptative, je me suis tout particulièrement intéressée, durant ma thèse, au complexe majeur d'histocompatibilité et à l'impact des interactions chauves-souris-pathogènes-environnement sur sa diversité. Malgré son importance, on dénombre, à ce jour, moins de dix études portant sur ce complexe chez les chauves-souris.

i. Le complexe majeur d'histocompatibilité, CMH

Décrit pour la première fois chez la souris par l'immunologiste britannique Peter Gorer en 1936 (Klein 1986b), présent chez la plupart des vertébrés, le complexe majeur d'histocompatibilité CMH ou HLA (*Human Leukocyte Antigen*) chez l'homme, est une famille multigénique localisée dans une large région chromosomique formée de plus de 200 *loci*, hautement polymorphes, qui codent des molécules ayant pour la plupart des fonctions immunologiques (Klein 1986a; Klein et Sato 2000). Ces molécules jouent un rôle central dans le développement et le fonctionnement de la réponse immunitaire, l'auto-immunité, le rejet de greffes inter-individus (d'où il tient son nom), dans les susceptibilités et/ou résistances aux maladies infectieuses, les réponses vaccinales et bien d'autres événements (Klein 1986a; Penn et Ilmonen 2005; Sommer 2005). Par la reconnaissance et la présentation des antigènes dérivés de pathogènes au TCR, les molécules du CMH permettent le contrôle de toutes les réponses

immunologiques, qu'elles soient à médiation humorale ou cellulaire (Penn et Ilmonen 2005). Bien que son organisation soit très conservée entre les espèces, il comporte des gènes dont certains présentent un polymorphisme intraspécifique élevé. Classiquement, on distingue trois classes de gènes du CMH en fonction de leur expression et implication dans le contrôle de la réponse immunitaire et autres fonctions de l'organisme telles que l'olfaction, l'odorat, la croissance, le développement et la reproduction. Bien que différentes de par leurs fonctions et structures, l'ensemble des molécules que codent les gènes du CMH présente des caractéristiques communes :

- ❖ un polymorphisme génétique multiallélique et un polymorphisme protéique associé, c'est-à-dire qu'un gène présente un nombre élevé d'allèles, qui codent chacun une protéine caractérisée par un ou plusieurs acides aminés variants ;
- ❖ une codominance et transmission « en bloc », autrement dit, pour chaque gène l'hétérozygotie se traduit par l'expression des deux allotypes portés chacun par un chromosome. La probabilité d'une identité allélique au sein d'une fratrie est faible (25 %, sauf dans le cas de jumeaux identiques) et la fréquence de l'association particulière entre certains loci est supérieure au simple hasard (déséquilibre de liaison) ;
- ❖ un site de liaison peptidique dégénéré, c'est-à-dire que ce seul site est susceptible de fixer différents peptides.

Les **molécules du CMH de classe I** sont des glycoprotéines hétérodimériques transmembranaires exprimées par l'ensemble des cellules somatiques et plaquettes de l'organisme composées d'une chaîne polypeptidique lourde α de 44 kDa subdivisée en trois domaines α_1 , α_2 et α_3 , appariée de façon non covalente à une chaîne polypeptidique légère de 12 kDa, la β_2 -microglobuline, qui assure le maintien de la structure tridimensionnelle de la molécule (Figure 10). Les domaines α_1 et α_2 forment un sillon appelé région PBR (pour *Peptide Binding Region*), hautement polymorphe, qui permet la fixation de petits peptides cytosoliques endogènes, c'est-à-dire généralement synthétisés à l'intérieur de la cellule, tels que les antigènes viraux ou les antigènes issus de cellules en fin de vie ou cancéreuses (Dengjel et al. 2005). Le domaine α_3 , hautement conservé, forme avec la β_2 -microglobuline, la région « *immunoglobuline-like* » impliquée dans la liaison au TCR des LT CD8⁺.

La densité cellulaire des molécules de CMH de classe I est fonction du type cellulaire : les cellules immunitaires possèdent une plus forte densité moléculaire que les autres cellules de l'organisme. À ce jour, six gènes identifiés dans la région chromosomique du CMH codent la chaîne α des molécules de classe I : *HLA-A* à *HLA-G*, parmi lesquels les gènes *HLA-A*, *HLA-B* et *HLA-C*, qui codent les molécules du même nom, sont les plus importants et les plus polymorphes. La chaîne β invariante n'est pas codée par un gène du CMH. Elle est nécessaire au chargement, au transport et à l'expression des molécules de CMH de classe I (Male 2005).

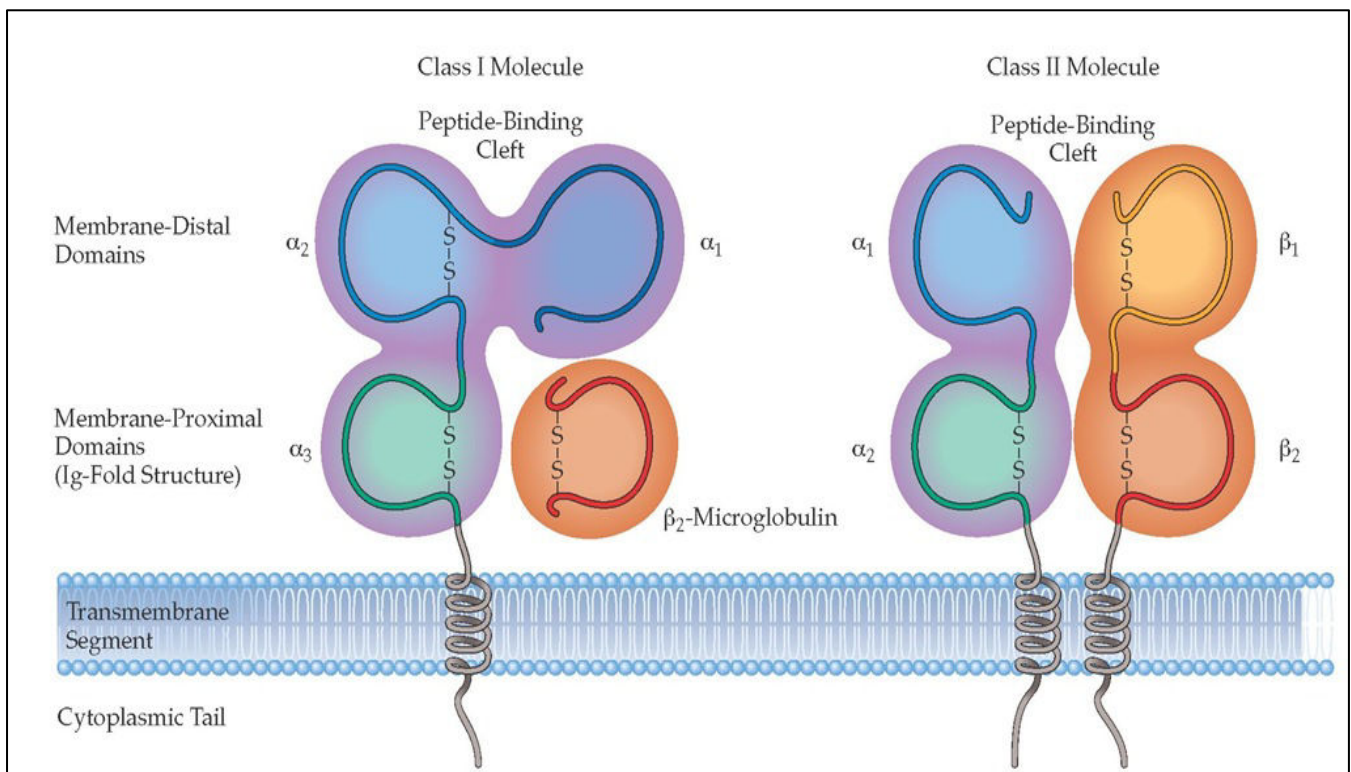


Figure 10 : Structure des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classes I et II.
 Extrait de <http://what-when-how.com/acp-medicine/adaptive-immunity-histocompatibility-antigens-and-immune-response-genes-part-1/>

Les **molécules du CMH de classe II** sont des glycoprotéines hétérodimériques transmembranaires, exprimées à l'état basal et de façon constitutive à la surface des CPA et composées de deux chaînes polypeptidiques non-covalentes α et β , subdivisées en deux domaines α_1 et α_2 , β_1 et β_2 , de tailles

sensiblement égales et codées toutes les deux par le CMH (Figure 10). Les domaines α_1 et β_1 forment la région PBR, hautement polymorphe, qui permet la liaison de peptides exogènes, dérivés de corps apoptotiques ou de pathogènes extracellulaires, tels que les bactéries, parasites, nématodes, etc. (Dengjel et al. 2005) et parfois de peptides endogènes (Nuchtern et al. 1990; Sant 1994; Paludan 2005). Les domaines α_2 et β_2 , hautement conservés, forment la région « immunoglobuline-like » impliquée dans la liaison au TCR des LT CD4⁺. À l'instar des molécules de classe I, la densité moléculaire des molécules du CMH de classe II augmente suite à l'activation des cellules. Du fait de l'expression en codominance des allèles, l'association des chaînes α et β génère plusieurs molécules différentes exprimées à la surface d'une même cellule. Dans un contexte inflammatoire ou suite à une activation, d'autres types cellulaires peuvent également exprimer ces molécules à leurs surfaces, tels que les cellules épithéliales et endothéliales. À ce jour, cinq *loci* identifiés dans la région chromosomique codent les molécules du CMH de classe II. Chaque *locus* contient un gène codant la chaîne α et au moins un gène codant la chaîne β . Ces *loci* sont dénommés chez l'homme *HLA-DM*, *HLA-DO* ; *HLA-DP*, *HLA-DQ* et *HLA-DR*, parmi lesquels *HLA-DP*, *HLA-DQ* et *HLA-DR* qui codent les molécules du même nom (suivi de A ou B selon la chaîne codée) sont les plus importants et les plus polymorphes. Les gènes *HLA-DRB* sont les plus nombreux, les plus polymorphes et les plus étudiés à ce jour.

Les **molécules du CMH de classe III** sont des protéines diverses dont les gènes sont localisés dans une région chromosomique très conservée et peu polymorphe située entre les *loci* codant les molécules de classe I et de classe II. Bien que très diverses, ces protéines interviennent dans des systèmes aux fonctions principalement immunologiques, mais cependant différentes de ceux des molécules de classes I et de classe II. Elles comprennent des composants de la cascade du complément C4, C2 et Bf, des protéines de choc thermique Hsp70, des transporteurs peptidiques TAP, des cytochromes ou encore des cytokines, dont celles de la superfamille des TNF (*Tumor Necrosis Factor*) impliquées, entre autres, dans l'inflammation systémique et dans la réaction de la phase aiguë.

ii. Variabilité du CMH

Le caractère polymorphique du CMH est très ancien et a été maintenu pendant plusieurs millions d'années (Riley et Olerup 1992). Il est observé chez la plupart des vertébrés et est admis comme une caractéristique définissant ce complexe. Il permet à chaque individu de posséder une large gamme de variants alléliques pour un gène donné et ainsi de posséder une multitude de molécules capables de reconnaître un grand nombre d'agents infectieux, et de s'adapter plus facilement à la rapidité de leur capacité évolutive (Janeway et al. 2009). D'autre part, cette particularité du CMH permet d'assurer la dissemblance des individus au sein d'une espèce (Klein 1986a). Les gènes du CMH sont les plus polymorphes décrits chez les vertébrés, avec plusieurs dizaines d'allèles par population et plusieurs centaines à l'échelle d'une espèce donnée (Robinson et al. 2000). Si l'on ne considère que les *loci* majeurs, outre le degré de polymorphisme élevé du CMH pour une espèce, un individu présentera un maximum de six molécules de CMH de classe I et à peine plus de molécules de CMH de classe II, ce qui, comparativement à d'autres gènes, est élevé (Penn et Ilmonen 2005). Le polymorphisme des molécules de CMH est, en général, concentré dans la région de liaison à l'antigène (*PBR*). Très souvent, il est associé à la viabilité et à la susceptibilité aux maladies d'un individu. Toutefois, certaines espèces peuvent montrer un faible niveau de polymorphisme, voire une absence, induisant, à l'échelle des populations, une viabilité moindre et une susceptibilité plus importante aux épidémies (Yuhki et O'Brien 1997). D'après Penn et Ilmonen (2005), les pressions de sélection naturelle exercées sur les espèces et les agents infectieux au sein de leur environnement, la dérive génétique et les interactions intraspécifiques sont en grande partie responsables de ce monomorphisme. Ces hypothèses ont pu être vérifiées dans de nombreuses populations, toutefois, de récentes études viennent remettre en question l'association directe entre le degrés de polymorphisme des molécules du CMH observé dans une population et la viabilité, la survie, et le maintien de cette population dans un environnement donné (Oosterhout et al. 2006; Castro-Prieto et al. 2011; Zeisset et Beebee 2014).

iii. CMH chez les chauves-souris

Les données sur le CMH de classe I des chauves-souris sont très récentes. Une étude portant sur la caractérisation de la région chromosomique du CMH chez *P. alecto* montre une région chromosomique hautement conservée dans son organisation, comportant des gènes de classe I qui présentent des caractéristiques uniques impliquées dans les capacités de liaison et de présentation des antigènes plus diversifiés chez cette espèce et par extension chez les chauves-souris (Ng et al. 2016). Le processus de duplication des gènes de CMH I chez les chauves-souris remonterait à près de 88 millions d'années, date à laquelle la lignée des chiroptères aurait divergé de celle des périssodactyles. Ce processus ferait partie des plus anciens après celui observé chez les opossums ce qui expliquerait l'absence des blocs de duplication κ et α retrouvés chez les autres mammifères (Ng et al. 2016). Douze gènes de classe II orthologues aux gènes de classe II chez les autres mammifères ont été identifiés dans le génome de *P. alecto*. De même, les chauves-souris semblent présenter un gène de classe II surnuméraire localisé en dehors de la région actuelle des gènes de classe II.

L'étude du polymorphisme des gènes du CMH se concentre sur les gènes de classe II, et plus particulièrement sur la chaîne *bêta* du gène *DR* (*DRB*), à l'instar de la plupart de mammifères. La monophylie de l'ordre des chiroptères a été démontré par Kupfermann et al. (1999), en se basant sur les séquences introniques de *DRB* de trois espèces de chauves-souris : *Rousettus aegyptiacus*, *C. perspicillata* et *Phyllostomus discolor*. Cette monophylie a également été mise en évidence à d'autres niveaux taxonomiques. En effet, Schad et al. (2012b) montrent à partir de séquences d'ADNc de *DRB* issues de *Saccopteryx bilineata*, *Myotis spp.*, *Noctilio spp.* et *C. perspicillata* qu'il existe un regroupement monophylétique au niveau des familles, avec un potentiel polymorphisme trans-espèces. Ce phénomène se traduit par l'occurrence d'allèles identiques ou similaires dans des espèces proches (Klein 1987). Il est caractéristique des gènes du CMH. Les allèles sont maintenus par la sélection balancée, durant des périodes plus ou moins longues, et persistent après les événements de spéciation, du fait de l'avantage sélectif qu'ils confèrent. Le polymorphisme trans-espèces contribuerait au maintien du polymorphisme (Klein et al. 2007; Těšický et Vinkler 2015). D'autres études ont pu mettre en lumière les divergences de polymorphisme, dépendant des espèces mais aussi de la taille des

populations. En effet, (Richman et al. 2010) rapportent une diversité extraordinaire chez *Myotis velifer* par rapport à un polymorphisme extrêmement limité chez sa congénère, *M. vivesi*. La structure sociale et les interactions intraspécifiques, plus particulièrement celles liées à l'accouplement, influent également sur la diversité du CMH comme le rapportent (Schad et al. 2011) dans les populations de *Noctilio albiventris*. Un autre déterminant du polymorphisme, et donc de la capacité de réponse aux infections des chauves-souris, mis en avant par (Richman et al. 2010) et (Palmer et al. 2016) est l'impact des contraintes géographiques, qui semble diminuer la diversité dans les populations isolées. Toutefois, quel que soit le déterminant associé, la sélection induite par les microorganismes est prépondérante dans l'ensemble des études (Mayer et Brunner 2007; Richman et al. 2010; Schad et al. 2011, 2012b; Palmer et al. 2016). C'est pourquoi l'étude de l'impact des changements environnementaux sur de la diversité du CMH de chauves-souris est d'autant plus importante pour mieux comprendre les processus impliqués dans la réponse à l'infection.

1.5. Modèles d'étude

Dans le cadre de cette thèse, je me suis intéressée plus particulièrement à trois espèces opportunistes évoluant aussi bien en milieu forestier qu'en milieu urbain, *C. perspicillata* (frugivore), *M. molossus* (insectivore) et *D. rotundus* (hématophage). Outre la différence de régime alimentaire, ces espèces présentent également des caractéristiques écologiques, sociales, comportementales différentes. L'annexion et la modification de leurs habitats font que ces mammifères peuvent de plus en plus souvent côtoyer hommes et animaux domestiques, et être à long terme à l'origine de l'émergence de zoonoses.

i. Les Phyllostomidae

Les phyllostomidés constituent la troisième famille la plus diversifiée des *Chiroptera* après les Vespertilionidae et les Pteropodidae. En général, elle est considérée comme un excellent taxon pour l'étude des effets de la fragmentation de l'habitat, du fait de sa grande richesse spécifique, notamment dans les tropiques, et de la réponse différentielle à la fragmentation dépendante des guildes trophiques (García-García et al. 2014). Les chauves-souris de cette famille sont caractérisées par une importante

diversité de régimes alimentaires : frugivore, nectarivore, pollinivore, carnivore, insectivore et hématoophage. Elles ont également un rôle prépondérant dans la dissémination de graines, dans la pollinisation ainsi que dans la régulation des populations d'arthropodes (Kunz et al. 2011). Les phyllostomidés de Guyane sont représentées par 58 espèces réparties en 34 genres appartenant à six sous-familles : Phyllostominae, Stenodermatinae, Glossophaginae, Lonchophyllinae, Carollinae et Desmodontinae (Catzeflis 2015). Les Phyllostominae (Gray, 1825) présentent le plus grand nombre de membres, avec 27 espèces répertoriées réparties en 14 genres. Les Stenodermatinae (Gervais, 1856) représentent la seconde plus grande diversité de phyllostomidés, avec 19 espèces réparties en 10 genres. Les Glossophaginae (Bonaparte, 1845) sont représentées par 5 espèces réparties en 4 genres. Deux espèces de Lonchophyllinae (Griffiths, 1982) appartenant chacune à un genre ont été répertoriées. Les Carollinae sont représentées par deux espèces du genre *Carollia* (Gray, 1838) et une espèce du genre *Rhinophylla* (Peters, 1865). Enfin, deux des trois espèces de chauves-souris hématophages (Desmodontinae (Bonaparte, 1845)) connues dans le monde sont présentes en Guyane. Elles appartiennent aux genres *Desmodus* (Wied-Neuwied, 1826) et *Diaemus* (Miller, 1906). Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressée à deux espèces de phyllostomidés, de caractéristiques écobio-écologiques différentes : *C. perspicillata* et *D. rotundus*.

• *Carollia perspicillata* (Linné, 1758)

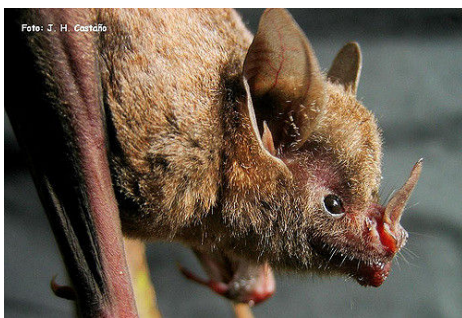


Figure 11 : *Carollia perspicillata*

Espèce frugivore de petite taille, d'environ 18,5g, *C. perspicillata* fait partie des mammifères les plus abondants et les mieux connus d'Amérique tropicale (Cloutier et Thomas 1992; Cosson et Pascal 1994). Elle contribue à la dispersion des graines et participe au maintien de la biodiversité des écosystèmes. Comme les autres phyllostomidés, *C. perspicillata* arbore une feuille nasale caractéristique en

forme de lancette. Des études récentes menées au Brésil montrent une expansion des populations de *C. perspicillata*, en accord avec une occupation récente des différents biomes, notamment celui du Sud-Est, et mettent également en évidence l'existence d'évènements de colonisation multiples

probablement liés à la fragmentation croissante des forêts (Pavan et al. 2011). En Guyane, *C. perspicillata* est très largement représentée, surtout dans les milieux perturbés. Elle possède un patron de déplacement très différent de ses congénères *C. brevicauda* et *R. pumilio*, très certainement lié à une stratégie d'évitement de la compétition pour l'exploitation des niches écologiques (Delaval 2004). La dynamique de population de cette espèce est étroitement liée à la densité d'arbres fruitiers et autres plantes, et tend à augmenter avec l'exploitation agricole (Brosset et al. 1996).

- *Desmodus rotundus* (Geoffroy, 1810)



Figure 12 : *Desmodus rotundus*

Espèce de petite taille, la chauve-souris vampire mesure près de 9 cm de long pour 18 cm d'envergure, elle pèse entre 25 et 40 grammes (Greenhall et al. 1983). En général, les femelles présentent des caractéristiques morphologiques plus marquées que les mâles et sont aussi plus lourdes. Comme les autres phyllostomidés, elle présente une feuille nasale caractéristique,

plissée et formant des bourrelets au-dessus des narines. La lèvre supérieure est profondément échancrée, le museau est réduit et les incisives sont grandes et aiguisées telles des lames de rasoirs. Elles possèdent également dans leur salive une glycoprotéine, la *draculine*, ayant des propriétés anticoagulantes qui permet un écoulement continu du sang qu'elles lapent (Fernandez et al. 1998). Les *D. rotundus* possèdent un système social très développé. Il a été mis en évidence une association étroite entre le système d'accouplement et la structure génétique des populations (Wilkinson 1985). Les colonies peuvent compter des milliers d'individus répartis en petits harems constitués d'un ou deux mâles et plusieurs femelles. Ces dernières chassent également ensemble, pratiquent la trophallaxie et ont des actions de toilettage social qui jouent un rôle fondamental dans la reconnaissance des individus (Wilkinson 1984). Du fait de la particularité de leur régime alimentaire et des nombreuses interactions sociales au sein des colonies, elles ont un rôle prédominant dans la transmission et le maintien de la rage dans les Amériques tropicales (Almeida et al. 2011; Johnson et al. 2014; Stoner-Duncan et al. 2014; Escobar et al. 2015). En Guyane, les *D. rotundus* nichent dans

des grottes, des troncs creux et sont capturés aussi bien en zones forestières que dans les zones anthropisées.

ii. Les Molossidae (Gervais, 1856)

Contrairement aux phyllostomidés, les mollossidés ont une large répartition pantropicale. Elles sont représentés, en Guyane, par 15 espèces appartenant à la sous-famille des Molossinae et sont réparties en six genres : *Cynomops*, *Eumops*, *Molossopas*, *Molossus*, *Nyctinomops* et *Promops* (Catzeflis 2015). Ces chauves-souris présentent des caractéristiques morphologiques typiques, telles que leur queue libre au-delà de la membrane inter-fémorale étroite, leurs lèvres plissées, leurs grandes narines et oreilles qui se rejoignent, leurs ailes étroites et effilées caractéristiques des insectivores aériens (Maganga 2012). Les mollossidés vivent en colonies, nichés dans divers gîtes en milieux urbain ou forestier. Ces espèces chassent en vol, au-dessus de la canopée ou dans les espaces ouverts (Kalko et al. 1996). Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressée à une espèce ubiquiste en Guyane, *M. molossus*.

• *Molossus molossus* (Pallas, 1766)



Figure 13 :
Molossus molossus

Espèce de régime alimentaire insectivore, d'une dizaine de grammes (11-14 g), distribuée dans les tropiques américains, elle présente une activité essentiellement crépusculaire (Chase et al. 1991). *M. molossus* est une espèce opportuniste qui présente une haute tolérance aux perturbations de son environnement et profite même des espaces urbanisés. De récents travaux montrent qu'elle est très bien adaptée aux espaces ouverts, lisières et autres espaces

anthropisés, et présente des différences de comportement par rapport à ses congénères, dépendante des réponses à l'urbanisation et du degré de cette dernière (Jung et Threlfall 2016). Elle gîte dans des anfractuosités, falaises, toitures, base des feuilles de palmiers, des grottes, etc., et forme des colonies de tailles variables. Comme la plupart des chauves-souris, *M. molossus* est une espèce qui présente un système social complexe et pratique même la chasse en groupe (Dechmann et al. 2010).

1.6. Objectifs de la thèse

Dans le cadre de mon travail de thèse, je me suis intéressée aux diversités virales présentes chez deux espèces de chauves-souris (*D. rotundus* et *M. molossus*), vivant en sympatrie dans les environnements forestiers et urbains de Guyane et présentant des caractères bioécologiques différents. En parallèle, la diversité génétique d'un gène de classe 2 (*DRB*) du CMH a été étudié chez ces deux espèces ainsi que chez *C. perspicillata*. Le moteur de recherche principal était de pouvoir comprendre, en utilisant la diversité virale et la circulation du virus de la rage, comment les contraintes bioécologiques pouvaient entraîner une diversité virale chez les chauves-souris, et de ce fait induire une adaptation locale des gènes de l'immunité.

Un premier volet de ce travail consista à caractériser, par une approche de métagénomique, l'ensemble des virus contenu dans des prélèvements de fèces et de salive récoltés dans différentes communautés et différents environnements. Suite à cette caractérisation, les données obtenues ont été comparées dans un premier temps au niveau d'espèces, puis au niveau des habitats. L'objectif de cette première étude était de pouvoir mettre en évidence l'influence des caractères spécifiques et environnementaux sur la diversité virale arborée par les espèces *D. rotundus* et *M. molossus*.

Dans le second volet, les facteurs bioécologiques impliqués dans la circulation du virus de la rage en Guyane dans les communautés de chauves-souris, et plus particulièrement dans les populations desmodines, ont été étudiés.

Le troisième volet de ce travail consista à caractériser la diversité du *DRB*, impliqué dans la reconnaissance et la présentation de pathogènes aux cellules lymphocytaires T. La diversité de ce marqueur immunitaire a été comparée entre les espèces *C. perspicillata*, *D. rotundus* et *M. molossus* et entre les différents habitats. Parallèlement, une caractérisation de la région « D-loop » de l'ADN mitochondrial a été effectuée afin de comparer les diversités neutres et sélectionnées des gènes du CMH. L'objectif ici était de déterminer les moteurs principaux du polymorphisme du *DRB* et ainsi mettre en évidence une réponse aux pressions pathogéniques dépendante des caractéristiques biologiques des espèces, mais aussi dépendante de l'habitat (adaptation locale).

2.

DIVERSITÉ VIRALE DES CHIROPTÈRES

2.1. Environnement et caractères spécifiques, déterminants de la diversité virale ?

A. Résumé de l'étude virome

Les chiroptères, de par la diversité de leurs caractères bioécologiques et de leur socialité complexe, sont des réservoirs et disséminateurs majeurs de microorganismes. À ce jour, plus de 200 espèces virales ont été identifiées chez les chiroptères, dont certains tels que le virus de la Rage, Ebola, MERS-CoV, SARS-CoV, Nipah, etc., sont d'importance en santé publique (Brook et Dobson 2015; Moratelli et Calisher 2015). Paradoxalement, aucune étude de la composition et de la diversité des populations virales hébergées par les chauves-souris en région Amazonienne n'a été effectuée. L'objectif de cette étude était de caractériser les populations virales hébergées par deux espèces de chauves-souris, *D. rotundus* et *M. molossus*, vivant en sympatrie dans les environnements forestier et urbain de Guyane. Outre les facteurs biologiques, un second objectif était de pouvoir évaluer l'impact de l'environnement sur la composition et la diversité des différentes populations virales identifiées.

Un total de 298 échantillons (salive et fèces) a été utilisé dans cette étude. Les individus appartenant à l'espèce *M. molossus* ont été échantillonnés dans deux zones urbaines et deux zones forestières. L'échantillonnage des individus de l'espèce *D. rotundus* a été effectué en milieu forestier uniquement (dans deux grottes différentes). Suite au séquençage Illumina[®], nous avons obtenu plus de 53 millions de *reads*. Après analyse bioinformatique, 3,7 millions de contigs de tailles variables ont été obtenus. L'analyse par BLAST de ces derniers a permis l'identification de 48 familles virales infectant une grande diversité d'hôtes (plantes, insectes, bactéries, vertébrés, etc.). Une proportion importante des virus appartenant à des familles connues pour infecter les mammifères telles que les *Anelloviridae*, *Bunyaviridae*, *Circoviridae*, *Hepeviridae*, *Herpesviridae*, *Parvoviridae*, *Papillomaviridae*, a été identifiée, soulignant le rôle des chauves-souris comme réservoir-hôte de virus.

Les comparaisons d'indices de diversité de Shannon et Simpson ont permis de mettre en évidence des caractéristiques de populations virales en diversité et compositions pour ces deux espèces de chauves-

souris. La diversité virale observée chez *M. molossus* était près de deux fois plus élevée que celle observée pour *D. rotundus*. Nous avons également observé d'importantes divergences dans les familles virales en fonction des espèces. En effet, 14 familles de virus d'insectes et 14 familles de virus de plantes ont été identifiées majoritairement chez l'espèce insectivore. À l'inverse, les virus de mammifères représentaient la plus grande diversité chez *D. rotundus*. Ces résultats suggèrent que la diversité virale est principalement influencée par l'alimentation de l'hôte. De même, lorsque l'on s'intéresse aux familles virales non-eucaryotes, les populations virales chez *M. molossus* semblaient être dominées par les séquences de phages appartenant à la famille des *Microviridae* tandis que les virus appartenant à la famille des *Podoviridae* étaient prépondérants chez *D. rotundus*. Ces résultats suggèrent qu'il y aurait, comparativement aux données sur les microbiotes de chauves-souris (Phillips et al. 2012; Carrillo-Araujo et al. 2015), une orientation de la composition en familles virales dépendante des caractères phylogénétiques et physiologiques de l'hôte.

Les comparaisons de diversités virales en fonction des environnements ont permis la mise en évidence d'une diversité plus importante dans les environnements forestiers. Nous avons également montré une richesse spécifique propre à chaque environnement, suggérant qu'au-delà des familles virales communes probablement liées aux caractères spécifiques des hôtes, il existerait une capacité d'héberger des virus spécifiques à chaque environnement, illustrant la diversité des interactions produites dans les environnements respectifs. La comparaison des compositions virales chez les *D. rotundus* qui évoluent dans le même type d'environnement mais dans différents gîtes permet de renforcer cette hypothèse. Les divergences observées chez les *D. rotundus* montrent également l'importance de la prise en compte des interactions établies entre les communautés d'hôtes, leur fréquence et intensité, mais aussi l'impact de l'histoire démographique pour mieux identifier les déterminants de la variabilité virale au sein d'une population.

B.

Article de recherche

**Environmental constraints drive the viral diversity of two
sympatric Amazonian bat species**

1 **Environmental constraints drive the viral diversity of two**
2 **sympatric Amazonian bat species**

3

4 Arielle Salmier¹, Sourakhata Tirera¹, Benoit de Thoisy¹, Alain Franc², Edith Darcissac¹,
5 Damien Donato¹, Christiane Bouchier³, Vincent Lacoste¹ and Anne Lavergne^{1*}

6

7

8 ¹. Laboratoire des Interactions Virus-Hôtes, Institut Pasteur de la Guyane, 23 avenue Pasteur,
9 BP 6010, 97306 Cayenne Cedex, French Guiana.

10 ². UMR BIOGECO, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), F-33610 Cestas,
11 France.

12 ³. Institut Pasteur, Plateforme de Génomique - Pôle Biomics, Paris, France.

13

14

15 *Corresponding author:

16 E-mail: alavergne@pasteur-cayenne.fr

17

18

19 **Abstract (150 words)**

20 Amazonia encompasses the greatest diversity of bat species in the world, although the viral
21 population diversity has yet to be investigated. Here we identify 10,983 viral sequences, related
22 to 48 viral families, known to infect a wide range of hosts, in *Desmodus rotundus* and *Molossus*
23 *molossus*, evolving in sympatry in French Guiana. Most viruses detected reflect the dietary
24 habits and the ancestral legacy of bats, suggesting an association of viral diversity with the
25 host's gut microbiota. Diversity tests showed a strong correlation between the type of
26 environment, host phylogeny, diet and viral diversity. The substantial viral richness detected in
27 forest environments is likely due to a wider diversity of prey and favored by more frequent
28 contacts between hosts and overlapping habitats. These findings provide significant insight into
29 viral bat diversity in Amazonia and emphasize that environmental constraints and host features
30 are the main drivers of viral diversity in bat species.

31
32 **Keywords:** *Desmodus rotundus*, *Molossus molossus*, virome, guano, saliva, Amazonia

35 **Introduction**

36 Bats present a rich microbial diversity as compared to other animals, particularly regarding
37 viruses [1]. Their uniqueness as hosts of pathogenic viruses has animated the debates in recent
38 years [2]. Indeed, their particular bioecological and behavioral features such as their ability to
39 fly over long distances, their long lifespan, their diverse feeding strategies and their complex
40 social structures give them a special status as reservoir hosts [3]. These features seem to
41 facilitate the acquisition and dispersal of pathogens across remote regions as well as interspecies
42 transmissions [2,4]. Studies have also highlighted that bats present long life histories with

43 numerous viral families and genera (e.g., *Paramyxoviridae*, *Filoviridae*, *Lyssavirus*,
44 *Henipavirus*), with viruses isolated from bats usually more ancient than those found in humans
45 or other animals [5]. With the rise of new sequencing technologies and associated
46 bioinformatics tools, research on virus reservoirs and their uncultured viral communities has
47 increased sharply. The knowledge provided by this research can help prevent major public
48 health problems [6,7]. To date, the search for viral population diversity (virome) in bats has
49 almost exclusively focused on North American and Eurasian bat communities [8–16]. These
50 studies reported many novel mammalian viruses, some of public health interest.

51
52 The Amazon is a major biodiversity hotspot. However, the virome harbored by the Amazonian
53 bats and the effects of contrasting environmental conditions on viral diversity have yet to be
54 investigated. Recent studies conducted in Southern Brazil and focused on the insectivorous
55 Brazilian free-tailed bat, *Tadarida brasiliensis*, reported new viral species in the *Anelloviridae*
56 [17], *Circoviridae* [18,19] and *Polyomaviridae* [20] families. In French Guiana, an Amazonian
57 region, 106 bat species have been listed [21]. During the last few decades this region has
58 undergone environmental changes (e.g., urbanization, agriculture intensification,
59 deforestation), which has led to alterations in the composition and dynamics of bat communities
60 [22,23]. Studies conducted in the Neotropics reported an overall decrease in species richness
61 and relative abundance correlated with the urban influence, though species highly tolerant to
62 environmental disturbances, such as insectivorous bats, tend to persist in large urban
63 environments [24]. Moreover, the role of habitat quality (e.g., pristine forest habitats) was also
64 highlighted in the circulation and maintenance of the rabies virus [25].

65
66 The aim of this study was to characterize the virome of two Amazonian bat species: the common
67 vampire bat, *Desmodus rotundus* (*Phyllostomidae*) and the insectivorous bat, *Molossus*

68 *molossus* (*Molossidae*). These sympatric bat species have high plasticity and tolerance to
69 perturbations and inhabit most environments present in French Guiana (e.g., forest, edges,
70 anthropized and urban areas). Given that landscapes are known as environmental predictors of
71 species richness [26] and that a strong correlation between the host and the parasite/pathogen
72 respective species richness has been highlighted [27], differences between the viral richness
73 harbored by these two species can be expected, with notable differences depending on the
74 environment (forest vs. urban). To assess the impact of environmental conditions, the viral
75 diversity of feces and saliva swabs harbored by different populations of vampire and
76 insectivorous bats inhabiting forest and urban environments were compared. Additionally, the
77 importance of ecological, biological and behavioral traits (e.g., dietary habits, roosting,
78 foraging) on viral diversity were compared between species. Finally, to determine the
79 evolutionary relationships of several identified viruses infecting mammals, phylogenetic
80 analyses were performed. The findings allow identifying novel vertebrate viruses and
81 emphasize the importance of environmental conditions and diets in shaping viral diversity for
82 these two Amazonian bat species.

83

84

85 **Materials and Methods**

86 **Ethics statement**

87 All animals were captured, handled and sampled following ASM guidelines [28] under the
88 supervision of researchers granted the French animal experimentation level 1 diploma. Bats are
89 not protected by law in French Guiana. The project was nevertheless submitted to and approved
90 by the Conseil Scientifique Régional pour le Patrimoine Naturel de la Guyane. Captures that
91 occurred within protected areas (nature reserves) received approval by the Conseil Scientifique
92 Régional du Patrimoine Naturel on 26 January 2010 and ad-hoc authorizations (no. 2011-35

93 dated 05/30/2011, no. 35 and 59 obtained 03/21/2013 and 04/17/2013, respectively, and
94 delivered by the Prefecture of French Guiana).

95

96 **Study areas and bat sampling**

97 Stool and saliva samples were collected from bats trapped between 2010 and 2014. The animals
98 were trapped with mist nets erected inside roosts or through putative foraging courses of bats
99 at four sites located in forest environments and two sites located in urban landscapes (S1 Table
100 and S1 Fig.). Species were identified on site, using external morphology. Prior to release, saliva
101 swabs from the two species were collected and preserved on ice with 500 μ l of Dulbecco's
102 modified Eagle Medium (DMEM, Sigma). For *M. molossus*, individuals were held in individual
103 sacks secured to a rope line for at least 10 min, allowing enough time for the excretion of fresh
104 stools (~100 mg). For *D. rotundus*, clean plastic sheets were laid down on flat surfaces beneath
105 known roosts. Freshly produced stools were collected (three per collecting tube (~500 mg)) the
106 following morning and temporarily preserved on ice. All samples were later stored at -80°C .

107

108 **Sample processing**

109 Stool samples from the *M. molossus* species were pooled according to the characteristics of the
110 sampling area (forest vs. urban environments) as well as saliva samples. Samples from the *D.*
111 *rotundus* species were treated as per the collection sites (Cave F and Cave M) to evaluate the
112 viral diversity of bats sharing similar habitat 20 km apart. For stool samples, pools were
113 constituted with 100 mg (*M. molossus*) and 200 mg (*D. rotundus*) of stools from each collecting
114 tube and homogenized by vigorous vortexing with 5–10 ml DMEM. For saliva samples, swabs
115 were vigorously resuspended and 200 μ L of suspension from each collecting tube was used to
116 constitute the pools. All samples were processed as previously described [29].

117 Briefly, stool and saliva samples were cleared of debris by low-speed centrifugation (5 min,
118 10,000 g, 4°C). To remove eukaryotic and bacterial cell-sized particles, supernatants of stool
119 samples were successively filtered through 0.8-µm, 0.45-µm and 0.22-µm cellulose acetate
120 membrane filters (Nalgene). Supernatants of saliva samples were successively filtered through
121 0.45-µm and 0.22-µm filters. Then a differential centrifugation procedure was used to pellet the
122 viral particles [30]. The filtrates from stool samples were cleared of smaller and less dense
123 components through a 1-h ultracentrifugation (100,000 g, 4°C). Then the pellets were
124 resuspended in nuclease-free water and cleared of persistent high-density particles with a low-
125 speed centrifugation (15 min, 10,000 g, 4°C). Viral particles were then pelleted with a last
126 ultracentrifugation procedure (1 h, 100,000 g, 4°C). For filtrates from saliva samples, only the
127 last two steps of the differential centrifugation were performed. All viral pellets were
128 resuspended in 40 µL of nuclease-free water.

129

130 **Nuclease treatment and viral acid nucleic extraction**

131 Resuspended viral pellets from stool samples were treated with a mixture of DNases (Turbo
132 DNase from Ambion and Benzonase from Novagen) and RNase One (Promega) to digest
133 nonenveloped nucleic acids (i.e., those not in viral capsids) [31]. Resuspended viral pellets from
134 saliva samples were treated with the mixture of DNases. All viral nucleic acids were then
135 extracted using the NucliSENS easyMAG® bio-robot (bioMérieux).

136

137 **Reverse transcription and amplification**

138 For both stool and saliva samples, the RNA virus-only and DNA virus-only libraries were
139 constructed using a whole transcriptome (WTA) or a whole genome (WGA) amplification
140 method, respectively, as previously described [32]. For the RNA virus-only amplification, an
141 aliquot of the extracted viral nucleic acid collected was treated with Turbo DNase to remove

142 viral DNA. Persistent rRNA was depleted with the GeneRead™ rRNA depletion kit (Qiagen),
143 following the manufacturer's recommendations. Then viral RNA amplification was performed
144 as described in the protocol of the QuantiTect® Whole Transcriptome Kit (Qiagen) except for
145 the reverse transcription step. cDNA was synthesized using SuperScript® III Reverse
146 Transcriptase (Invitrogen) and random hexamers (Roche), following the manufacturers'
147 recommendations. For DNA virus-only amplification, an aliquot of the extracted viral nucleic
148 acid collected was treated with RNase One to remove viral RNA. Then viral DNA amplification
149 was performed as described in the protocol of the QuantiTect® Whole Genome Kit (Qiagen).
150 To ensure homogeneity and blunt ends at the end of the produced strands, 10 U of Klenow
151 polymerase (Roche) was added to the WTA- and WGA-amplified nucleic acids with 8 µL of
152 random hexamers (Roche), incubated 1 h at 37°C, followed by 10 min at 75°C. Samples were
153 assayed with a Qubit® fluorometric quantitation (Qiagen), using the dsDNA BR and dsDNA
154 HS Qubit® assay kits, as recommended by the manufacturer.

155

156 **Next generation sequencing**

157 For both stool and saliva samples, 1 µg of each viral library was pooled together, whenever
158 possible, to construct RNA plus DNA viral libraries. High-throughput sequencing was carried
159 out at the Genomics platform at the Institut Pasteur, Paris. Shotgun libraries were prepared by
160 standard Illumina protocols using 1 µg of total genomic DNA. Each sample (stool or saliva)
161 was tagged according to its provenance (species and habitats) using Illumina adaptor-specific
162 primers. Samples were sequenced on a MiSeq sequencer in 300-base paired end reads.

163

164 **Bioinformatic pipeline**

165 The Illumina sequencing reads were grouped according to their adaptor tags and were processed
166 individually. Sequence files were stripped of their adapter sequences using Trimmomatic v.0.32

167 [33]. Duplicate sequence reads were removed with FastqMcf v.1.04.676 and quality was
168 checked using the Fastx toolkit v.0.0.13 (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html),
169 with a quality threshold of 30 and length criteria of 70%. All cleaned data sets were saved for
170 further analysis. Simultaneously, a three-pass digital normalization was run on each sample file
171 using the khmer software package [34,35]. Normalized files were saved for further analysis.
172 Following Baker's contig consolidation strategy [36], both normalized and non-normalized
173 reads were *de novo* assembled using two assembly algorithms, namely Velvet [37] and SPAdes
174 [38]. Three k-mer sizes (21, 55 and 99) were used for both assemblers. The contigs generated
175 were compared (Fig. 1A) between k-mer sizes for each assembler (comparison 1), between
176 assemblers (comparison 2) and between normalized and non-normalized data sets (comparison
177 3). A removal of duplicated contigs and a clustering, using USEARCH v.7.0.1090
178 (<http://www.drive5.com/usearch>, [39]), with a 95% threshold identity value, followed each
179 comparison. Clustered contigs from comparison 3 (centroids) were considered as consolidated
180 contig sets with lengths ranging from 33 to 15,756 bp and low redundancy. Centroids underwent
181 a sequential homology search using BLAST comparison against NCBI (at March 2015) and
182 custom-made databases for taxonomic classification (Fig. 2B). Centroids were submitted to
183 BLASTn comparison with both the NCBI nt and Institut Pasteur de Paris gbvrl databases. The
184 best-matched reference sequence was retrieved from both databases (cutoff value: 10^{-5}). A
185 length comparison between the results was performed using a bit score ratio
186 ($br = \text{bitscore_blastn_nt} / \text{bitscore_blastn_gb_vrl}$), and only contigs with $br > 0.90$ were
187 regarded as suspect-viral sequences and conserved for further analysis. Contigs not identified
188 as suspect-viral underwent a BLASTx comparison against a custom-made database, which
189 included all protein sequences of the viral kingdom (cutoff value: 10^{-3}). To reduce the
190 misidentification bias of false-positive sequences, identified suspect-viral sequences underwent
191 a second BLASTx comparison with the NCBI nr database (cutoff value: 10^{-3}). Sequences not

192 retained were discarded. Taxonomic information and the kingdom of each gene id were
193 retrieved with the taxdb blastcmd.

194

195

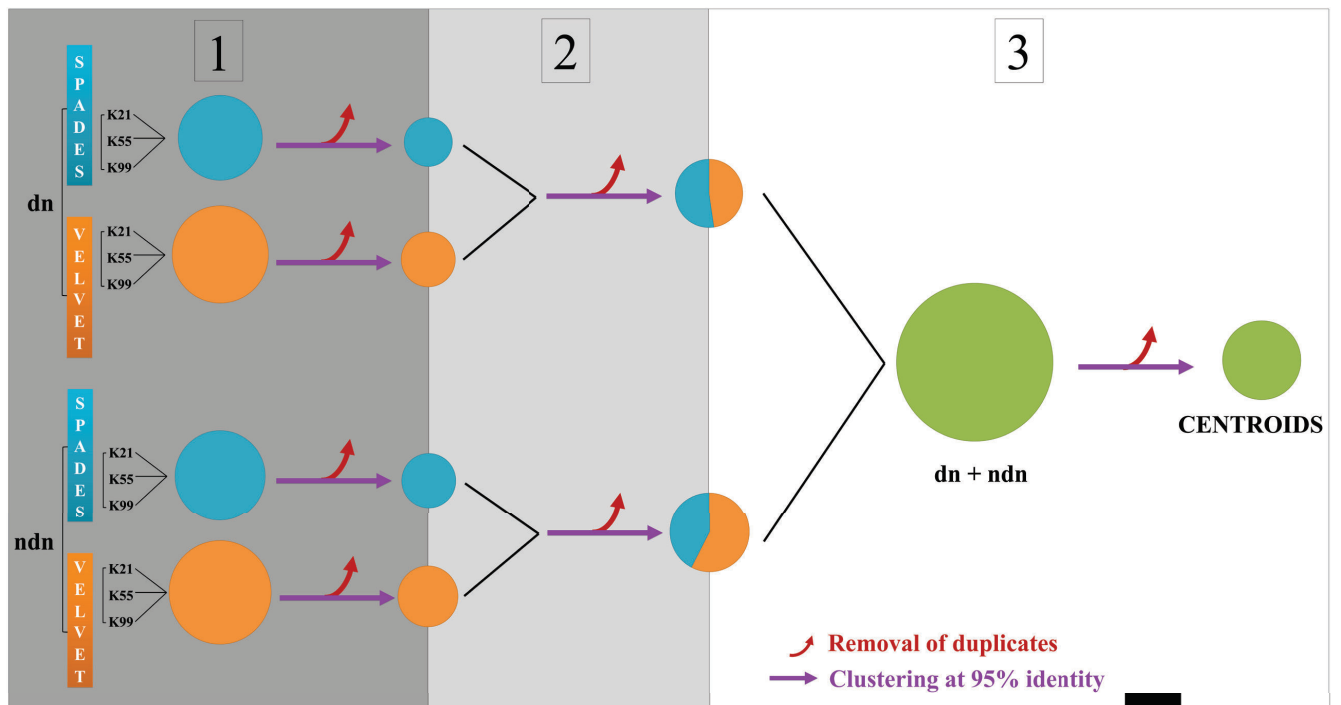
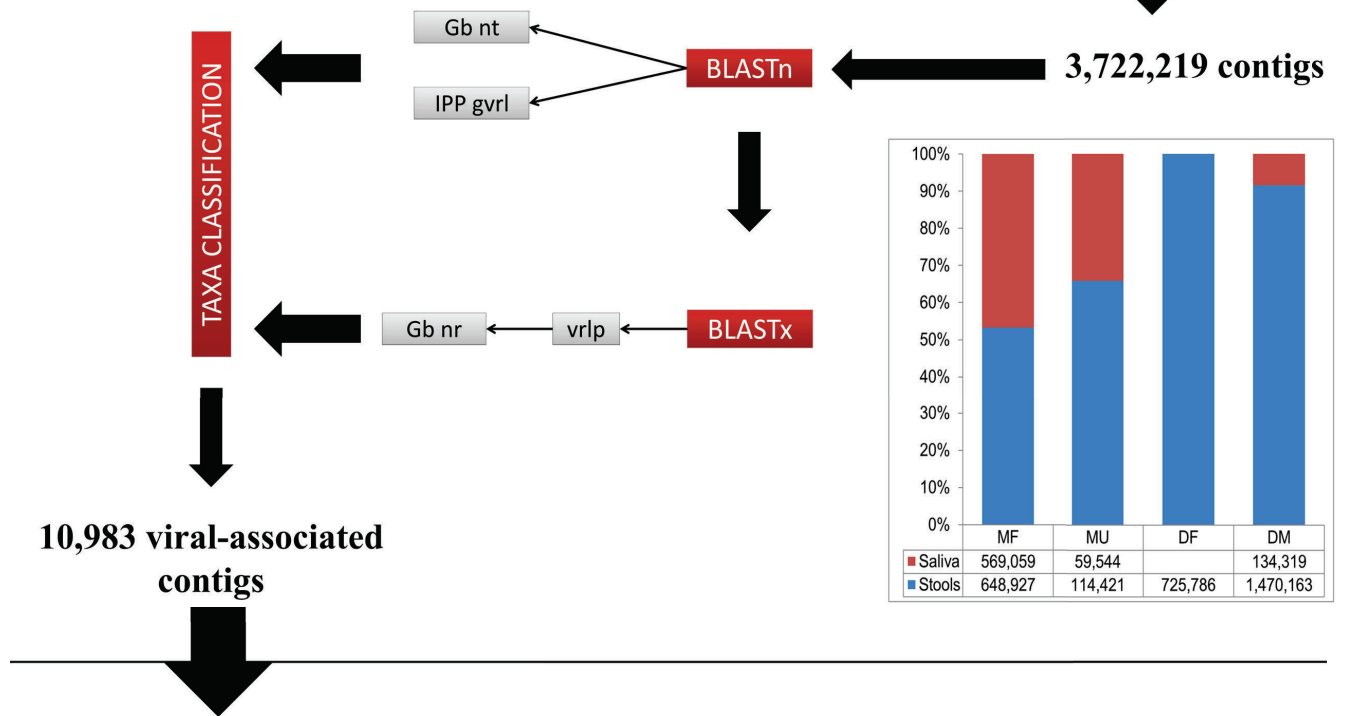
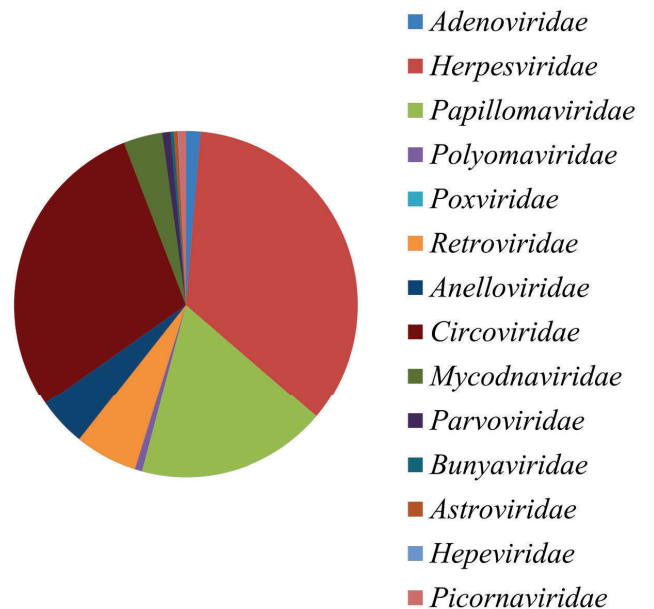
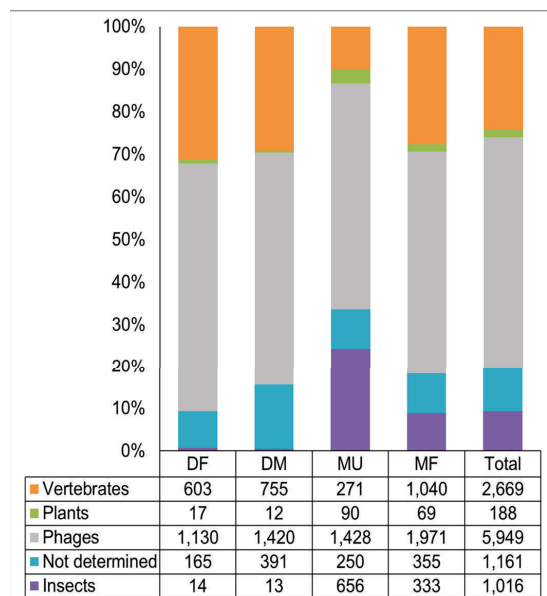
196

197

198

199

200 **Figure 1 Bioinformatic analysis pipeline for the 3,722,219 assembled contigs, based on**
201 **[36].** (A) Contigs assembled from both normalized and non-normalized sequence reads by two
202 *de novo* assemblers (SPAdes and Velvet) were consolidated by sequential comparisons
203 (numbered shadowed areas) and removal of duplicate sequences (red arrows). (B) Centroids
204 subjected to sequential BLAST comparison and manually controlled taxonomic classification
205 to identify viral sequences. Proportion of sequences assembled from stools (red) and saliva
206 swabs (blue) are shown in the stacked chart for each species depending on environment, DF
207 (*Desmodus rotundus* in Cave F), DM (*D. rotundus* in Cave M), MU (*Molossus molossus* in
208 urban and periurban areas) and MF (*M. molossus* in forest areas). (C) Distribution of contig
209 matches by species and environment is shown in the stacked chart. Pie chart represents the
210 global proportion of contigs related to mammalian viruses.

A**B****C**

211 **Statistical analysis**

212 Species richness (S) was computed for *D. rotundus* and *M. molossus* as well as for each
213 environment (CF, CM, urban and forest areas), at both viral family and vertebrate-only viral
214 family levels. The diversity of each sample was measured with both Shannon and Simpson
215 indexes. The Shannon diversity index (entropy (H), [40]) assumes that all individuals are
216 randomly sampled from an infinitely large community and that all species (viral families here)
217 are represented in the sample [41]. H ranges from 0 to the maximum diversity (H_{max}). The ratio
218 of observed diversity to H_{max} was used to measure evenness, namely Shannon's equitability
219 index (J) ([41]). J ranges from 0 to 1, with 1 being complete evenness. As H is sensitive to the
220 sample size, another diversity index was also calculated. The Simpson diversity index
221 (dominance (D), [42]) estimates the probability that two randomly drawn individuals from an
222 infinitely large community belong to the same taxa. As D increases, diversity decreases.
223 Simpson's measure of evenness ($E_{1/D}$) was calculated to emphasize dominance [43,44]. All
224 computations were performed using PAST v.3 [45]. Shannon and Simpson diversity indexes
225 were further compared between the two species investigated as well as between the respective
226 environments, using the *diversity t test* implemented in PAST. Finally, the correlation between
227 the number of contigs within the viral families found and the environment was investigated.
228 For this analysis, pools of collected samples (which include both the species and the type of
229 environment) were regarded as bat categories. The natural host (phages, insect, plants and
230 vertebrates) of each viral family detected was considered as a first variable and bat categories
231 were used as a second variable. A contingency table listing the number of contigs per viral
232 family and bat category was used to assess the interactions between the two variables through
233 a correspondence analysis [46] performed with procedure *ca* of R [47].

234

235 **Phylogenetic analysis**

236 Selected contigs were used for phylogenetic analysis. Reference genomes or nucleotide
237 sequences of previously identified viruses were downloaded from GenBank. The accession
238 number of viral sequences used to infer the phylogenetic trees are given in the respective
239 analyses. Nucleotide and protein sequence editing was performed with GENEIOUS R9
240 (<http://www.geneious.com>, [48]). Sequences were aligned using the MAFFT alignment tool [49]
241 included in the software. Nucleotide and protein sequences were trimmed and gap-stripped
242 prior to phylogenetic analyses. For each analysis, the best-fitted model of nucleotide or amino
243 acid substitution was selected using jModelTest 2 [50] and ProtTest 3 [51], respectively, under
244 corrected Akaike information criteria (AICc). Bayesian phylogenetic analyses were performed
245 using MRBAYES 3 [52]. The program was run 10,000,000 generations, with a sampling
246 frequency of 500 and a burn-in of 25%. Validation of the inference was assessed based on the
247 standard deviation of split frequencies, less than the expected threshold value of 0.01.

248

249 **Nucleotide Sequence Accession Numbers**

250 All virus sequences reported in this study have been deposited in the GenBank nucleotide
251 database under accession numbers KX812440 to KX812444, KX812446, KX812447,
252 KX821677 and KX954092. The data from Illumina sequencing were deposited in GenBank
253 Sequence Reads Archive under accession numbers: SAMN05725475–SAMN05725481.

254

255

256 **Results**

257 **Sampling and viral amplification**

258 One hundred and seven *M. molossus* individuals were sampled throughout two urban areas and
259 two forest areas: 88 for saliva swabs and 19 for stools (S1 Table). One hundred and ninety-one
260 samples of *D. rotundus* were collected in two roosts located in forest areas: 50 for saliva swabs
261 and 141 for stools (S1 Table). Four pool samples were constituted for *M. molossus*: two for the
262 saliva samples and two for the stool samples coming from forest (MFS and MFF) and urban
263 (MUS and MUF) environments, respectively (S1 Table). Three pool samples were constituted
264 for *D. rotundus*: one for the saliva of individuals trapped in Cave M (DMS) and two for the
265 stool samples collected in both roosts, Cave F and Cave M (DFF and DMF) (S1 Table). For the
266 overall analysis of viral diversity, the results obtained for the stool and saliva samples were
267 pooled together and four pools were formed: *M. molossus* forest (MF) and urban (MU), and *D.*
268 *rotundus* Cave F (DF) and Cave M (DM).

270 **Illumina sequencing and assembly**

271 Overall, we obtained 53,325,594 raw read sequences (S2 Table). For *M. molossus*, 33,333,557
272 raw sequences were generated from both stool and saliva samples and 19,992,037 for *D.*
273 *rotundus*. Following the data reduction steps, 10,339,752 non-digitally normalized reads and
274 4,117,544 digitally normalized reads were used for *de novo* assembly. SPAdes and Velvet
275 assemblers generated a comparable number of contigs, even between normalized and non-
276 normalized data. Between 50.22% and 67.66% of the contigs were saved after comparison 1
277 (S3 Table). Following comparison 2, between 68.09% and 73.19% of the contigs from
278 comparison 1 were saved for further analyses (S4 Table). Finally, between 50.61% and 56.30%
279 of the contigs from comparison 2 were saved to generate the centroids (S5 Table). Following

280 our consolidation steps, a total of 3,722,219 contigs were used for the taxonomic assignment.
281 Most of the contigs retained originated from stool samples (Fig. 1B). *Eukaryota*-, *Bacteria*- and
282 *Virus*-associated contigs accounted for 1.02%, 3.82% and 0.30% of the total of consolidated
283 contigs, respectively (S6 Table). A total of 10,983 viral-associated sequences related to 48
284 known viral families and four dragonfly-associated/unclassified/uncultured/unassigned
285 families were identified based on their most significant BLAST matches (S7 Table). The
286 number of virus-associated contigs ranged from 1,929 for DF to 3,768 for MF (S7 Table).

287

288 **General virome information and phage-related sequences**

289 More than half of the viral-associated contigs (ranging from 52% for MF to 59% for DF)
290 matched phage sequences (Fig. 1C and S7 Table), accounting for eight phage families
291 belonging to the dsDNA, ssDNA and ssRNA positive-strand groups. These families were
292 identified in both stool and saliva samples. Among the eight phage families, the *Podoviridae*
293 family of the dsDNA order *Caudovirales* accounted for most phage sequences detected in *D.*
294 *rotundus* while the *Microviridae* family accounted for most of the phage sequences identified
295 for *M. molossus*. Eukaryotic viral sequences (insect, plant and vertebrate viruses) accounted for
296 35% of the total of the viral-associated contigs identified (ranging from 30% for DM to 38%
297 for MU and MF), representing 42 known viral families. A high proportion of these families
298 reflected the dietary habits of bats, especially for the insectivorous species trapped in urban
299 areas where most (74%) of the eukaryotic viruses identified belonged to nonmammalian viruses
300 (Fig. 1C and S7 Table). Contigs matching unclassified viral sequences accounted for one-tenth
301 of the total of viral-associated contigs (ranging from 9% for DF, MU and MF to 15% for DM)
302 (Fig. 1C and S7 Table).

303

304 **Comparison of viral diversities**

305 **Between *D. rotundus* and *M. molossus***

306 Overall, species richness was equal to 29 for *D. rotundus* and 50 for *M. molossus*, corresponding
307 to a total of 4,520 and 6,463 contigs, respectively (Table 1A).

Peer Review

308 **Table 1 Statistical estimation of viral diversity per species and per environment**

			<i>S</i>	<i>n</i>	<i>H</i>	<i>H_{max}</i>	<i>J</i>	<i>D</i>	<i>E_{1/D}</i>
A.	Viral family	<i>D. rotundus</i>	29	4,520	2.254	3.367	0.669	0.137	0.252
		<i>M. molossus</i>	50	6,463	2.190	3.912	0.560	0.227	0.088
B.	Vertebrate viruses	<i>D. rotundus</i>	11	1,358	1.515	2.398	0.632	0.268	0.339
		<i>M. molossus</i>	13	1,311	1.672	2.565	0.652	0.244	0.315
C.	Viral family	DF	25	1,929	2.331	3.219	0.724	0.122	0.329
		DM	25	2,591	2.119	3.219	0.658	0.158	0.253
		MU	41	2,695	1.820	3.714	0.490	0.308	0.079
		MF	39	3,768	2.206	3.664	0.602	0.195	0.131
D.	Vertebrate viruses	DF	10	603	1.475	2.303	0.641	0.264	0.379
		DM	9	755	1.450	2.197	0.660	0.310	0.359
		MU	12	271	1.232	2.485	0.496	0.473	0.176
		MF	11	1,040	1.548	2.398	0.646	0.279	0.326

309 *S* is species richness. *n* is the number of viral sequences identified. *H* is Shannon diversity. *H_{max}* is the maximum
310 diversity observable. *J* is Shannon's equitability index. *D* (dominance) is Simpson diversity. *E_{1/D}* is Simpson's
311 measure of evenness. Viral diversity was computed, per species, with (A) the number of viral families identified
312 as *S* and (B) the number of vertebrate viral families identified as *S*. Viral diversity was computed, per environment,
313 with (C) the number of viral families identified as *S* and (D) the number of vertebrate viral families identified as
314 *S*.

315 Shannon diversity reflects moderate viral diversity, with $H = 2.254$ for *D. rotundus* and
 316 $H = 2.190$ for *M. molossus*. Shannon's equitability index revealed an average evenness for both
 317 species, with $J = 0.669$ for *D. rotundus* and $J = 0.560$ for *M. molossus*. Simpson diversity
 318 showed high diversity, with $D = 0.137$ for *D. rotundus* and $D = 0.277$ for *M. molossus*.
 319 Simpson's measure of evenness emphasizes the dominance of one or several taxa in both
 320 species, with $E_{1/D}$ was equal to 0.252 for *D. rotundus* and 0.088 for *M. molossus*. Comparison
 321 of Shannon and Simpson diversities between species showed significant differences in the viral
 322 diversity in the two species (p -value $\leq 10^{-3}$, Table 2A).

323

324 **Table 2 Comparison of viral diversity between *D. rotundus* and *M. molossus* species**

A.	Viral family	<i>Desmodus rotundus</i>		<i>Molossus molossus</i>	
		<i>D. rotundus</i>	*	-16.59	(6.5×10^{-61})
	<i>M. molossus</i>	2.77	(5.6×10^{-03})	*	
B.	Vertebrate viruses	<i>Desmodus rotundus</i>		<i>Molossus molossus</i>	
		<i>D. rotundus</i>	*	2.67	(7.64×10^{-03})
	<i>M. molossus</i>	-4.49	(7.41×10^{-06})	*	

325 (A) Viral diversity was computed with the number of viral families identified as species richness (S). (B) Viral
 326 diversity was computed with the number of vertebrate viral families identified as S . The t values of Shannon
 327 diversity are given below the diagonal and the t values of Simpson diversity are given above the diagonal. The
 328 corresponding p -values are given in parentheses. Significant p -values are shown in red.

329

330 Considering vertebrate-related viral families only, 11 and 13 taxa were identified in *D. rotundus*
 331 and *M. molossus*, accounting for 1,358 and 1,311 contigs, respectively (Table 1B).

332 Shannon diversity demonstrated an average diversity for the two species ($H = 1.515$ for *D.*
 333 *rotundus* and $H = 1.672$ for *M. molossus*) and evenness was low for both species. Simpson
 334 diversity showed high diversity, correlated to a few dominant viral families ($E_{1/D} = 0.339$ for
 335 *D. rotundus* and $E_{1/D} = 0.315$ for *M. molossus*). Comparison of Shannon and Simpson
 336 diversities also revealed significant divergences between the viral diversity observed within

337 vertebrate-related viral families (p -value $\leq 10^{-03}$, Table 2B), suggesting different
 338 heterogeneities and variances of family abundance and distribution between samples.

339

340 **Between environments**

341 Species richness was the same in DF and DM ($S = 25$), and close in MU and MF ($S = 41$ and
 342 39, respectively) (Table 1C). H ranged from 1.820 in MU to 2.331 in DF, showing high viral
 343 diversity for all samples. J ranged from 0.490 in MU to 0.724 in DF, revealing higher evenness
 344 in forest areas. D ranged from 0.122 in DF to 0.308 in MU, supporting high diversity, though
 345 correlated to dominant viral families since $E_{1/D}$ ranged from 0.079 in MU to 0.329 in DF.
 346 Comparison of both Shannon and Simpson diversities showed significant differences between
 347 the two *D. rotundus* samples, as well as between *M. molossus* samples (p -value $\leq 10^{-14}$,
 348 Table 3A). When comparing forest-only samples (DF, DM and MF), we also found significant
 349 divergence (p -value $\leq 10^{-03}$).

350

351 **Table 3 Comparison of viral diversity between all environments**

		DF	DM	MU	MF	
A.	Viral family	DF	*	-7.69 (1.8*10 ⁻¹⁴)	-12.26 (4.0*10 ⁻³⁴)	
		DM	7.88 (4.1*10 ⁻¹⁵)	*	-5.69 (1.3*10 ⁻⁰⁸)	
		MU			*	11.20 (9.7*10 ⁻²⁹)
		MF	4.29 (1.9*10 ⁻⁰⁵)	-3.07 (2.1*10 ⁻⁰³)	-10.56 (8.0*10 ⁻²⁶)	*
		DF	DM	MU	MF	
B.	Vertebrate viruses	DF	*	-3.26 (1.13*10 ⁻⁰³)	-1.24 (2.16*10 ⁻⁰¹)	
		DM	0.55 (5.84*10 ⁻⁰¹)	*	2.07 (3.91*10 ⁻⁰²)	
		MU			*	5.56 (5.70*10 ⁻⁰⁸)
		MF	-1.75 (8.10*10 ⁻⁰²)	-2.19 (2.87*10 ⁻⁰²)	-3.69 (2.56*10 ⁻⁰⁴)	*

352 (A) Viral diversity was computed with the number of viral families identified as species richness (S). (B) Viral
 353 diversity was computed with the number of vertebrate viral families identified as S . The t values of Shannon
 354 diversity are given below the diagonal and the t values of Simpson diversity are given above the diagonal. The
 355 corresponding p -values are given in parentheses. Significant p -values are displayed in red.

356

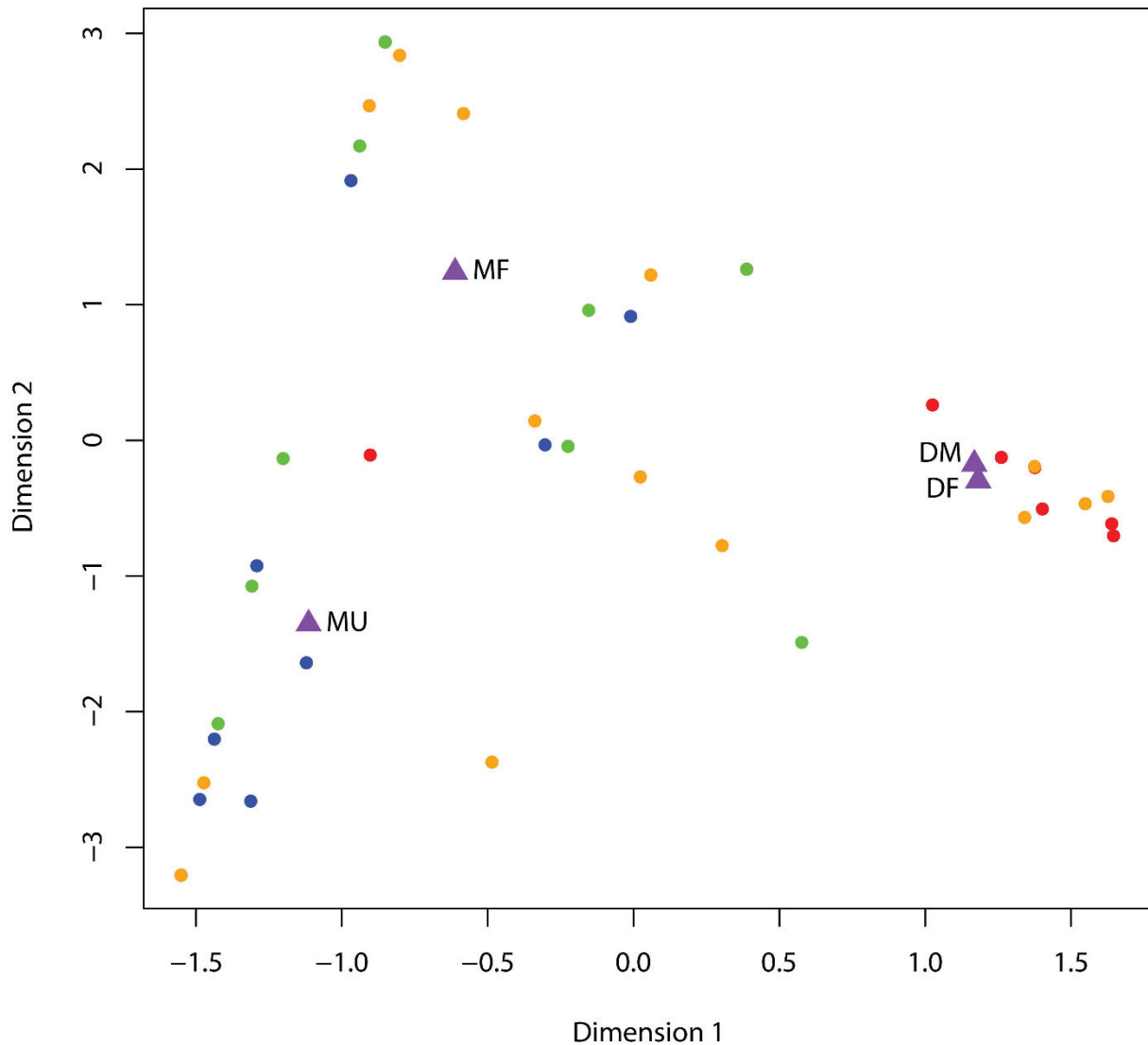
357 Considering vertebrate-related viral families, S ranged from 9 in DM to 12 in MU (Table 1D),
358 accounting for 271–755 contigs, respectively. H ranged from 1.232 in MU to 1.475 in DF,
359 revealing moderate diversity for all samples. J ranged from 0.496 in MU to 0.641 in DF,
360 demonstrating an average evenness in all samples, but higher in forest areas. D ranged from
361 0.264 in DF to 0.473 in MU, supporting the high diversity, though once again correlated to
362 dominant viral families given that $E_{1/D}$ ranged from 0.176 in MU to 0.379 in DF. Comparison
363 of Shannon diversity in *D. rotundus* samples showed no significant divergences (p -value $\geq 10^{-01}$,
364 Table 3B), as between DF and MF (p -value $\geq 5 \cdot 10^{-02}$). Significant divergence in the samples’
365 heterogeneity were highlighted between DM and MF (p -value $\leq 5 \cdot 10^{-02}$) as well as between MU
366 and MF (p -value $\leq 10^{-03}$). Comparison of Simpson diversity revealed a comparable abundance
367 distribution between MF and DF (p -value $\geq 10^{-01}$). Significant divergence was emphasized
368 between both *D. rotundus* samples as well as between *M. molossus* samples.

369

370 **Correspondence analysis**

371 The correspondence analysis was performed on the contingency table of the counts of contigs
372 per viral family and per bat category (S7 Table). DM, DF, MU and MF were used as the bat
373 categories. Since there were four bat categories and the correspondence analysis worked with
374 count profiles, we obtained three-dimensional graphics. The scatter plot obtained (Fig. 2)
375 provided the plot of the first two axes, with 69.3% inertia on the first axis and 23.6% on the
376 second axis (hence 92.9% on first two axes). The first axis clearly separated *D. rotundus* from
377 *M. molossus*. The second axis separated environments for *M. molossus* (urban (MU) vs. forest
378 (MF)), whereas for *D. rotundus*, the count profiles of bats trapped in Cave F (DF) and Cave M
379 (DM) were very similar. Three poles structured the scatter plot: one for *D. rotundus* (both
380 caves), one for MF and one for MU. These results indicated that viral families were mainly
381 driven by the bat species (on axis 1), then by the environment for one species (axis 2).

382 Considering the distribution of viral families according to their natural host (e.g., insects,
383 phages, plants and vertebrates), the results showed that some viral families are exclusively
384 related to either a bat species or an environment in each bat species. Phage-related viral families
385 were mainly associated with *D. rotundus*. Vertebrate-related viral families were more balanced
386 between bat species and environments. Insect- and plant-related viral families were well
387 balanced between *M. molossus* categories, MF and MU (urban environment), with a stronger
388 association of insect-related viral families for MU. Furthermore, the analysis of viral profiles
389 for each natural host-related viral family showed highly unbalanced profiles of viral families
390 among the bat categories, DM, DF, MU and MF (S2 Fig.).



391
 392 **Figure 2 Global distribution of viral families identified per natural host, recovered from**
 393 **metagenomic data of *D. rotundus* and *M. molossus* saliva and stool samples**
 394 **(correspondence analysis).** Dots represent the viral families. The color of each dot indicates
 395 the natural host of the viral family: insect-related viral families in blue, phage-related viral
 396 families in red, plant-related viral families in green and vertebrate-related viral families in
 397 orange. Purple triangles represent the bat categories, DF (*D. rotundus* in Cave F), DM (*D.*
 398 *rotundus* in Cave M), MU (*M. molossus* in urban and periurban areas) and MF (*M. molossus* in
 399 forest areas). Proximity between dots indicates similarity of the profiles as measured by χ^2
 400 distance. The proximity between a dot and a triangle indicates a close link between the bat
 401 category and the viral family.

402 **Eukaryotic viral sequences**

403 **Insect viruses**

404 Contigs related to insect viruses accounted for 26% of the eukaryotic viral sequences, ranging
405 from 2% for both DF and DM to 64% for MU. Fourteen insect viral families were identified
406 (S7 Table). Twelve of them were identified in MF, followed by MU ($n = 9$), DM ($n = 4$) and
407 DF ($n = 2$). Dragonfly-associated viruses accounted for a small portion of insect viruses and
408 were detected in all samples. RNA viruses were predominant for MU, with the majority of the
409 contigs associated with positive single-stranded RNA (ssRNA (+)) viruses from the
410 *Dicistroviridae* family, followed by the *Nodaviridae* and *Iflaviridae* families. The DNA viruses
411 detected were related to the double-stranded DNA (dsDNA) viruses from the *Iridoviridae* and
412 single-stranded DNA (ssDNA) *Parvoviridae* families. In contrast, insect virus-like sequences
413 identified for MF were mostly DNA viruses, with the majority represented by ssDNA viruses
414 from the *Parvoviridae* family. The largest proportion of RNA viruses detected for MF
415 corresponded to ssRNA (+) viruses from the *Dicistroviridae* and *Nodaviridae* families. The
416 four viral families (*Baculoviridae*, *Iridoviridae*, *Nudiviridae* and *Iflaviridae*) detected for the
417 vampire species were likely related to insects flying around fecal droplets or environmental
418 viruses.

420 **Plant viruses**

421 Contigs related to plant viruses accounted for 5% of the eukaryotic viral sequences, ranging
422 from 1% for DM to 9% for MU. In total, 14 viral families were identified but a significant
423 proportion of plant virus sequences not assigned to a viral family were also found (S7 Table).
424 RNA viruses were predominant, accounting for 64% of the contigs for MU. Most of them were
425 related to unassigned ssRNA (+) viruses and ssRNA (+) viruses belonging to the *Luteoviridae*,
426 *Bromoviridae* and *Virgaviridae* families. In contrast, DNA viruses were predominant for DF

427 and DM. The majority of the plant virus-like sequences were related to ssDNA viruses of the
428 *Geminiviridae* family, followed by viruses related to the dsDNA family *Phycodnaviridae*.

429

430 **Vertebrate viruses**

431 Contigs related to vertebrate viruses accounted for 69% of the eukaryotic viral sequences,
432 ranging from 27% for MU to 97% for DM. In total, 2,669 vertebrate-related viral sequences
433 were found, corresponding to 14 viral families (Fig. 1C and S7 Table). Among the 14
434 vertebrate-related viral families identified here, seven families (*Anelloviridae*, *Circoviridae*,
435 *Herpesviridae*, *Mycodnaviridae*, *Parvoviridae*, *Polyomaviridae* and *Retroviridae*) were found
436 in both species, whatever the environment. However, the number of species identified within
437 each family varied between species and also according to the environment. The highest viral
438 diversity was found in the forest environment for MF followed by both DF and DM. DNA
439 viruses were the most frequently found viruses for both species and all types of environments.
440 While we found *Poxviridae* viruses in both species, only the *D. rotundus* species presented
441 mammalian-related poxviruses. These sequences presented high amino acid homology (>90%)
442 with the *bovine papular stomatitis virus*, suggesting that the presence of this virus in the sample
443 was related to the dietary habit of *D. rotundus* and that this virus came directly from bovine.
444 ssDNA viruses from the *Anelloviridae* and *Parvoviridae* families represented the highest
445 proportion of DNA viruses for both DF and DM. Contigs related to ssDNA viruses from the
446 *Circoviridae* family were numerous for DF, MU and MF. Furthermore, a high number of
447 sequences related to the double-stranded DNA (dsDNA) viruses of the *Herpesviridae* and
448 *Papillomaviridae* families was detected for MF. RNA viruses belonged to the *Astroviridae*,
449 *Bunyaviridae*, *Hepeviridae* and *Picornaviridae* families. These viruses represented a minority
450 and were found in distinct species or environments. Astroviruses were found in DF and in both
451 environments for the *M. molossus* species. In contrast, bunyaviruses were only found in DF and

452 MF. Both hepeviruses and picornaviruses were only found in MU, with one sequence of
453 picornavirus in MF.

454

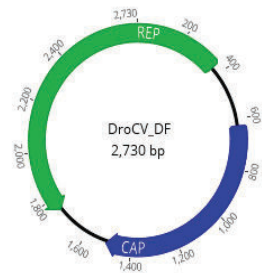
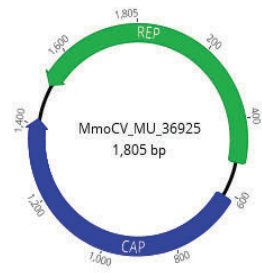
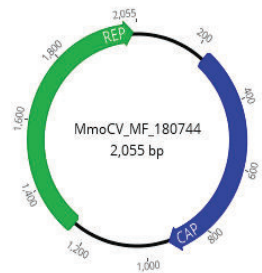
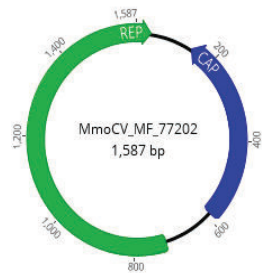
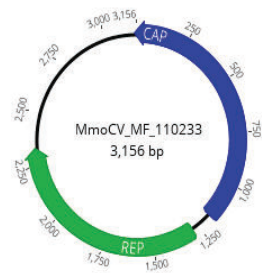
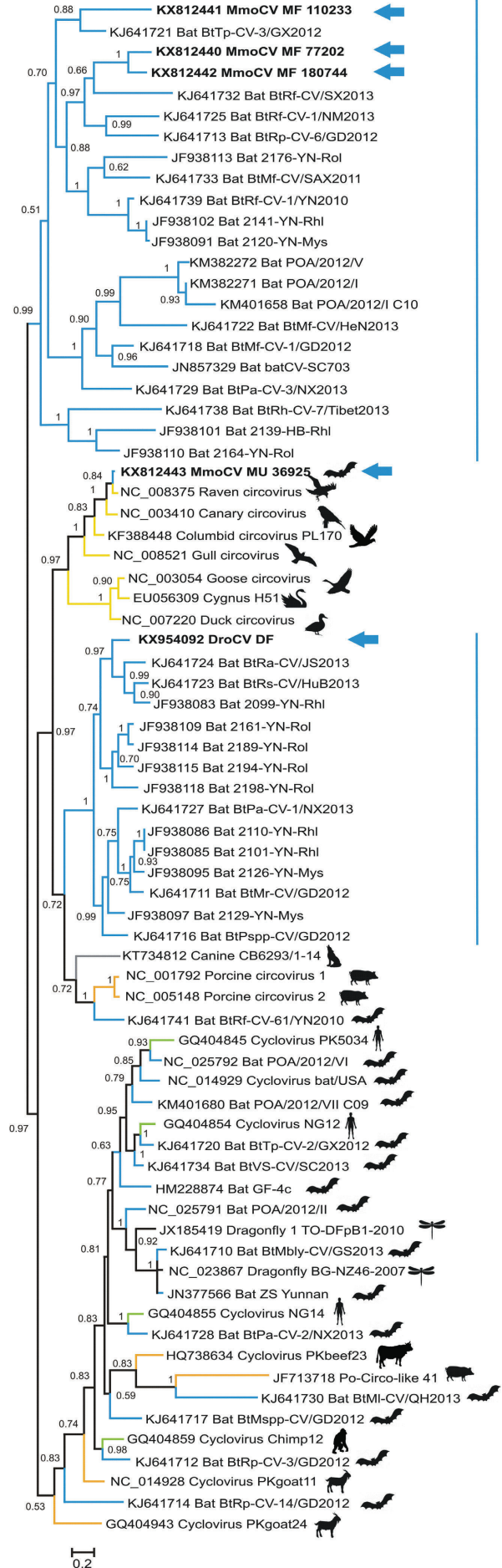
455 **Viral characterization and phylogenetic relationships of selected viruses**

456 **Bat Circoviruses**

457 The family *Circoviridae* is known to infect birds, mammals and insects, and comprises two
458 genera, *Circovirus* and *Gyrovirus*. Viruses of this family possess an unsegmented circular
459 ssDNA genome. Their genomes are usually around 2 kb in size and encode a replicase (Rep)
460 and a capsid (Cap) protein, separated by a nine-nt-length motif involved in genome replication.
461 Their transmission occurs primarily through the fecal-oral route [53]. Here, *Circoviridae*
462 viruses were detected in both *D. rotundus* and *M. molossus* samples, whatever the environment,
463 with a total of 661 contigs. These viruses were essentially found in the stool samples, except
464 for DM for which a small proportion of sequences was also detected in saliva. Four complete
465 genomes of circoviruses (CVs) were obtained – MU ($n = 1$) and MF ($n = 3$) – and one partial
466 sequence corresponding to the complete replication-associated protein gene for DM ($n = 1$)
467 (Genbank acc. nb.: KX812440–KX812443 and KX954092). The complete genomes presented
468 the archetypal genome organization of CVs, with the two inversely arranged *ORFs* encoding
469 the Rep and Cap proteins (Fig. 3A). The intergenic region was variable in length, depending on
470 the species as well as the environment. The full-length Rep was used to perform evolutionary
471 analyses. The phylogenetic tree revealed that DM and MF circoviruses formed two distinct
472 monophyletic clades with other bat circoviruses isolated from the gastrointestinal tract and fecal
473 samples of Chinese bat species [54] (Fig. 3B). In contrast, MU circovirus was closely related
474 to circoviruses isolated from birds, with a posterior probability of 0.84. We also identified
475 fragments of gyroviruses but that were insufficient in length to proceed to phylogenetic
476 analyses.

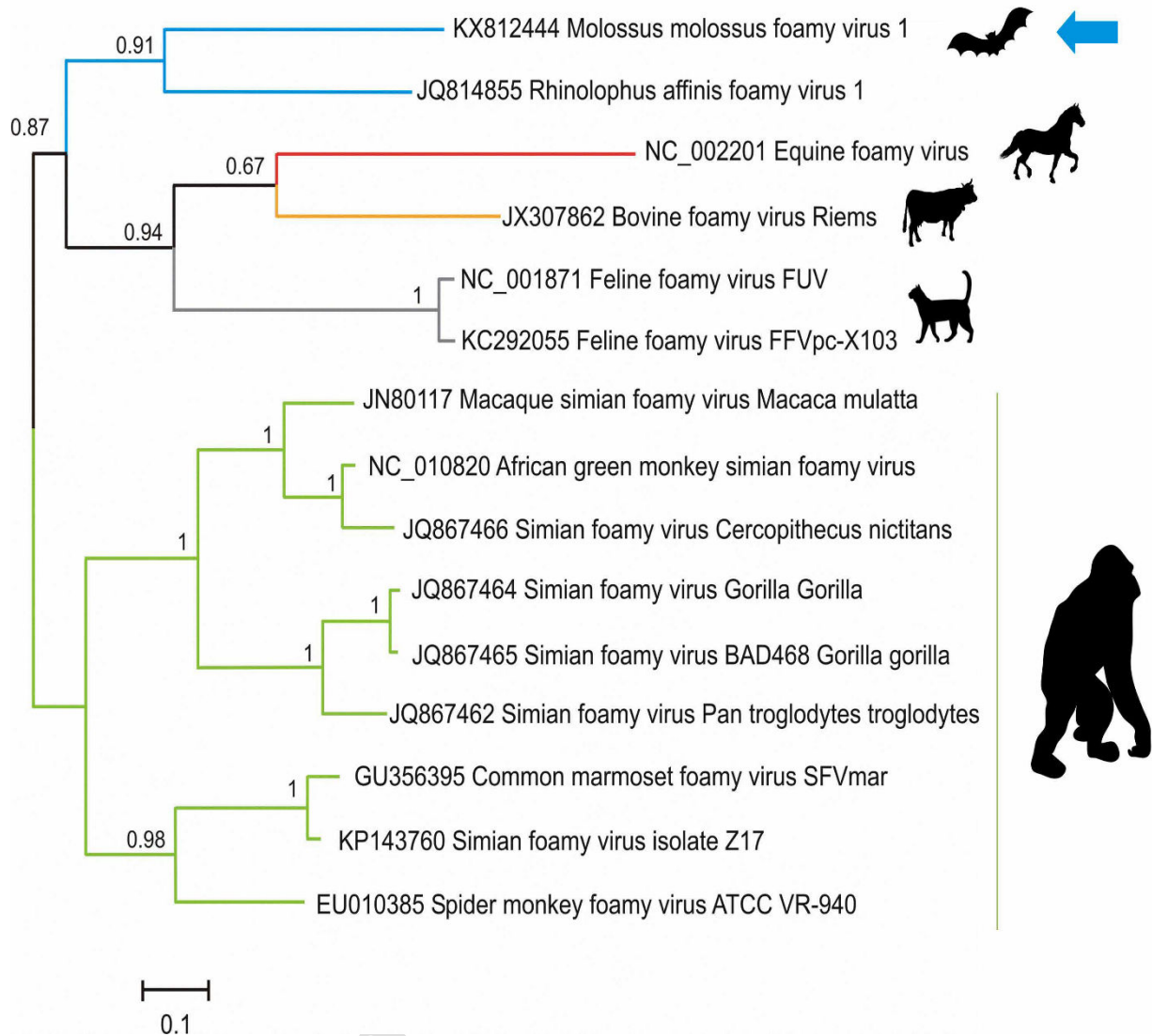
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496

Figure 3 Circular genome maps of five putative circoviruses directly recovered from metagenomic data of *M. molossus* and *D. rotundus* bat feces and their phylogenetic relationships with other representative members of the *Circoviridae* family. (A) The inversely arranged open-reading frames encoding the putative replication-associated protein (REP) and capsid protein (CAP) are shown in green and blue boxes, respectively. The genome organization was determined with GENEIOUS R9. (B) The phylogenetic analysis is based on the REP protein sequences (alignment of 109 amino acids). The blue arrows indicate the five REP sequences of bat-sourced circoviruses obtained in the present study. The tree was inferred using the Bayesian method with the blosum62 model. Sequence identifiers include the NCBI accession number and the isolate name. Posterior probabilities of the Bayesian analysis (>50%) are shown next to each node. The scale bar indicates amino acid substitutions per site. The color code of the branches represents the different orders of the hosts: *Chiroptera* in blue, *Primates* in green, *Artiodactyla* in orange. Birds were identified in yellow; insects and fish in black. Silhouettes represent the infected hosts.

A*Molossus molossus**Desmodus rotundus***B**

497 **Bat Foamyvirus**

498 Foamyviruses (FVs) constitute the unique genus of the *Spumaretrovirinae* subfamily, which
499 belongs to the *Retroviridae* family. They are highly prevalent in several animal species (e.g.,
500 cats, cows and horses and nonhuman primates) and currently six species have been described
501 in the genus. FVs are enveloped viruses that contain a 12-kb monopartite, linear and dimeric
502 positive ssRNA genome. All of the transmission routes have yet to be identified. Nevertheless,
503 evidence of cross-species transmission were reported [55,56]. A 312-nt-length fragment
504 (Genbank acc. nb.: KX812444), obtained with two contigs detected in the saliva sample of MU,
505 showed 54.88% and 48.48% nucleotide and amino acid identity, respectively, with the *pol* gene
506 of *Rhinolofus affinis foamy virus 1* (Genbank acc. nb.: JQ814855) isolated from a fecal sample
507 of Chinese bats [13]. Phylogenetic analysis revealed that the FV fragment identified in MU was
508 close to *Rhinolofus affinis foamy virus 1*, with a high posterior probability value of 0.91 (Fig. 4).
509 Bat FVs seem to share a common origin with equine, bovine and feline FVs. In addition, this
510 analysis shows that bat FVs are divergent from those infecting nonhuman primates.



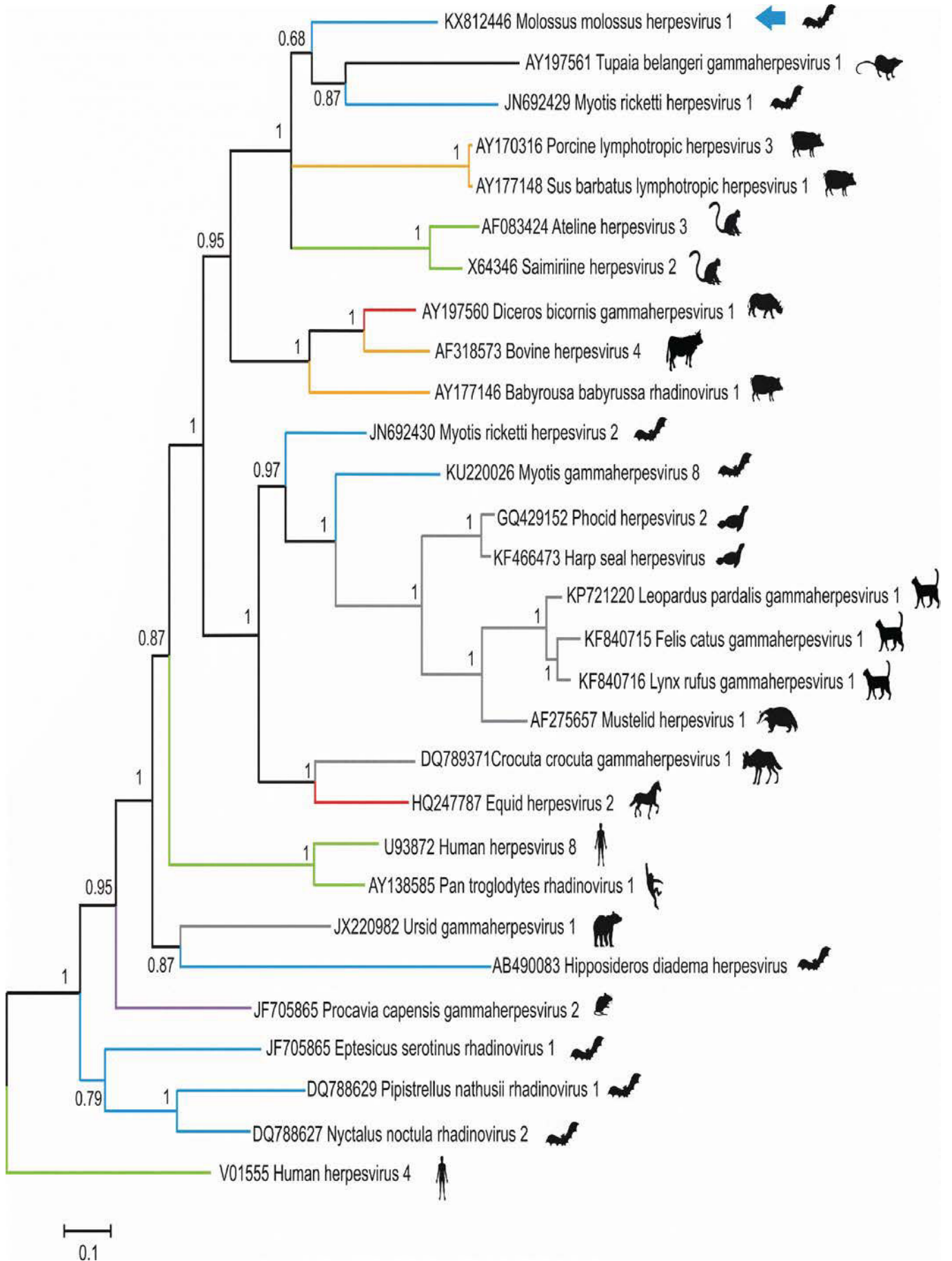
511 **Figure 4 Phylogenetic analysis of partial sequences of the *pol s* region (alignment of 107**
 512 **amino acids) directly obtained from the metagenomic data of pooled fecal samples of *M.***
 513 ***molossus* with other representative members of the *Foamyviridae* family. The tree was**
 514 **inferred using the Bayesian method with the WAG + G model. Sequence identifiers include the**
 515 **NCBI accession number and the isolate name. The blue arrows indicate the sequence of bat-**
 516 **sourced foamyvirus obtained in the present study. Posterior probabilities of the Bayesian**
 517 **analysis (>50%) are shown next to each node. The scale bar indicates amino acid substitutions**
 518 **per site. The color code of the branches represents the different orders of the hosts: *Chiroptera***
 519 **in blue, *Primates* in green, *Artiodactyla* in orange, *Perissodactyla* in red, *Carnivora* in grey.**
 520 **Silhouettes represent the infected hosts.**

521 **Bat Herpesvirus**

522 Mammalian herpesviruses (HVs) belong to the *Herpesviridae* family (order *Herpesvirales*).
523 HVs are organized in three subfamilies – *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* and
524 *Gammaherpesvirinae* – which each encompasses four to five genera. Their dsDNA genome of
525 120–240 kb contains internal and/or terminal reiterated sequences. HVs can infect a wide range
526 of hosts, including humans. Most of HV-related contigs were found in MF (saliva sample
527 essentially). We identified a 943 nt-length fragment covering the *DNA polymerase* gene
528 (Genbank acc. nb.: KX812446). This fragment displayed from 62.46% to 71.31% and from
529 68.93% to 80.58% nucleotide and amino acid identities, respectively, with other bat HVs. The
530 highest percentage of identity in amino acids was observed with *Myotis ricketti herpesvirus 1*
531 (Genbank acc. nb.: JN692429). Phylogenetic analysis showed that the HV identified in MF
532 belonged to the *Gammaherpesvirinae* subfamily and was related to the *Tupaia belangeri*
533 *gammaherpesvirus 1* and the *Myotis ricketti herpesvirus 1*, with a posterior probability of 0.68
534 (Fig. 5).

535

536 **Figure 5 Phylogenetic analysis of partial *pol* gene sequences (alignment of 951 nucleotides)**
537 **directly obtained from the metagenomic data of pooled fecal samples of *M. molossus* with**
538 **other representative members of the *Herpesviridae* family.** The tree was inferred using the
539 Bayesian method with the GTR + G + I model. Sequence identifiers include the NCBI accession
540 number and the isolate name. The blue arrows indicate the bat-sourced herpesvirus obtained in
541 the present study. Posterior probabilities of the Bayesian analysis (>50%) are shown next to
542 each node. The scale bar indicates amino acid substitutions per site. The color code of the
543 branches represents the different orders of the hosts: *Chiroptera* in blue, *Primates* in green,
544 *Artiodactyla* in orange, *Perissodactyla* in red, *Rodentia* in purple, *Carnivora* in grey,
545 *Scandentia* in black. Silhouettes represent the infected hosts.



547 **Bat Nairovirus**

548 The genus *Nairovirus* belongs to the family *Bunyaviridae*. This genus encompasses at least nine
549 serogroups, including the Crimean-Congo hemorrhagic fever serogroup. Nairoviruses (NVs)
550 are primarily tick-borne viruses capable of infecting different vertebrate hosts. The complete
551 genome of NVs consists of a ~20-kb-long negative-sense ssRNA divided into three segments
552 (large (L), medium (M) and small (S)) encoding the viral polymerase, the glycoproteins Gc and
553 Gn, and the nucleocapsid protein, respectively. Four contigs matching NVs were detected in
554 the stool sample of MU. The contigs covered 1 kb of segment L (Genbank acc. nb: KX821677)
555 and showed a 43% pairwise homology in amino acids with the RNA-dependent RNA
556 polymerase of the previously described *Rhinolophus pearsoni bunyavirus* (Genbank acc. nb.:
557 KC154063). Phylogenetic analysis revealed that the NV identified in MU clustered with
558 *Rhinolophus pearsoni bunyavirus*, with a posterior probability of 0.74 (Fig. 6). These NVs
559 share a common ancestor with mosquito NVs, with whom they clustered with a posterior
560 probability of 1.

561

562 **Figure 6 Phylogenetic analysis of partial RdRp protein sequences (alignment of 341 amino**
563 **acids) directly obtained from the metagenomic data of pooled fecal samples of *M. molossus***
564 **with other representative members of the *Bunyaviridae* family.** The tree was inferred using
565 the Bayesian method with the WAG + G model. Sequence identifiers include the NCBI
566 accession number and the isolate name. The blue arrows indicate the bat-sourced bunyavirus
567 sequence obtained in the present study. Posterior probabilities of the Bayesian analysis (>50%)
568 are shown next to each node. The scale bar indicates amino acid substitutions per site. The color
569 code of the branches represents the different orders of the hosts: *Chiroptera* in blue, *Rodentia*
570 in purple. Insects and plants in black. Silhouettes represent the infected hosts.

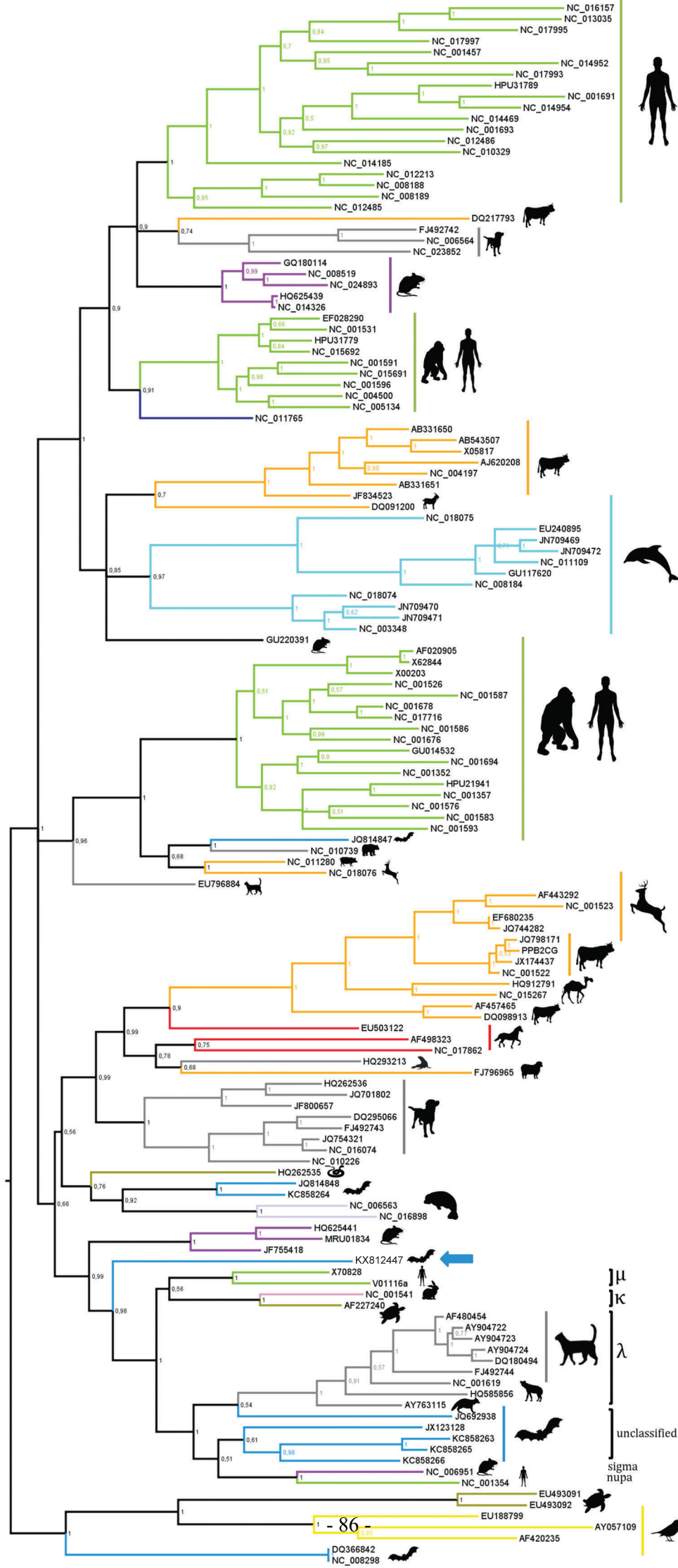
Peer Review

573 **Bat Papillomavirus**

574 *Papillomaviridae* are nonenveloped dsDNA viruses. The ~8-kb circular genome includes an
575 upstream regulatory region and up to eight reading frames named after their expression timing
576 that encode two classes of proteins. The early region encodes nonstructural regulatory proteins
577 (E1–E7) involved in the viral replication. The late region encodes the two capsid proteins, L1
578 and L2. Papillomaviruses (PVs) are usually asymptomatic and thought to be rarely transmitted
579 between species. Nevertheless, some PVs can induce malignant cell transformations,
580 accounting for a third of the infection-associated cancers in humans. Currently, 49 genera have
581 been identified in this family, including the most species-abundant genera
582 *Gammapapillomavirus*. In this study, a total of 235 PV-like contigs were detected in *M.*
583 *molossus* samples, with most of them identified in the stool sample of MF. The longest contig
584 obtained covered the entire genome of known PVs and was named MmoPV1 (Genbank acc.
585 nb.: KX812447). The genome of MmoPV1 was 7,869 bp in length with a 40% G+C content.
586 The MmoPV1 genome had the typical organization of PV ORFs (S3 Fig.). The phylogenetic
587 tree indicated that MmoPV1 possessed a basal position of a cluster of PVs encompassing mupa
588 PVs, kappa PVs, lambda PVs, sigma PVs, nupa PVs and novel unclassified bat PVs isolated
589 from *Miniopterus schreibersii* [12], *Eidolon helvum* (Germany), *Eptesicus serotinus* and
590 *Rhinolophus ferrumequinum* [57], with a high posterior probability value of 0.98 (Fig. 7).

591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610

Figure 7 Phylogenetic analysis of the complete L1 protein sequence (alignment of 459 amino acids) directly obtained from the metagenomic data of pooled fecal samples of *M. molossus* with other representative members of the *Papillomaviridae* family. The tree was inferred using the Bayesian method with the WAG + G model. Sequence identifiers include the NCBI accession number. The blue arrows indicate the bat-sourced papillomavirus sequence obtained in the present study. Posterior probabilities of the Bayesian analysis (>50%) are shown next to each node. The scale bar indicates amino acid substitutions per site. The color code of the branches represents the different orders of the hosts: *Chiroptera* in blue, *Primates* in green, *Artiodactyla* in orange, *Perissodactyla* in red, *Rodentia* in purple, *Carnivora* in grey. *Reptilia* were identified in khaki, *Cetacea* in turquoise, *Lagomorpha* in light pink, *Sirenia* in light purple. *Eulipotyphla* were identified in dark blue, birds in yellow. Silhouettes represent the infected hosts.



1 - 86 -

μ
 κ
 λ
 unclassified
 sigma
 nupa

611 **Discussion**

612 Bats host a wide spectrum of viruses capable of infecting a wide range of animals, plants, insects
613 and bacteria. Since the 1950s, 28 viral families including more than 50 genera have been
614 described in bats, using classical or next-generation approaches [58]. With the advent of new
615 generation technologies, the characterization of bat viromes and the discovery of distantly
616 related variants of known viruses and of new bat-borne viruses continue to increase rapidly.
617 The key purpose of the present work was to explore the viral composition of stool and saliva
618 samples of *D. rotundus* and *M. molossus* bat species, living in sympatry in diverse habitats
619 (forest and urban areas) in French Guiana, and to better understand the transmission dynamics
620 between hosts and pathogens. We sought to determine how the viral populations harbored differ
621 between bats segregated by species and environments.

622

623 **Global characterization of viral communities**

624 Overall, this study allowed us to identify 10,983 viral-associated contigs distributed within 48
625 known viral families of which 14 are known to infect mammals. New mammalian viruses were
626 discovered, adding knowledge on the bat-borne viral population. The proportion of eukaryote-
627 and bacteria-related sequences was low (less than 2% and 20%, respectively). About 0.30% of
628 total contigs were virus-related sequences, with significant divergences depending on the type
629 of sample, investigated species, and environment (S4 Table). Regardless of the species and the
630 environment studied, phage-related sequences represented a significant proportion of the viral-
631 associated sequences identified (S7 Table) and drove most of the diversity observed (Tables 1A
632 and 1C). Sequences related to the order *Caudovirales* and the *Microviridae* family were the
633 most frequent. Phage-related sequences detected in the guano accounted for most of this
634 proportion, as could be expected considering the type of sample. Despite the constant and rapid
635 expansion of existing databases, sequences lacking counterparts remained the largest part of the

636 data. These global results are in agreement with previous virome studies conducted on North
637 American and Eurasian bat species [8,9,11,12,14,15] and highlight the need to pursue
638 investigations and taxonomic assignments on microorganism communities. This means that
639 underestimation of the total number of bat-borne viruses present in the samples, including
640 highly divergent viruses, cannot be excluded. We found several novel mammalian viruses
641 related to the *Anelloviridae*, *Bunyaviridae*, *Circoviridae*, *Hepeviridae*, *Herpesviridae*,
642 *Retroviridae* and *Papillomaviridae* families. These viruses were closely related to viruses
643 isolated from Old World bat species [12,13,16,54,57,59]. Furthermore, most of the families
644 identified in Old World bat species were identified here, even for nonmammalian viruses. These
645 results, associated with previous studies, suggest that bats can be considered as effective
646 reservoirs and disseminators of these viruses. Moreover, where divergence could be expected
647 due to geographical isolation, we observed phylogenetic proximity between Old and New
648 World bat viruses in their respective continents, revealing the existence of common
649 evolutionary processes and supporting the long evolutionary hypothesis of bats and their viruses
650 [5].

651

652 **Bat viral diversity correlated to diet and environment**

653 Viral diversity in *M. molossus* was 1.7 times higher than that found in *D. rotundus*. This
654 suggests that a higher number of viruses passing through this species were likely related to
655 nondigested viruses associated with the dietary habits of their prey. Indeed, as highlighted in Li
656 et al., insect and plant viruses were mostly represented in the insectivorous species, while they
657 accounted for less than 5% in the vampire species [9]. The dietary habits of the vampire bat
658 might also be reflected in the high proportion of vertebrate-related viral sequences found.
659 However, strict assignment of these viruses is tricky and usually requires more information.
660 Likewise, the divergence observed in the distribution of phage-related viruses in the two species

661 investigated might be associated with the diets of the respective species and/or to their
662 phylogenetic position, *Molossidae* vs. *Phyllostomidae*. While *Podoviridae* species were the
663 most frequent in *D. rotundus*, whatever the environment, *Microviridae* species were the most
664 often represented in *M. molossus*. In bats, former studies highlighted a strong association
665 between the microbiota, host phylogeny, life history, physiology as well as locality [60,61].
666 Given that gut microbiota is known to be highly dependent on dietary habits, these results could
667 therefore reflect differences between the dietary habits of *D. rotundus* and *M. molossus* species.
668 This assumption is supported by the diversity of phage-, insect- and plant-related viruses found
669 depending on the environment in which the bats evolve, as well as by the differences observed
670 while comparing Shannon and Simpson diversities between species.

671
672 We discovered that environment also plays an important role in shaping the viral diversity
673 harbored by bats, in terms of viral family, genus and number of species. Indeed, comparison of
674 diversities between *M. molossus* individuals trapped either in urban (MU) or forest (MF) areas
675 revealed significant differences in terms of heterogeneity, distribution and abundance of contig
676 sequences. Although the number of viral families detected in MU and MF was equivalent, MU
677 presented a lower diversity of viral species as compared to MF. Differences were also observed
678 while considering the type of sample. The diversity found in fecal samples accounted for most
679 of the viral diversity and that found in saliva samples in MF was twice that found in MU. These
680 findings suggest more effective transmission cycles in the forest than in urban areas and a better
681 capacity of transmission through fecal drops. This also emphasizes the increased risk of viral
682 transmission and zoonosis outbreaks in forest areas when environmental perturbations occur.
683 Regarding eukaryote-related viral families, MU presented the lowest number of vertebrate-
684 related viral families. Focus on vertebrate viruses revealed that although MU displayed
685 characteristic viruses not detected in forest environments, they presented the lowest viral

686 diversity in terms of the species identified. These results support a former observation of higher
687 viral diversity in forest areas due to a higher prey diversity [62] and are in agreement with
688 previous results suggesting variations in viral distribution and abundance depending on the
689 environment [16].

690 Regarding *D. rotundus* individuals trapped either in CF or CM, both roosts located in forest
691 areas, we found no significant difference in vertebrate-related viral families while global
692 diversity was significantly different between the two samples. The same number of viral
693 families was detected but contrasting patterns of diversity and abundance were observed.
694 Overall, 19 out of the 25 viral families were the same between the two roosts. Furthermore, we
695 observed divergent results concerning Shannon and Simpson diversities in vertebrate-related
696 viral families. Indeed, Simpson diversity showed a significant difference in the distribution and
697 abundance of viral families, while Shannon diversity did not highlight differences. These results
698 suggest a roost-specific viral diversity dependent on the microenvironment as well as on feeding
699 strategies given that the divergent families corresponded to food-related viruses.

700
701 When we compared Shannon and Simpson diversities of bats evolving in forest areas, we
702 observed significant differences at the species and environment levels, implying that host
703 biological features and environmental pressures help shape viral diversity. However, when we
704 compared Shannon and Simpson diversity indices of vertebrate viruses for only the two bat
705 species evolving in the forest environment, we found no significant differences between DF
706 and MF, while DM significantly differed from both MF and DF (for the Simpson index only).
707 These results suggest that regardless of differences induced by the biological features of the
708 species investigated, their capacity to harbor and disseminate viruses infecting mammals seems
709 related to environmental constraints. However, taking into account the viral diversity observed
710 for DF and DM, population structure analysis at the species level and studies on interactions

711 with other bat species sharing a common habitat are needed to determine their respective role
712 in shaping viral diversity.

713

714 This study is the very first to explore the virome of two common Amazonian bat species, *M.*
715 *molossus* and *D. rotundus*, evolving in sympatry in French Guiana. This study provides
716 important insight into the *Chiroptera* stool and saliva viromes within contrasting environments.
717 It also highlights the preferred transmission routes of certain viruses, especially those capable
718 of infecting mammals, in the different communities of vampire and insectivorous bats
719 inhabiting this region. Indeed, whatever the species sampled, the highest viral diversity was
720 detected in the forest. This is likely due to a higher variety of prey and of other animals and
721 favored by more frequent contacts between specimens. Moreover, the important viral diversity
722 identified in stool samples underlines the role of fecal drops in viral transmission cycles.

723 To fully understand how viral diversity is shaped in *D. rotundus* and *M. molossus*, further
724 characterization of their geographic range, foraging-induced interactions, distribution shape and
725 gregariousness will be necessary. Indeed, larger geographic ranges encompass greater diversity
726 of ecosystems/environments, which could lead to a spatial population substructure [63]. The
727 overlapping distribution of reservoirs and recipient hosts, the social complexity of bats as well
728 as species-specific evolutionary and life-history traits are known as predictors of viral richness
729 in wildlife [4,63]. Likewise, the contact and proximity between individuals influence the
730 presence, abundance and diversity of the pathogens harbored. Consequently, deciphering the
731 virome of bats should consider the size of the whole community of bats, the genetic structure
732 of populations in a given environment and the rates of interactions among them, all parameters
733 contributing to the viral diversity observed for *Chiroptera*.

734

735 **Acknowledgments**

736 We acknowledge François Catzefflis and Marguerite Delaval for useful discussions on the
737 biology, ecology and dynamics of bats. All field volunteers and owners and/or managers of
738 capture sites are warmly acknowledged for their assistance in captures. We thank the INDA
739 and C3BI teams at the Institut Pasteur and UMR BIOGECO for their technical support and
740 access to the clusters. We thank L. Ma and M. Tichit for technical assistance.

741

742

743 **References**

- 744 1. Moratelli R, Calisher CH. Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with
745 emerging deadly viruses? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2015;110: 1–22.
746 doi:10.1590/0074-02760150048
- 747 2. Olival KJ, Weekley CC, Daszak P. Are bats really “special” as viral reservoirs? What we
748 know and need to know. In: Wang L-F, Cowled C, editors. *Bats and Viruses: A New
749 Frontier of Emerging Infectious Diseases*. New Jersey: Wiley; 2015.
- 750 3. Brook CE, Dobson AP. Bats as “special” reservoirs for emerging zoonotic pathogens.
751 *Trends in Microbiology*. 2015;23: 172–180. doi:10.1016/j.tim.2014.12.004
- 752 4. Plowright RK, Eby P, Hudson PJ, Smith IL, Westcott D, Bryden WL, et al. Ecological
753 dynamics of emerging bat virus spillover. *Proceedings of the Royal Society B: Biological
754 Sciences*. 2014;282: 20142124–20142124. doi:10.1098/rspb.2014.2124
- 755 5. Schneeberger K, Voigt CC. Zoonotic Viruses and Conservation of Bats. In: Voigt CC,
756 Kingston T, editors. *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World*.
757 Cham: Springer International Publishing; 2016. pp. 263–292. Available:
758 http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-25220-9_10

- 759 6. Smith I, Wang L-F. Bats and their virome: an important source of emerging viruses
760 capable of infecting humans. *Current Opinion in Virology*. 2013;3: 84–91.
761 doi:10.1016/j.coviro.2012.11.006
- 762 7. Hall RJ, Draper JL, Nielsen FGG, Dutilh BE. Beyond research: a primer for considerations
763 on using viral metagenomics in the field and clinic. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6.
764 doi:10.3389/fmicb.2015.00224
- 765 8. Donaldson EF, Haskew AN, Gates JE, Huynh J, Moore CJ, Frieman MB. Metagenomic
766 Analysis of the Viromes of Three North American Bat Species: Viral Diversity among
767 Different Bat Species That Share a Common Habitat. *Journal of Virology*. 2010;84:
768 13004–13018. doi:10.1128/JVI.01255-10
- 769 9. Li L, Victoria JG, Wang C, Jones M, Fellers GM, Kunz TH, et al. Bat Guano Virome:
770 Predominance of Dietary Viruses from Insects and Plants plus Novel Mammalian Viruses.
771 *Journal of Virology*. 2010;84: 6955–6965. doi:10.1128/JVI.00501-10
- 772 10. Canuti M, Eis-Huebinger AM, Deijns M, de Vries M, Drexler JF, Oppong SK, et al. Two
773 Novel Parvoviruses in Frugivorous New and Old World Bats. Vartanian J-P, editor. *PLoS*
774 *ONE*. 2011;6: e29140. doi:10.1371/journal.pone.0029140
- 775 11. Ge X, Li Y, Yang X, Zhang H, Zhou P, Zhang Y, et al. Metagenomic Analysis of Viruses
776 from Bat Fecal Samples Reveals Many Novel Viruses in Insectivorous Bats in China.
777 *Journal of Virology*. 2012;86: 4620–4630. doi:10.1128/JVI.06671-11
- 778 12. Tse H, Tsang AKL, Tsoi H-W, Leung ASP, Ho C-C, Lau SKP, et al. Identification of a
779 Novel Bat Papillomavirus by Metagenomics. Davis T, editor. *PLoS ONE*. 2012;7: e43986.
780 doi:10.1371/journal.pone.0043986
- 781 13. Wu Z, Ren X, Yang L, Hu Y, Yang J, He G, et al. Virome Analysis for Identification of
782 Novel Mammalian Viruses in Bat Species from Chinese Provinces. *Journal of Virology*.
783 2012;86: 10999–11012. doi:10.1128/JVI.01394-12

- 784 14. He B, Li Z, Yang F, Zheng J, Feng Y, Guo H, et al. Virome Profiling of Bats from
785 Myanmar by Metagenomic Analysis of Tissue Samples Reveals More Novel Mammalian
786 Viruses. Tse H, editor. PLoS ONE. 2013;8: e61950. doi:10.1371/journal.pone.0061950
- 787 15. Dacheux L, Cervantes-Gonzalez M, Guigon G, Thiberge J-M, Vandebogaert M,
788 Maufrais C, et al. A Preliminary Study of Viral Metagenomics of French Bat Species in
789 Contact with Humans: Identification of New Mammalian Viruses. Tse H, editor. PLoS
790 ONE. 2014;9: e87194. doi:10.1371/journal.pone.0087194
- 791 16. Wu Z, Yang L, Ren X, He G, Zhang J, Yang J, et al. Deciphering the bat virome catalog
792 to better understand the ecological diversity of bat viruses and the bat origin of emerging
793 infectious diseases. The ISME journal. 2015; Available:
794 <http://www.nature.com/ismej/journal/vaop/ncurrent/full/ismej2015138a.html>
- 795 17. Cibulski SP, Teixeira TF, Lima FE de S, Santos HF do, Franco AC, Roehe PM. A Novel
796 Anelloviridae Species Detected in *Tadarida brasiliensis* Bats: First Sequence of a
797 Chiropteran Anellovirus. Genome Announc. 2014;2: e01028-14.
798 doi:10.1128/genomeA.01028-14
- 799 18. Lima FE de S, Cibulski SP, Santos HF dos, Teixeira TF, Varela APM, Roehe PM, et al.
800 Genomic Characterization of Novel Circular ssDNA Viruses from Insectivorous Bats in
801 Southern Brazil. PLOS ONE. 2015;10: e0118070. doi:10.1371/journal.pone.0118070
- 802 19. Lima FE de S, Cibulski SP, Dall Bello AG, Mayer FQ, Witt AA, Roehe PM, et al. A Novel
803 Chiropteran Circovirus Genome Recovered from a Brazilian Insectivorous Bat Species.
804 Genome Announcements. 2015;3: e01393-15. doi:10.1128/genomeA.01393-15
- 805 20. Lima FE de S, Cibulski SP, Witt AA, Franco AC, Roehe PM. Genomic characterization
806 of two novel polyomaviruses in Brazilian insectivorous bats. Arch Virol. 2015;160: 1831–
807 1836. doi:10.1007/s00705-015-2447-6

- 808 21. Catzefflis F. Liste des Mammifères de Guyane française (octobre 2015). 2015; Available:
809 http://www.kwata.net/medias/images/upload/MAMM-GUYANE_Catzefflis-oct2015.pdf
- 810 22. Brosset A, Charles-Dominique P, Cockle A, Cosson J-F, Masson D. Bat communities and
811 deforestation in French Guiana. *Can J Zool.* 1996;74: 1974–1982. doi:10.1139/z96-224
- 812 23. Delaval M, Charles-Dominique P. Edge effects on frugivorous and nectarivorous bat
813 communities in a neotropical primary forest in French Guiana. *Revue d'écologie.* 2006;61:
814 343–352.
- 815 24. Jung K, Threlfall CG. Urbanisation and Its Effects on Bats—A Global Meta-Analysis. In:
816 Voigt CC, Kingston T, editors. *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a*
817 *Changing World.* Cham: Springer International Publishing; 2016. pp. 13–33. Available:
818 http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-25220-9_2
- 819 25. de Thoisy B, Bourhy H, Delaval M, Pontier D, Dacheux L, Darcissac E, et al.
820 Bioecological drivers of rabies virus circulation in a Neotropical bat community. Kasper
821 M, editor. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2016;10: e0004378.
822 doi:10.1371/journal.pntd.0004378
- 823 26. Zellweger F, Baltensweiler A, Ginzler C, Roth T, Braunisch V, Bugmann H, et al.
824 Environmental predictors of species richness in forest landscapes: abiotic factors versus
825 vegetation structure. *J Biogeogr.* 2016; n/a-n/a. doi:10.1111/jbi.12696
- 826 27. Kamiya T, O'Dwyer K, Nakagawa S, Poulin R. Host diversity drives parasite diversity:
827 meta-analytical insights into patterns and causal mechanisms. *Ecography.* 2014;37: 689–
828 697. doi:10.1111/j.1600-0587.2013.00571.x
- 829 28. Sikes RS, Gannon WL. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use
830 of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy.* 2011;92: 235–253. doi:10.1644/10-
831 MAMM-F-355.1

- 832 29. Victoria JG, Kapoor A, Li L, Blinkova O, Slikas B, Wang C, et al. Metagenomic Analyses
833 of Viruses in Stool Samples from Children with Acute Flaccid Paralysis. *Journal of*
834 *Virology*. 2009;83: 4642–4651. doi:10.1128/JVI.02301-08
- 835 30. Prescott LM, Sherwood LM, Woolverton CJ. Les virus : introduction et caractères
836 généraux. *Microbiologie*. De Boeck Supérieur; 2010.
- 837 31. Allander T, Emerson SU, Engle RE, Purcell RH, Bukh J. A virus discovery method
838 incorporating DNase treatment and its application to the identification of two bovine
839 parvovirus species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98: 11609–
840 11614.
- 841 32. Berthet N, Reinhardt AK, Leclercq I, van Ooyen S, Batéjat C, Dickinson P, et al. Phi29
842 polymerase based random amplification of viral RNA as an alternative to random RT-
843 PCR. *BMC Molecular Biology*. 2008;9: 77. doi:10.1186/1471-2199-9-77
- 844 33. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence
845 data. *Bioinformatics*. 2014;30: 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
- 846 34. Brown CT, Howe A, Zhang Q, Pyrkosz AB, Brom TH. A Reference-Free Algorithm for
847 Computational Normalization of Shotgun Sequencing Data. arXiv:12034802 [q-bio].
848 2012; Available: <http://arxiv.org/abs/1203.4802>
- 849 35. Crusoe MR, Alameldin HF, Awad S, Boucher E, Caldwell A, Cartwright R, et al. The
850 khmer software package: enabling efficient nucleotide sequence analysis. *F1000Research*.
851 2015; doi:10.12688/f1000research.6924.1
- 852 36. Baker KS, Leggett RM, Bexfield NH, Alston M, Daly G, Todd S, et al. Metagenomic
853 study of the viruses of African straw-coloured fruit bats: Detection of a chiropteran
854 poxvirus and isolation of a novel adenovirus. *Virology*. 2013;441: 95–106.
855 doi:10.1016/j.virol.2013.03.014

- 856 37. Zerbino DR, Birney E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn
857 graphs. *Genome research*. 2008;18: 821–829.
- 858 38. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes:
859 A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing.
860 *Journal of Computational Biology*. 2012;19: 455–477. doi:10.1089/cmb.2012.0021
- 861 39. Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*.
862 2010;26: 2460–2461. doi:10.1093/bioinformatics/btq461
- 863 40. Shannon C, Weaver W. *The Mathematical Theory of Information*. University of Illinois
864 Press; 1949.
- 865 41. Pielou E. *Ecology diversity*. J Wiley and Sons, New York. 1975;
- 866 42. Simpson EH. Measurement of Diversity. *Nature*. 1949;163: 688. doi:10.1038/163688a0
- 867 43. Smith B, Wilson JB. A Consumer's Guide to Evenness Indices. *Oikos*. 1996;76: 70–82.
868 doi:10.2307/3545749
- 869 44. Krebs CJ. *Ecological Methodology*. 2 edition. Menlo Park, Calif: Benjamin Cummings;
870 1998.
- 871 45. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological Statistics Software Package
872 for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*. 2001;4: 1–9.
- 873 46. Greenacre MJ. *Theory and applications of correspondence analysis* [Internet]. 1984.
874 Available: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=368212>
- 875 47. R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. [Internet].
876 Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2013. Available:
877 <https://www.R-project.org/>
- 878 48. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. Geneious
879 Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and

- 880 analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 2012;28: 1647–1649.
881 doi:10.1093/bioinformatics/bts199
- 882 49. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple
883 sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucl Acids Res*. 2002;30: 3059–
884 3066. doi:10.1093/nar/gkf436
- 885 50. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics
886 and parallel computing. *Nat Meth*. 2012;9: 772–772. doi:10.1038/nmeth.2109
- 887 51. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. ProtTest 3: fast selection of best-fit models
888 of protein evolution. *Bioinformatics*. 2011;27: 1164–1165.
889 doi:10.1093/bioinformatics/btr088
- 890 52. Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed
891 models. *Bioinformatics*. 2003;19: 1572–1574. doi:10.1093/bioinformatics/btg180
- 892 53. Li L, Kapoor A, Slikas B, Bamidele OS, Wang C, Shaukat S, et al. Multiple Diverse
893 Circoviruses Infect Farm Animals and Are Commonly Found in Human and Chimpanzee
894 Feces. *Journal of Virology*. 2010;84: 1674–1682. doi:10.1128/JVI.02109-09
- 895 54. Ge X, Li J, Peng C, Wu L, Yang X, Wu Y, et al. Genetic diversity of novel circular ssDNA
896 viruses in bats in China. *Journal of General Virology*. 2011;92: 2646–2653.
897 doi:10.1099/vir.0.034108-0
- 898 55. Mouinga-Ondémé A, Betsem E, Caron M, Makuwa M, Sallé B, Renault N, et al. Two
899 distinct variants of simian foamy virus in naturally infected mandrills (*Mandrillus sphinx*)
900 and cross-species transmission to humans. *Retrovirology*. 2010;7: 1.
- 901 56. Mouinga-Ondémé A, Caron M, Nkoghé D, Telfer P, Marx P, Saïb A, et al. Cross-Species
902 Transmission of Simian Foamy Virus to Humans in Rural Gabon, Central Africa. *J Virol*.
903 2012;86: 1255–1260. doi:10.1128/JVI.06016-11

- 904 57. García-Pérez R, Ibáñez C, Godínez JM, Aréchiga N, Garin I, Pérez-Suárez G, et al. Novel
905 Papillomaviruses in Free-Ranging Iberian Bats: No Virus–Host Co-evolution, No Strict
906 Host Specificity, and Hints for Recombination. *Genome Biol Evol.* 2014;6: 94–104.
907 doi:10.1093/gbe/evt211
- 908 58. Calisher CH. Viruses in bats: a historic review. In: Wang L-F, Cowled C, editors. *Bats
909 and Viruses: A New Frontier of Emerging Infectious Diseases.* 2015. p. 23.
- 910 59. Drexler JF, Seelen A, Corman VM, Tateno AF, Cottontail V, Zerbinati RM, et al. Bats
911 Worldwide Carry Hepatitis E Virus-Related Viruses That Form a Putative Novel Genus
912 within the Family Hepeviridae. *J Virol.* 2012;86: 9134–9147. doi:10.1128/JVI.00800-12
- 913 60. Phillips CD, Phelan G, Dowd SE, McDONOUGH MM, Ferguson AW, Delton Hanson J,
914 et al. Microbiome analysis among bats describes influences of host phylogeny, life history,
915 physiology and geography. *Molecular Ecology.* 2012;21: 2617–2627. doi:10.1111/j.1365-
916 294X.2012.05568.x
- 917 61. Carrillo-Araujo M, Taş N, Alcántara-Hernández RJ, Gaona O, Schondube JE, Medellín
918 RA, et al. Phyllostomid bat microbiome composition is associated to host phylogeny and
919 feeding strategies. *Front Microbiol.* 2015;6: 447. doi:10.3389/fmicb.2015.00447
- 920 62. Gay N, Olival KJ, Bumrungsri S, Siriaronrat B, Bourgarel M, Morand S. Parasite and
921 viral species richness of Southeast Asian bats: Fragmentation of area distribution matters.
922 *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife.* 2014;3: 161–170.
923 doi:10.1016/j.ijppaw.2014.06.003
- 924 63. Turmelle AS, Olival KJ. Correlates of Viral Richness in Bats (Order Chiroptera).
925 *EcoHealth.* 2009;6: 522–539. doi:10.1007/s10393-009-0263-8
926
927

928 Supporting information

929 **Table S1. Characteristics of the sampling sites and number of collected samples of swabs and saliva for**
 930 ***Molossus molossus* and *Desmodus rotundus*.**

Species	Sampling site	Code	Environment	GPS coordinates		Trapping		Total	Pools
				Latitude (N)	Longitude (W)	<i>n</i> Saliva swabs†	<i>n</i> Fecals		
<i>M. molossus</i>	Cacao	CC	Urban	4° 34' 33.771"	52° 28' 4.926"	18		18	MUS+MUF
	La Chaumière	CH	Urban	4° 53' 5.419"	52° 21' 4.124"	12	5	17	
	Paracou	PA	Forest	5° 14' 21.282"	52° 55' 24.218"	17	4	21	MFS+MFF
	Saut Athanase	SA	Forest	4° 11' 14.706"	52° 19' 11.21"	41	10	51	
	Total					88	19	107	
<i>D. rotundus</i>	Cave F	CF	Forest	4° 38' 59.144"	52° 17' 35.441"		75	75	DFF
	Cave M	CM	Forest	4° 32' 6.82"	52° 9' 6.239"	50	66	116	DMS+DMF
	Total					50	141	191	

931 Code, see Figure 1. † Number of individuals sampled. MUS: *M. molossus* urban saliva sample; MUF: *M. molossus* urban fecal
 932 sample; MFS: *M. molossus* forest saliva sample; MFF: *M. molossus* forest fecal sample; DFF: *D. rotundus* CF fecal sample;
 933 DMS: *D. rotundus* CM saliva sample; DMF: *D. rotundus* CM fecal sample.

934

935

936 **Table S2. Read data processing and reduction steps.**

Species	Sample	ID	<i>n</i>	Data reduction steps		
				<i>raw</i>	<i>ndn</i>	<i>dn</i>
<i>D. rotundus</i>	DF	DF	75	7 752 462	2 536 419	903 760
	DMS	DM	50	8 820 103	948 448	283 641
	DMF		66	3 419 472	2 227 250	1 174 147
<i>M. molossus</i>	MFS	MF	58	9 642 567	1 741 389	718 421
	MFF		14	7 683 786	1 318 143	606 678
	MUS	MU	30	8 206 846	555 174	145 005
	MUF		5	7 800 358	1 012 929	285 892
	Total		298	53 325 594	10 339 752	4 117 544

937 The number of samples (*n*), the number of raw reads obtained (*raw*), the total number of reads after trimming and cleaning
 938 (*ndn*) and the number of reads after digital normalization (*dn*) are given per sample. MUS: *M. molossus* urban saliva sample;
 939 MUF: *M. molossus* urban fecal sample; MFS: *M. molossus* forest saliva sample; MFF: *M. molossus* forest fecal sample; DFF:
 940 *D. rotundus* CF fecal sample; DMS: *D. rotundus* CM saliva sample; DMF: *D. rotundus* CM fecal sample.

941

942 **Table S3. *de novo* assembly of processed read data comparison 1 between k-mers.**

Species	Sample	ID	Assembler	<i>ndn</i>	<i>ndn</i> ctds 1	<i>ndn</i> % saved	<i>dn</i>	<i>dn</i> ctds 1	<i>dn</i> % saved
<i>D. rotundus</i>	DF	DF	SPAdes	906 221	502 668	55.47	857 888	487 271	56.80
			Velvet	830 383	455 449	54.85	760 331	447 250	58.82
	DMF	DM	SPAdes	1 563 094	893 042	57.13	1 487 086	864 105	58.11
			Velvet	1 780 403	980 990	55.10	1 674 112	902 296	53.90
	DMS	DM	SPAdes	177 600	89 194	50.22	159 413	82 626	51.83
			Velvet	154 256	78 787	51.08	139 110	77 069	55.40
<i>M. molossus</i>	MFF	MF	SPAdes	622 208	364 291	58.55	594 271	354 777	59.70
			Velvet	866 316	483 006	55.75	826 353	475 251	57.51
	MFS	MF	SPAdes	680 049	402 036	59.12	652 835	392 165	60.07
			Velvet	706 568	389 182	55.08	491 700	313 242	63.71
	MUF	MU	SPAdes	138 947	76 737	55.23	124 906	71 236	57.03
			Velvet	106 053	67 958	64.08	92 011	62 257	67.66
	MUS	MU	SPAdes	80 184	44 642	55.67	72 344	40 609	56.13
			Velvet	68 872	35 497	51.54	61 178	34 524	56.43

943 Contigs generated using the k-mers 21, 55 and 99 were pooled (contigs generated from *ndn*, nondigitally normalized reads and
944 *dn*, digitally normalized reads). The total number of contigs retained after removal of duplicates and clustering with a threshold
945 identity value of 95% (*ndn* ctds 1 and *dn* ctds 1) as well as the percentage of data saved are given for each data set and each
946 assembler (SPAdes and Velvet). MUS: *M. molossus* urban saliva sample; MUF: *M. molossus* urban fecal sample; MFS: *M.*
947 *molossus* forest saliva sample; MFF: *M. molossus* forest fecal sample; DFF: *D. rotundus* CF fecal sample; DMS: *D. rotundus*
948 CM saliva sample; DMF: *D. rotundus* CM fecal sample.

949

950

951 **Table S4. *de novo* assembly of processed read data, comparison 2 between SPAdes and Velvet assemblers.**

Species	Sample	ID	Assembler	<i>ndn</i> ctds 1	<i>ndn</i> ctds 2	<i>ndn</i> % saved	<i>dn</i> ctds 1	<i>dn</i> ctds 2	<i>dn</i> % saved
<i>D. rotundus</i>	DF	DF	SPAdes + Velvet	958 117	669 997	69.93	934 521	653 908	69.97
	DMF	DM	SPAdes + Velvet	1 874 032	1 323 490	70.62	1 766 401	1 263 098	71.51
	DMS		SPAdes + Velvet	167 981	117 914	70.19	159 695	113 587	71.13
<i>M. molossus</i>	MFF	MF	SPAdes + Velvet	847 297	594 618	70.18	830 028	581 658	70.08
	MFS		SPAdes + Velvet	791 218	538 768	68.09	705 407	503 908	71.44
	MUF	MU	SPAdes + Velvet	144 695	105 896	73.19	133 493	97 325	72.91
	MUS		SPAdes + Velvet	80 139	55 373	69.10	75 133	52 067	69.30

952 Contigs retained from comparison 1 were pooled (*ndn* ctds 1 and *dn* ctds 1). The number of contigs retained after removal of
953 duplicates and clustering with a 95% threshold identity value (*ndn* ctds 2 and *dn* ctds 2) as well as the percentage of data saved
954 are given for each data set. MUS: *M. molossus* urban saliva sample; MUF: *M. molossus* urban fecal sample; MFS: *M. molossus*
955 forest saliva sample; MFF: *M. molossus* forest fecal sample; DFF: *D. rotundus* CF fecal sample; DMS: *D. rotundus* CM saliva
956 sample; DMF: *D. rotundus* CM fecal sample.

957

958 **Table S5. *de novo* assembly of processed read data, comparison 3 between contigs generated with digitally**
 959 **normalized and nondigitally normalized reads.**

Species	Sample	ID	<i>ndn + dn</i> (ctds 2)	Centroids	% saved
<i>D. rotundus</i>	DFE	DF	1 323 905	669 997	50.61
	DMF	DM	2 586 588	1 323 490	51.17
	DMS		231 501	117 914	50.93
<i>M. molossus</i>	MFF	MF	1 176 276	648 927	55.17
	MFS		1 042 676	569 059	54.58
	MUF	MU	203 221	114 421	56.30
	MUS		107 440	59 544	55.42

960 Contigs retained from comparison 2 were pooled (*ndn + dn* (ctds 2)). The number of contigs retained after removal of
 961 duplicates and clustering with a 95% threshold identity value (**centroids**) as well as the percentage of data saved are given for
 962 each data set. MUS: *M. molossus* urban saliva sample; MUF: *M. molossus* urban fecal sample; MFS: *M. molossus* forest saliva
 963 sample; MFF: *M. molossus* forest fecal sample; DFE: *D. rotundus* CF fecal sample; DMS: *D. rotundus* CM saliva sample;
 964 DMF: *D. rotundus* CM fecal sample.

965

966

967 **Table S6. Sequential BLAST comparisons.**

Species	Sample	ID	<i>n</i>	Centroids	BLAST match							
					<i>Eukaryota</i> *		<i>Bacteria</i> *		<i>Virus</i>		No hit*	
<i>D. rotundus</i>	DFE		75	725 786	5 017	(0.69%)	235	(4.68%)	1 929	(0.27%)	718 605	(99.01%)
	DMS	DM	50	134 319	1 237	(0.92%)	243	(19.64%)	40	(0.03%)	132 799	(98.87%)
	DMF		66	1 470 163	25 574	(1.74%)	192	(0.75%)	2 551	(0.17%)	1 441 846	(98.07%)
<i>M. molossus</i>	MFS	MF	58	569 059	2 126	(0.37%)	114	(5.36%)	729	(0.13%)	566 090	(99.48%)
	MFF		14	648 927	2 660	(0.41%)	488	(18.35%)	3 039	(0.47%)	642 740	(99.05%)
	MUS	MU	30	59 544	1 010	(1.70%)	113	(11.19%)	8	(0.01%)	58 413	(98.10%)
	MUF		5	114 421	464	(0.41%)	70	(15.09%)	2 687	(2.35%)	111 200	(97.18%)
		Total		298	3 722 219	38 088	(1.02%)	1 455	(3.82%)	10 983	(0.30%)	3 671 692

968 The number of samples collected (*n*), contigs retained from comparison 3 (**centroids**), the number of contigs matching
 969 *Eukaryota*, *Bacteria* and *Virus*, as well as the total number of negative contigs (**no hit**) on both nucleotide and protein
 970 homology searches, are given for each data set. The representative percentage of each taxonomic group from the centroids is
 971 given in parentheses for each data set.

972

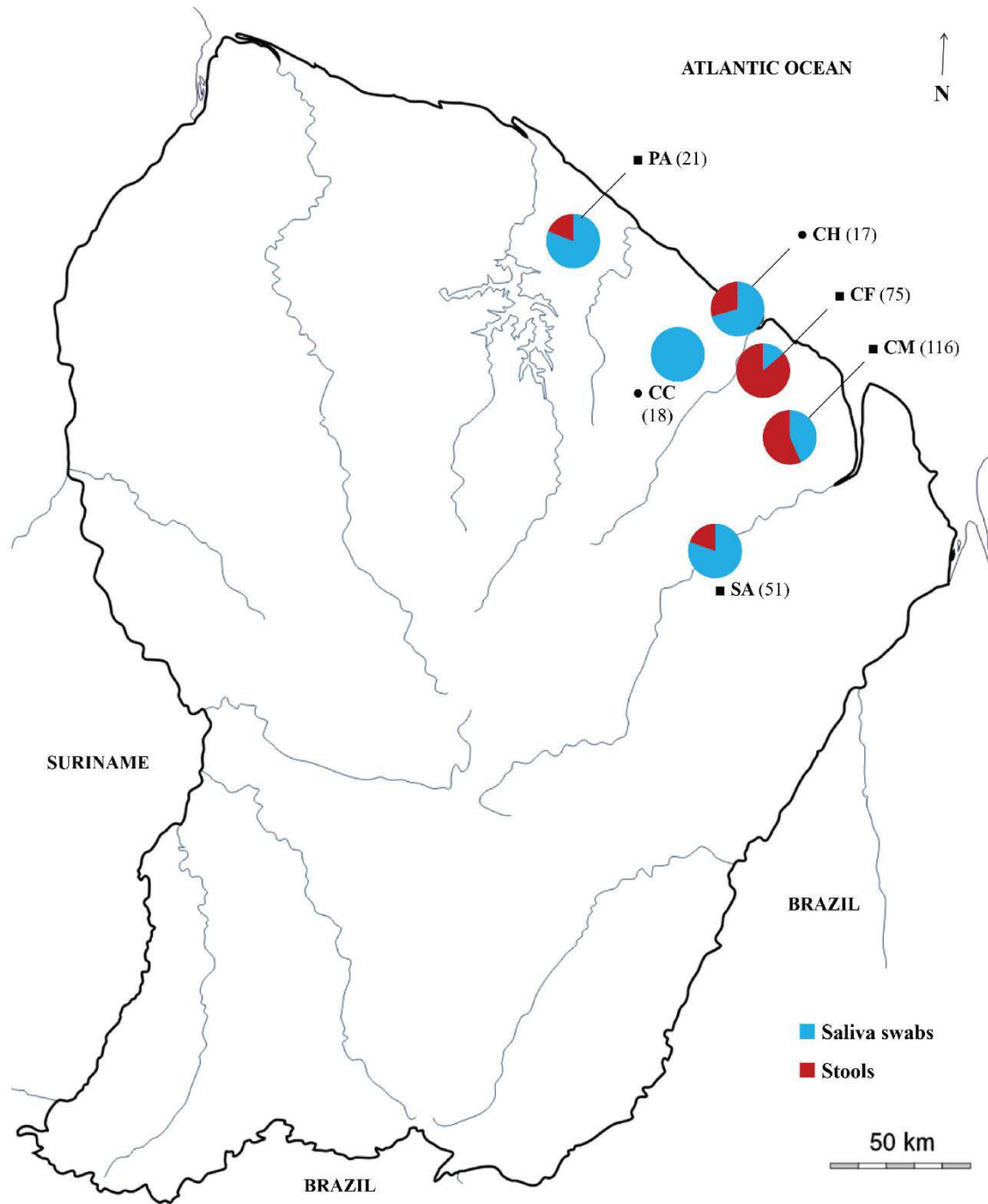
973 **Table S7. Contingency table of the viral families identified in *D. rotundus* and *M. molossus*.**

Group	Family	Natural hosts	<i>D. rotundus</i>		<i>M. molossus</i>		Total
			Cave F	Cave M	Urban	Forest	
dsDNA	<i>Baculoviridae</i>	Insects		3	1	4	8
dsDNA	<i>Iridoviridae</i>	Insects	1	3	57	4	65
dsDNA	<i>Nimaviridae</i>	Insects				4	4
dsDNA	<i>Nudiviridae</i>	Insects		1		1	2
dsDNA	<i>Polydnaviridae</i>	Insects				6	6
dsDNA	<i>Poxviridae</i>	Insects				3	3
ssDNA	<i>Parvoviridae</i>	Insects			28	140	168
ssRNA(+)	<i>Alphatetraviridae</i>	Insects			20	2	22
ssRNA(+)	<i>Carmotetraviridae</i>	Insects				1	1
ssRNA(+)	<i>Dicistroviridae</i>	Insects			394	77	471
ssRNA(+)	<i>Iflaviridae</i>	Insects	2	2	32	10	46
ssRNA(+)	<i>Mesoniviridae</i>	Insects			2		2
ssRNA(+)	<i>Nodaviridae</i>	Insects			105	62	167
ssRNA(+)	<i>Permutotetraviridae</i>	Insects			2		2
Unclassified	Dragonfly-associated	Insects	11	4	15	19	49
dsDNA	<i>Lipothrixviridae</i>	Phages	1				1
dsDNA	<i>Myoviridae</i> *	Phages	211	285	2	55	553
dsDNA	<i>Podoviridae</i> *	Phages	431	765	15	367	1.578
dsDNA	<i>Siphoviridae</i> *	Phages	282	170	5	74	531
dsDNA	<i>Tectiviridae</i>	Phages	7	3			10
ssDNA	<i>Inoviridae</i>	Phages	39	1	1	3	44
ssDNA	<i>Microviridae</i>	Phages	132	196	1.402	1.472	3.202
ssRNA(+)	<i>Leviviridae</i>	Phages			3		3
Unclassified	Uncultured	Phages	27				27
dsDNA	<i>Phycodnaviridae</i>	Plants	6	2	7	9	24
dsRNA	<i>Partitiviridae</i>	Plants			17		17
dsRNA	<i>Totiviridae</i>	Plants				2	2
ssDNA	<i>Geminiviridae</i>	Plants	8	8	7	27	50
ssDNA	<i>Nanoviridae</i>	Plants	3	1	2		6
ssRNA(-)	<i>Rhabdoviridae</i>	Plants			2	2	4
ssRNA(+)	<i>Bromoviridae</i>	Plants			5		5
ssRNA(+)	<i>Closteroviridae</i>	Plants			1		1
ssRNA(+)	<i>Luteoviridae</i>	Plants			9	2	11
ssRNA(+)	Not assigned	Plants			32	17	49
ssRNA(+)	<i>Potyviridae</i>	Plants		1		1	2
ssRNA(+)	<i>Secoviridae</i>	Plants			2		2
ssRNA(+)	<i>Tombusviridae</i>	Plants				2	2
ssRNA(+)	<i>Tymoviridae</i>	Plants			1	7	8
ssRNA(+)	<i>Virgaviridae</i>	Plants			5		5
dsDNA	<i>Adenoviridae</i>	Vertebrates	78	75		18	171
dsDNA	<i>Herpesviridae</i>	Vertebrates	4	6	2	455	467
dsDNA	<i>Papillomaviridae</i>	Vertebrates			18	217	235
dsDNA	<i>Polyomaviridae</i>	Vertebrates	2	9	6	3	20
dsDNA	<i>Poxviridae</i>	Vertebrates		6			6
RNA RT	<i>Retroviridae</i>	Vertebrates	1	9	2	75	87
ssDNA	<i>Anelloviridae</i>	Vertebrates	189	354	39	21	603
ssDNA	<i>Circoviridae</i>	Vertebrates	204	79	181	197	661
ssDNA	<i>Mycodnaviridae</i>	Vertebrates	10	20	5	43	78
ssDNA	<i>Parvoviridae</i>	Vertebrates	111	197	3	7	318
ssRNA(-)	<i>Bunyaviridae</i>	Vertebrates	2		4		6
ssRNA(+)	<i>Astroviridae</i>	Vertebrates	2		2	3	7
ssRNA(+)	<i>Hepeviridae</i>	Vertebrates			1		1
ssRNA(+)	<i>Picornaviridae</i>	Vertebrates			8	1	9
Unclassified	Unclassified	Not determined	165	391	250	355	1.161
Total contigs			1.929	2.591	2.695	3.768	10.983
Total viral families detected†			22	23	38	36	48
Total unclassified/dragonfly-associated viruses detected			3	2	3	3	4

974 The number of viral-associated contig sequences is given for each species in each environment. * indicates viral families which

975 belong to the dsDNA order of *Caudovirales*. †The total number of viral families detected excludes the nature of the host:

976 *Poxviridae* and *Parvoviridae* are counted once.



977

978 **S1 Figure.** Map of collecting sites of all samples/individuals used across French Guiana.

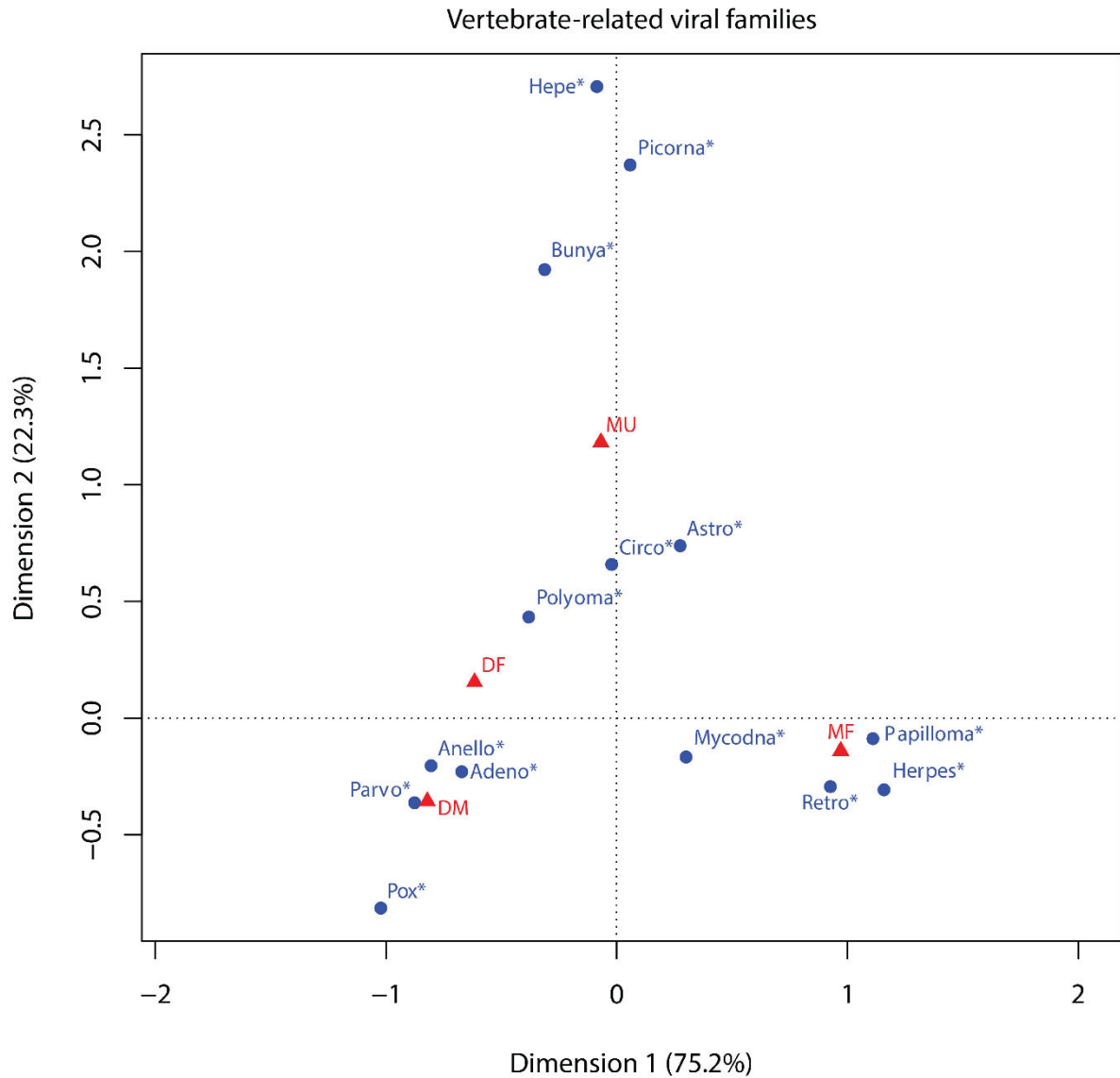
979 Paracou (PA), Cacao (CC), La Chaumière (CH), Cave F (CF), Cave M (CM), Saut Athanase

980 (SA). Sites are labeled with the type of environment to which they correspond: forest areas

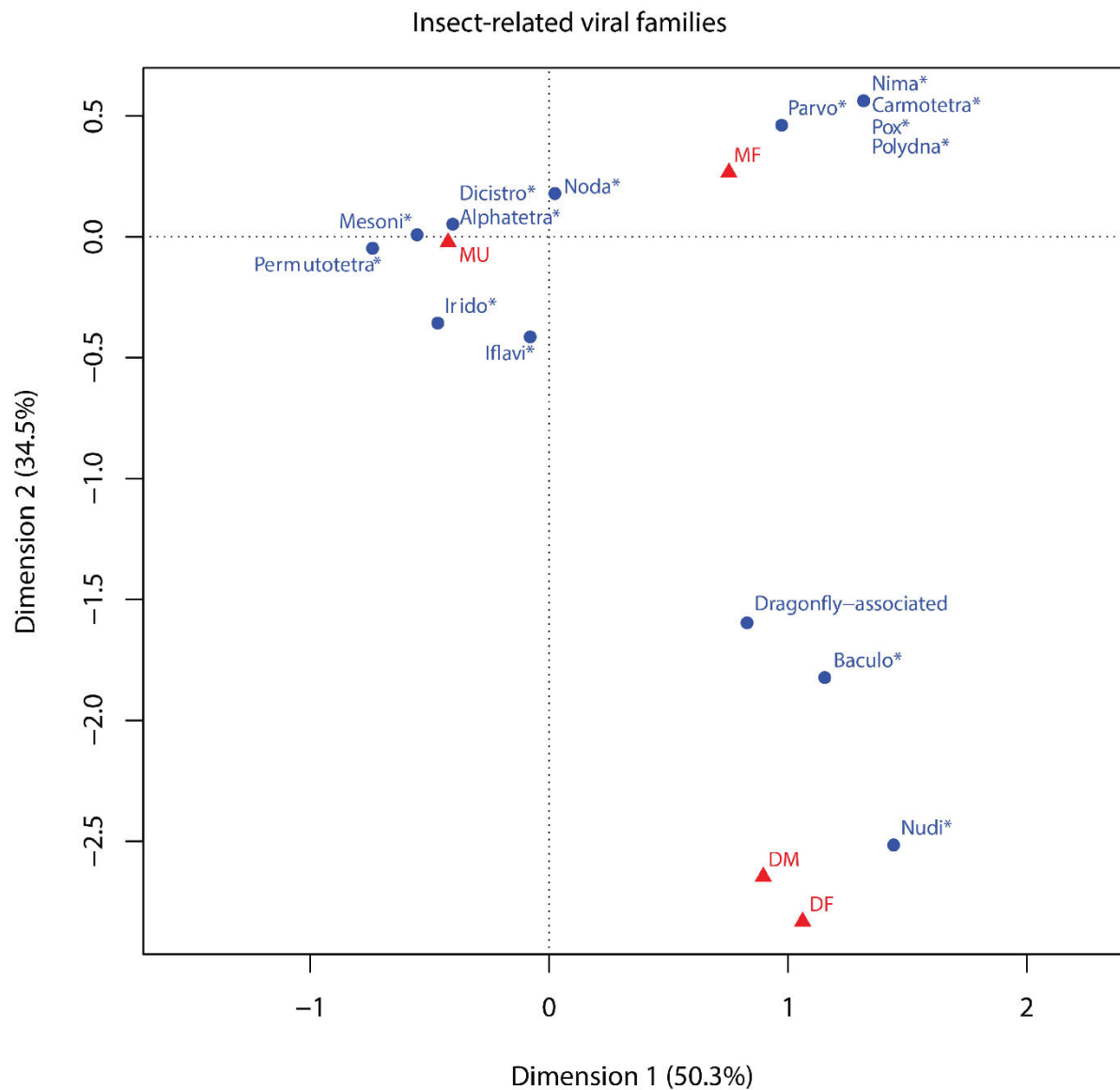
981 (dark square), urban and periurban areas (dark circle). The total number of collected samples

982 per site is given in parenthesis. Pie chart indicates the proportion of stool (red) and saliva (blue)

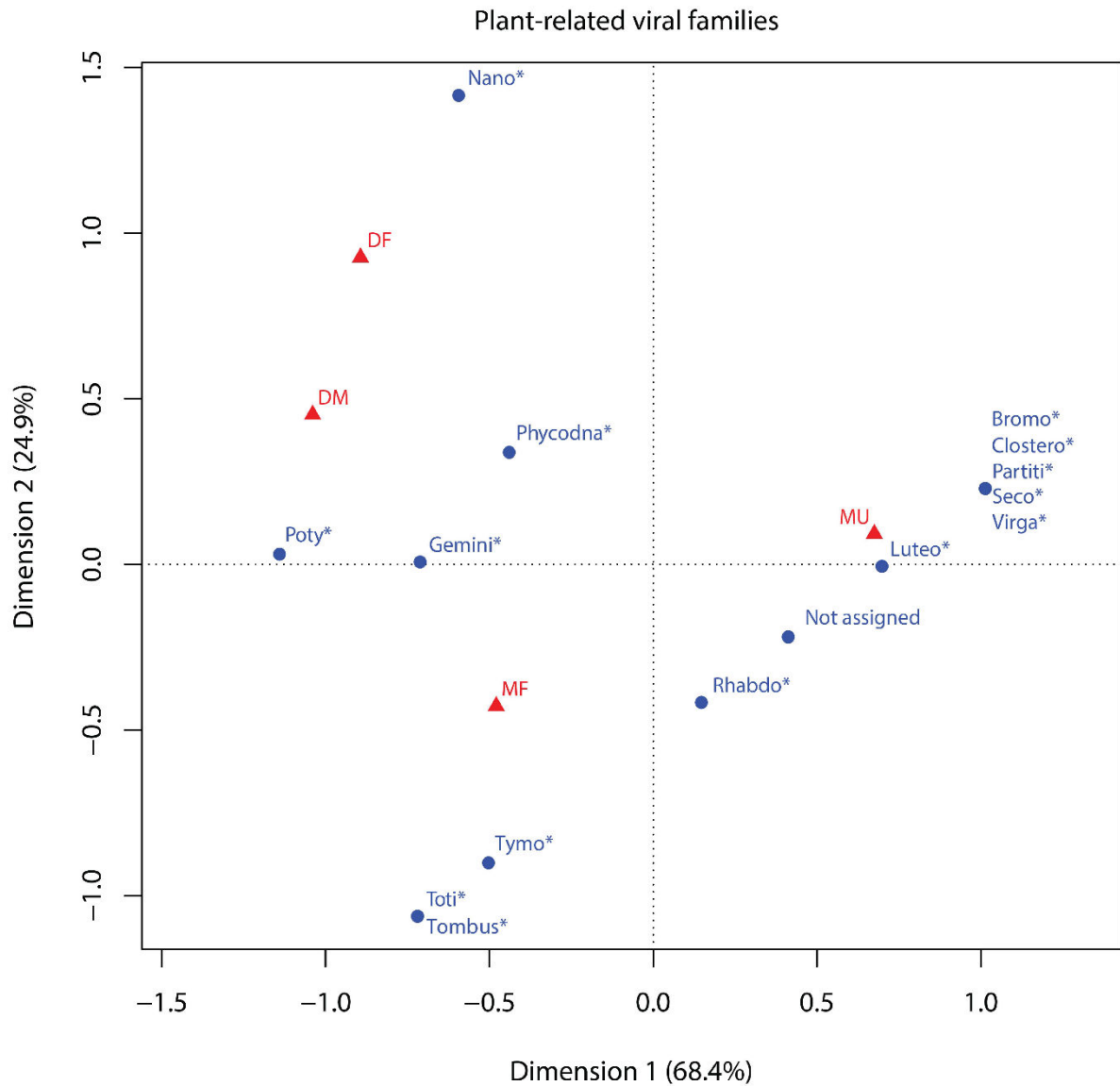
983 samples collected. Detailed characteristics of the different sites are given in S1 Table.



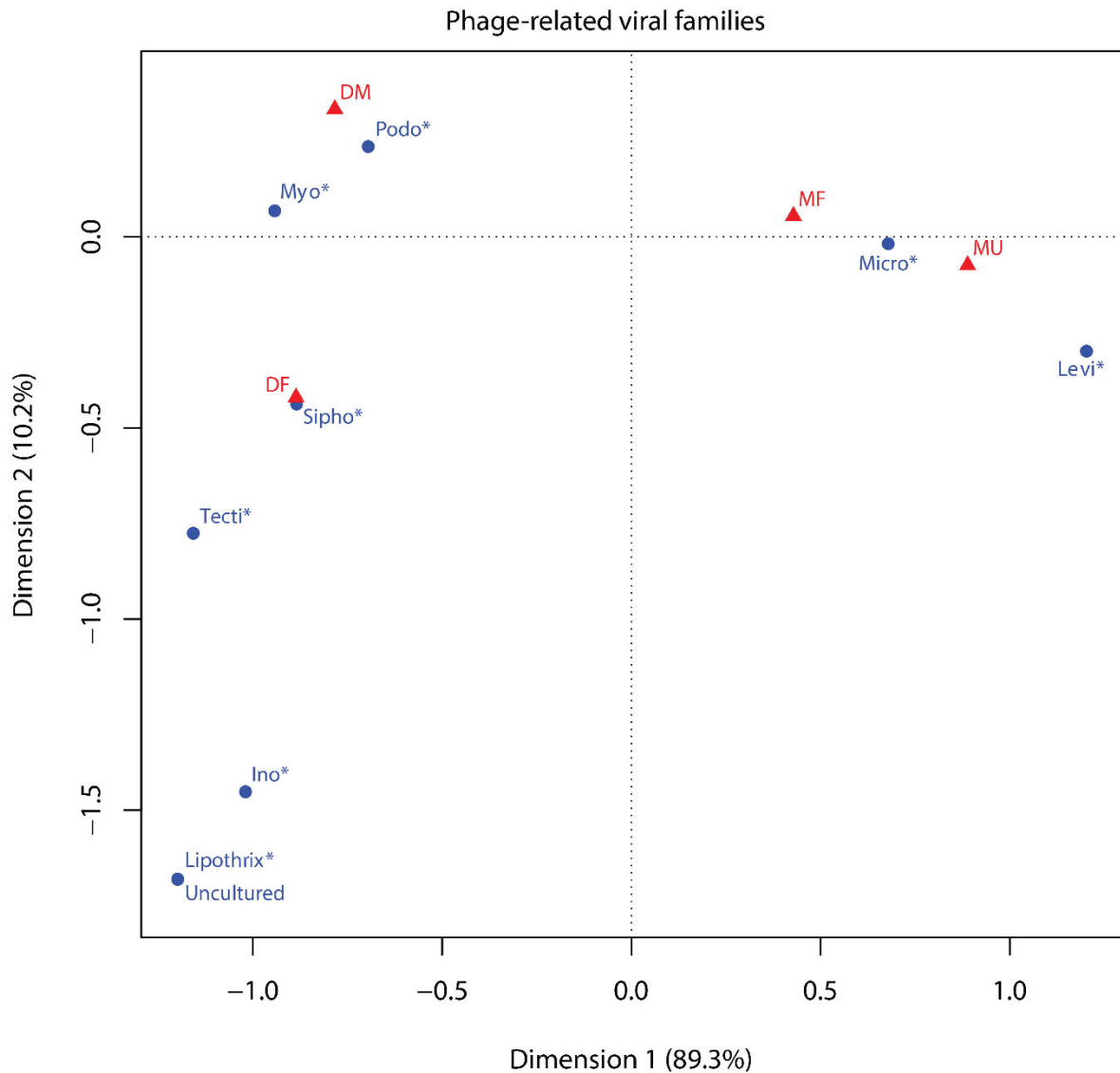
984
 985 **S2 Figure.** Viral profiles per natural host (**Vertebrate**) recovered from metagenomic data of
 986 *D. rotundus* and *M. molossus* saliva and stool samples. Blue dots represent the viral families (*
 987 stands for *viridae*). Red triangles represent the bat categories, DF (*Desmodus rotundus* in Cave
 988 F), DM (*Desmodus rotundus* in Cave M), MU (*Molossus molossus* in urban and periurban
 989 areas) and MF (*Molossus molossus* in forest areas). Proximity between dots indicates similarity
 990 of the profiles as measured by χ^2 distance. Proximity between a dot and a triangle indicates a
 991 close link between the bat category and the viral family.



992
 993 **S2 Figure.** Viral profiles per natural host (**Insect**) recovered from metagenomic data of *D.*
 994 *rotundus* and *M. molossus* saliva and stool samples. Blue dots represent the viral families (*
 995 stands for *viridae*). Red triangles represent the bat categories, DF (*Desmodus rotundus* in Cave
 996 F), DM (*Desmodus rotundus* in Cave M), MU (*Molossus molossus* in urban and periurban
 997 areas) and MF (*Molossus molossus* in forest areas). Proximity between dots indicates similarity
 998 of the profiles as measured by χ^2 distance. Proximity between a dot and a triangle indicates a
 999 close link between the bat category and the viral family.

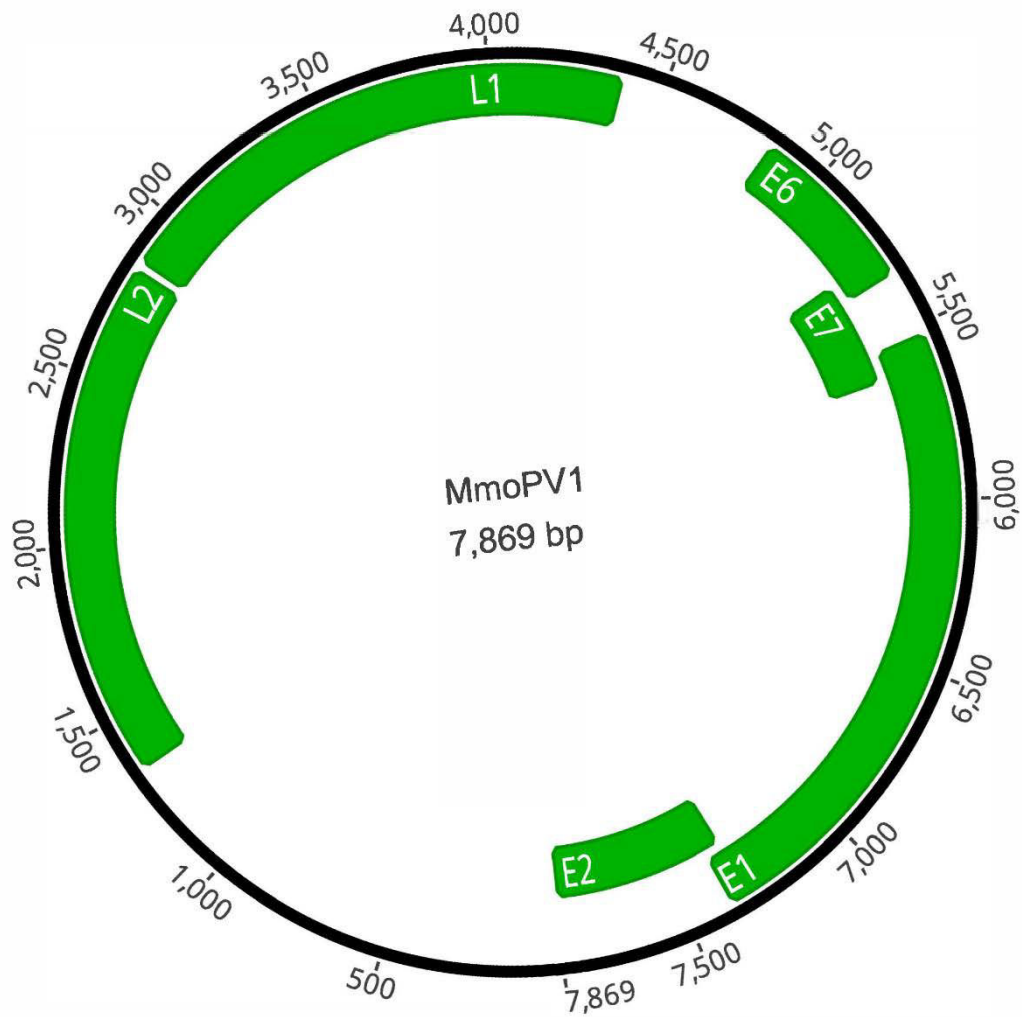


1000
 1001 **S2 Figure.** Viral profiles per natural host (**Plant**) recovered from metagenomic data of *D.*
 1002 *rotundus* and *M. molossus* saliva and stool samples. Blue dots represent the viral families (*
 1003 stands for *viridae*). Red triangles represent the bat categories, DF (*Desmodus rotundus* in Cave
 1004 F), DM (*Desmodus rotundus* in Cave M), MU (*Molossus molossus* in urban and periurban
 1005 areas) and MF (*Molossus molossus* in forest areas). Proximity between dots indicates similarity
 1006 of the profiles as measured by χ^2 distance. Proximity between a dot and a triangle indicates a
 1007 close link between the bat category and the viral family.



1008

1009 **S2 Figure.** Viral profiles per natural host (**Phage**) recovered from metagenomic data of *D.*
 1010 *rotundus* and *M. molossus* saliva and stool samples. Blue dots represent the viral families (*
 1011 stands for *viridae*). Red triangles represent the bat categories, DF (*Desmodus rotundus* in Cave
 1012 F), DM (*Desmodus rotundus* in Cave M), MU (*Molossus molossus* in urban and periurban
 1013 areas) and MF (*Molossus molossus* in forest areas). Proximity between dots indicates similarity
 1014 of the profiles as measured by χ^2 distance. Proximity between a dot and a triangle indicates a
 1015 close link between the bat category and the viral family.



1016 **S3 Figure.** Predicted genome organization of the putative papillomavirus sequence directly
 1017 recovered from the metagenomic data of *M. molossus* bat feces. The open-reading frames
 1018 encoding the putative late (L1 and L2) and early (E1, E2, E6 and E7) proteins are shown in
 1019 green boxes. The genome organization was determined with GENEIOUS R9.

2.2. Circulation de la rage en Guyane, quels facteurs biologiques et écologiques ?

A. Résumé de l'étude rage

La rage est une zoonose mortelle, responsable de milliers de décès chaque année. Cette maladie est présente sur tous les continents sauf en Antarctique, l'Asie et l'Afrique enregistrant la majorité des cas. Le virus de la rage (genre *Lyssavirus*, famille *Rhabdoviridae*) est en général excrété en fin de maladie dans la salive des animaux contaminés. Il se transmet par contact direct entre la salive et les peaux excoriées, blessées, etc. ou les muqueuses (King et Turner 1993). Deux cycles de transmission sont actuellement admis : un cycle urbain impliquant les carnivores comme en Europe où les vecteurs principaux du virus rabique sont les chiens et un cycle selvatique impliquant les chauves-souris comme dans les Amériques où ces animaux, et plus particulièrement le vampire commun *D. rotundus*, constituent les principaux vecteurs du virus rabique (Escobar et al. 2015).

En Amazonie, le nombre de cas humains rapporté reste élevé malgré les campagnes et les programmes de prévention. De plus, outre la chauve-souris vampire sur laquelle se focalisait toutes les études jusqu'à récemment, il a été rapporté que les chauves-souris frugivores et insectivores jouent également un rôle non négligeable dans la circulation et la transmission du virus dans la région amazonienne, et plus largement en Amérique Latine (Escobar et al. 2015).

En Guyane, plusieurs cas de rage ont été rapportés chez les animaux domestiques ces dernières années et un cas humain de rage, d'origine desmodine, a été diagnostiqué en 2008. Peu de données étaient alors disponibles sur l'écologie du réservoir majeur de la rage en Guyane. Le but cette étude était d'identifier les facteurs bioécologiques impliqués dans la circulation du virus rabique dans différentes communautés de chauves-souris et différents environnements. Plusieurs paramètres tels que le type de végétation, le régime alimentaire, la structure des populations, etc. ont été étudiés afin de mieux comprendre les variations de prévalence rabique dans ces communautés. L'étude s'appuie également

sur le suivi sérologique de deux cohortes de chauves-souris vampires effectué depuis 2005 dans le département.

Un total de 995 chauves-souris, soit une trentaine d'espèces de chauves-souris différentes évoluant en sympatrie, ne présentant aucun signe apparent de maladies ont été capturées ou recapturées, entre 2005 et 2013 dans 24 sites répartis dans des zones urbaines, forestières ou en lisières. Au cours de cette période, deux chauves-souris ont été détectées positives pour la présence directe du virus rabique : une chauve-souris vampire, *D. rotundus*, capturée dans une zone forestière, ne présentant pas de signes cliniques apparents et une chauve-souris frugivore, *Artibeus planirostris*, capturée dans une zone urbaine, dans un état de morbidité. Les séquences ont été caractérisées et les relations phylogénétiques montrent une forte proximité avec les virus rabiques circulant au Pérou et dans le Parà (Brésil). Outre ces deux individus, cent chauves-souris appartenant à quatorze familles montraient la présence d'anticorps anti-rabiques. Le régime alimentaire hématophage, le type de gîte, le type de colonie monospécifique et une végétation de type forestière semblaient être des déterminants favorables de séropositivité pour le virus rabique.

Cette étude a pu mettre en évidence une circulation à grande échelle du virus rabique dans les différentes communautés de chauves-souris de Guyane, la transmission s'effectuant essentiellement par contact salivaire au niveau intraspécifique des chauves-souris vampires, accentuée par l'organisation sociale complexe de ces dernières. L'exposition des autres espèces de chauves-souris, y compris celles qui ne partagent pas le même micro-habitat, a été mise en évidence dans toutes les strates forestières. Toutefois, les modes de transmission intra et interspécifiques dans ces populations restent à identifier. L'exposition *a priori* régulière chez les chauves-souris suggère une grande capacité à contrôler et éliminer le virus rabique, expliquant les phénomènes de séroconversion observés. Par ailleurs, l'impact de la modification des habitats joue un rôle prépondérant. En effet, les habitats forestiers vierges permettent aussi bien l'autosuffisance des chauves-souris vampires que la propagation du virus rabique. *A contrario*, la perturbation des habitats des chauves-souris vampires pourraient induire une modification de leur stratégie d'alimentation et ainsi augmenter le risque de transmission aux abords des forêts et dans les zones anthropisées.

B.

Article de recherche

**Bioecological Drivers of Rabies Virus Circulation in a
Neotropical Bat Community**

RESEARCH ARTICLE

Bioecological Drivers of Rabies Virus Circulation in a Neotropical Bat Community

Benoit de Thoisy^{1*}, Hervé Bourhy², Marguerite Delaval³, Dominique Pontier⁴, Laurent Dacheux^{2‡}, Edith Darcissac^{1‡}, Damien Donato^{1‡}, Amandine Guidez^{1‡}, Florence Larrous^{2‡}, Rachel Lavenir^{2‡}, Arielle Salmier^{1‡}, Vincent Lacoste¹, Anne Lavergne¹

1 Laboratoire des Interactions Virus-Hôtes, Institut Pasteur de la Guyane, Cayenne, French Guiana, **2** Lyssavirus Dynamics and Host adaptation Unit, National Reference Centre for Rabies, Institut Pasteur, Paris, France, **3** Sylvétude, Office National des Forêts, Cayenne, French Guiana, **4** Laboratoire de Biométrie et Biologie évolutive, UMR CNRS 5558, Université Lyon 1 / CNRS, Villeurbanne, France

‡ These authors contributed equally to this work and are alphabetically ordered.

* bdethoisy@pasteur-cayenne.fr



OPEN ACCESS

Citation: de Thoisy B, Bourhy H, Delaval M, Pontier D, Dacheux L, Darcissac E, et al. (2016) Bioecological Drivers of Rabies Virus Circulation in a Neotropical Bat Community. *PLoS Negl Trop Dis* 10(1): e0004378. doi:10.1371/journal.pntd.0004378

Editor: Matthew Kasper, Armed Forces Health Surveillance Center, UNITED STATES

Received: August 19, 2015

Accepted: December 18, 2015

Published: January 25, 2016

Copyright: © 2016 de Thoisy et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Sequences are available on Genbank: KT023100, KT023101, KT276358, KT276360 to KT2763688, KT276359, KU295471-KU295500.

Funding: This study was conducted within the VIRUSES and CAROLIA programs supported by European funds (ERDF/FEDER) and assistance from Région Guyane and Direction Régionale pour la Recherche et la Technologie. It also received a European commission "REGPOT-CT-2011-285837-STRonGer" grant within the FP7 and "Investissement d'Avenir" Grants managed by Agence Nationale de la Recherche (CEBA, Ref. ANR-10-LABX-25-01;

Abstract

Introduction

In addition to the commonly accepted importance of the vampire bat in the maintenance and transmission of the rabies virus (RABV) in South America, RABV infection of other species is widely evidenced, challenging their role in the viral cycle.

Methodology / Principles findings

To identify the bioecological drivers of RABV circulation in neotropical bat communities, we conducted a molecular and serological survey on almost 1,000 bats from 30 species, and a 4-year longitudinal survey in two colonies of vampire bats in French Guiana. RABV was molecularly detected in a common vampire and in a frugivorous bat. The sequences corresponded to haematophagous bat-related strains and were close to viruses circulating in the Brazilian Amazon region. Species' seroprevalence ranged from 0 to 20%, and the risk of seropositivity was higher in bats with a haematophagous diet, living in monospecific colonies and in dense forests. The longitudinal survey showed substantial temporal fluctuations, with individual waves of seroconversions and waning immunity. The high prevalences observed in bat communities, in most habitats and in species that do not share the same microhabitats and bioecological patterns, the temporal variations, and a rather short period of detectable antibodies as observed in recaptured vampires suggest (i) frequent exposure of animals, (ii) an ability of the infected host to control and eliminate the virus, (iii) more relaxed modes of exposure between bats than the commonly assumed infection *via* direct contact with saliva of infected animals, all of which should be further investigated.

Conclusions / significance

We hypothesize that RABV circulation in French Guiana is mainly maintained in the pristine forest habitats that may provide sufficient food resources to allow vampire bats, the main prevalent species, to survive and RABV to be propagated. However, on the forest edge and

ECOFECT, Ref. ANR-11-LABX-0048). The authors thank the Institut de Veille Sanitaire, Saint-Maurice, France (<http://www.invs.sante.fr>) and the Institut Pasteur for their financial contribution to the National Reference Centre for Rabies that made this work possible. This research was also funded by the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) PREDEMICS grant 278433. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript

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

in disturbed areas, human activities may induce more insidious effects such as defaunation. One of the ecological consequences is the disappearance of resources for tertiary or secondary consumers. Populations of vampires may then shift to alternative resources such as cattle, domestic animals and humans. Therefore, a good forest status, allowing both a dilution effect in highly rich bat communities and the maintenance of large populations of medium-sized and large mammals used as prey by vampires, should prevent their migration to anthropized areas.

Author Summary

The vampire bat is known to be the main reservoir of the rabies virus (RABV) in South America. Nevertheless, other bat species are implicated in the cycle of the virus. Indeed, seven genus-specific rabies lineages have been described in insectivorous bats in Brazil. In French Guiana, we looked for the presence of the virus in a large number of bats, belonging to 30 different species. We found a high rate of seropositive animals, mainly haematophagous bats, and in those living in monospecific colonies and in forest habitats. We also monitored two colonies of vampire bats over a 4-year period and found that some animals became seropositive for the RABV, while others, after being seropositive, were able to become seronegative. These data first of all demonstrate that the virus widely circulates in bat communities with transmission occurring *via* direct saliva contact with broken skin and mucosa at the intra-specific level in vampire bat species. Exposure of other bat species, including those that do not share the same microhabitat, occurs in all forest strata through modes of transmission that have yet to be determined. Secondly, these animals seem to be exposed regularly, and most of them have a great ability to control and eliminate the virus. Third, these results suggest that pristine forest habitats provide sufficient food resources for the survival of vampire bats and propagation of RABV. In contrast, in disturbed habitats, where resources are decreasing, the vampires might have to shift to alternative resources such as cattle, domestic animals or even human beings. Altogether, the risk of rabies virus transmission may increase on the edge between forest and anthropized areas.

Introduction

Rabies is recorded in many Latin American and Caribbean countries where it was responsible for 111 lethal human cases between 2010 and 2012 [1]. Two epidemiologic cycles are recognized. The urban cycle involves carnivores, most particularly dogs, as the main reservoir and considerable effort to vaccinate and control stray dogs has made it possible to move from endemicity to episodic events in circumscribed areas [2]. The sylvatic cycle, involving the common vampire bat *Desmodus rotundus* as the major reservoir among wild species [3,4], shows an increasing number of cases over time [5]. Contrasting with the urban cycle, the sylvatic cycle is considered as endemic in South America, with emergence of local foci restricted in space and time correlated with surveillance investigations after outbreaks in humans and/or domestic animals [2]. In the Americas, bats are now considered as the principal rabies reservoirs [6]. Despite extensive monitoring and case studies [7], the ecological factors that could influence the frequency and outcome of cross-species transmission have not been sufficiently investigated. A global analysis performed on bat communities in North America highlighted that cross-species transmission is mainly associated with phylogenetic relatedness and

geographic overlap between species and to a lesser extent to ecological factors [8]. Nevertheless, the role of ecological factors in cross-species transmission was not yet investigated in tropical environment.

Recent extensive serological surveys have shown a high diversity of positive bat species, suggesting a wide distribution and circulation of the virus in Amazonia [2,9–12]. However, contrasting with serological surveys, necessary to qualify the emergence risk, molecular surveys have been hitherto scarce. Most of them focused on previously recognized reservoirs such as the *Desmodus rotundus* [4]. Nevertheless, in Peru, rabies virus (RABV) was also found in *Histiotus montanus* [13,14] and *Artibeus lituratus* [15]. In the Southern cone of South America, several species have been shown to be reservoirs of distinct lineages of rabies, including *Tadarida* sp., *Artibeus lituratus*, *Eptesicus furinalis*, *Lasiurus ega* and *L. blossevellii*, *Myotis nigricans* and *Molossus molossus*, for example [16–18]. These studies suggest that non-haematophagous bats could also act as primary hosts of the virus [2]. Nevertheless, their ability to spread the virus among populations requires further attention. Rather than focusing on some species, bat communities must therefore be considered as a whole in order to understand the diversity of hosts, dispersal and dynamics of viral strains, and the likelihood of their emergence.

The ability of bats to control rabies virus (RABV) infection and to disperse the virus, inter-individual transmissions as well as viral persistence, are other points that remain to be examined. Epidemics of rabies are often reported with wave-like patterns, both geographically [19] and temporally [20]. Several key factors have been suggested for viral maintenance and cross-species transmission in bat colonies: (1) a spatial process involving rabies infection in a “naive population” by individuals that migrate from neighbouring colonies and frequent immunization of bats [21]; (2) regional enzootic maintenance correlated with frequent independent transmission events and the major role played by naive juvenile and sub-adult populations in viral maintenance [7,22]; (3) long incubation period associated with a low mortality of bats during hibernation in subtropical areas and temperate areas, which allow enough infected individuals to survive until the following year and to infect the new generation of susceptible young [23]; (4) the effects of climate on the viral evolution of bat rabies across temperate and tropical regions with a major impact on cross-species transmission [24]. For the common vampire bats, experimental infections suggest that they are quite resistant to infection and that only a high viral dose induces symptoms [25] with alteration of behaviour and neurological signs [26]. Furthermore, fields and statistical studies indicate that the probability of a vampire bat developing a lethal infection with rabies virus is low (around 10%) [21]. Transmission between individuals is classically believed to be based on close interactions, both intra- and interspecific, facilitated, for instance, by shared roosts, regurgitation of blood meals, and social licking, with saliva in contact with broken skin as the main transmission route of the virus [27,28]. However, growing evidence of a wide distribution of seropositivity in species with distinct bioecological patterns [2,11,12,29] raises the question of which mechanisms are implicated in cross-species transmission.

Lastly, emergence foci are challenging to predict, and thereafter to control, in time and space. Biodiversity plays a key role in the transmission of zoonotic diseases. To date, no correlation has been observed between bat species richness in Latin America and the number of rabies-positive species. Nevertheless, this observation was limited by the programmes implemented and the ability of the different countries to investigate rabies virus circulation [2]. The debate remains active on the relative and contradictory importance of the dilution effect, claiming that loss of diversity would favour the risk of emergence as well as the amplification effect, which assumes a positive correlation between biodiversity and disease risk [30]. Rabies occurrence has been reported in the Brazilian state of Pará, in Ecuadorian and Peruvian Amazonia, as well as in Colombia and Trinidad. These areas share a similar environment pattern: they

have experienced substantial forest loss during the last few decades [31], likely associated with significant modifications and disturbances of their wild animal communities, including modification of bat communities as classically observed in disturbed habitats [32]. Extensive cattle ranching also provide stable resources and can result in population expansion for vampire possibly associated with rabies incidence [21,22].

In the Amazonian region, the number of human rabies cases remains high in spite of efforts undertaken in education, prevention, vaccination and in bat population control. Numerous epidemics in Amerindian populations have been reported in Peru [5,33]. Between 1996 and 2010, 113 human rabies cases associated with vampire bats were registered in Peru and in 2011, eight children died from rabies in an Amerindian community [33,34]. In Brazil, numerous cases have also been reported in the Amazonian region with more than 62 persons infected between 2004 and 2005 [35,36]. In French Guiana, a French overseas department located on the northern part of the Amazonian region, 13 rabies cases were recorded in cattle and domestic carnivores between 1984 and 2011 [37]. They were all related to vampire bat-associated rabies virus. In 2008, a human rabies case was recorded. The origin of the contamination was not formally established but transmission by a vampire bat bite was favoured [38], molecular typing of this virus (polymerase (L) gene, Genbank accession number GU816007) showed a close relationship with the viruses circulating in haematophagous bats in neighbouring countries.

The aim of this study was to better understand bioecological factors associated with virus circulation within different bat communities and environments. More specifically, we aimed to (i) investigate how factors related to the environment (season, vegetation type, biogeographic region, disturbance level) and to hosts (diet, social structure, type of roosts), could explain the variations in rabies prevalence; (ii) explore the maintenance of the virus in colonies and (iii) examine how the observed patterns inform on the circulation, transmission modes and emergence risks. To achieve these aims, we implemented serological and molecular surveys on wild bats from French Guiana, on a wide diversity of sites and bat communities, and through a 4-year serological temporal monitoring of two free-ranging vampire bat colonies.

Materials and Methods

Ethical and legal statements

Animals were captured, handled, sampled and, whenever necessary, euthanized in accordance with ASM guidelines [39], under the supervision of researchers in possession of the national "expérimentation animale level 1" degree. Bats are not protected by law in French Guiana, but the project was presented to the Conseil Scientifique Régional pour le Patrimoine Naturel de la Guyane, and approved by this council. Captures that occurred within protected areas (nature reserves) received approval of the Conseil Scientifique Régional du Patrimoine Naturel the 26th January 2010 and ad-hoc authorizations (no. 2011–35 from the 05/30/2011, no. 35 and 59 obtained 03/21/2013 and 04/17/2013, respectively, and delivered by the Préfecture de la Guyane). Sera were exported from French Guiana to the National Reference Center (NRC) for Rabies, Institut Pasteur, Paris, France, for serology, under authorization no. 141/DEAL/2013 delivered by the Préfecture de la Guyane.

Study areas

Bats were trapped in 24 sites from 2005 to 2013 (Fig 1, Table 1, S1 Table). These sites were located in pristine primary lowland forests with low disturbance pressures (six sites), edge habitats (five sites), anthropized areas (eight sites) and urban and periurban areas (five sites). The sites' disturbance level was determined with the human footprint method [40], based on

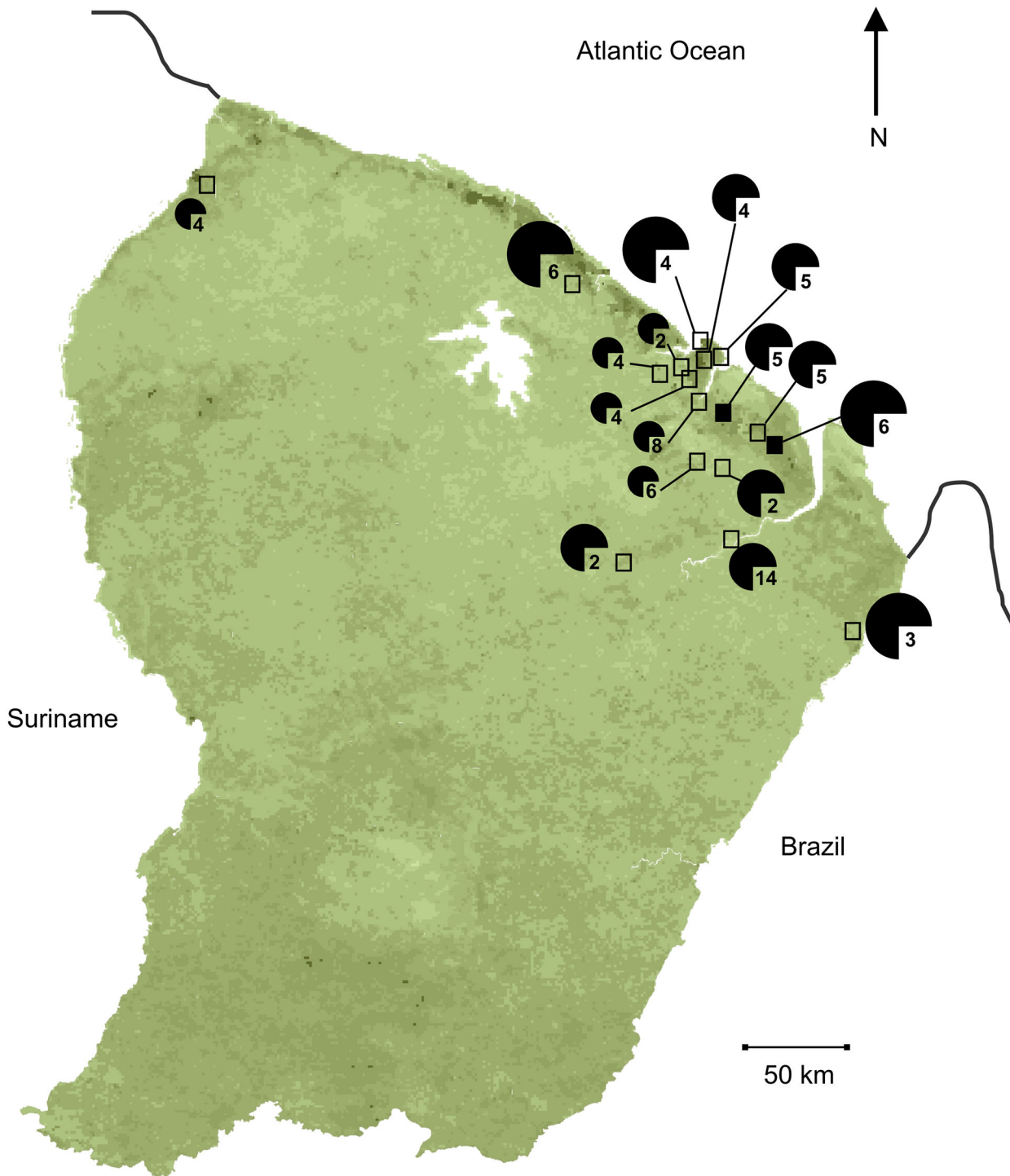


Fig 1. French Guiana map with the location of the trapping sites in empty squares and the caves (cave 1 and cave 2) in black squares investigated in the study. For clarity, close sites (<10 km) are presented together. Pie chart indicates rabies seroprevalence, with small charts indicating prevalence rates < 5%, medium-sized, charts prevalence rates from 5 to 15%, and large charts, prevalence rates > 15%. The number associated to the chart indicates the number of species sampled at the trapping site. Background of the map shows the vegetation type (Gond et al. 2011), the main environmental variable associated to the variation of the seroprevalence.

doi:10.1371/journal.pntd.0004378.g001

Table 1. Bat species tested for rabies serology, prevalence, and specific bioecological factors.

Family and species of bats	N tested	N positive	Prevalence % (species with n>10 only)	Diet	Roost	Colony	Size of colony	Opportunism
Mormoopidae	173	19	11					
<i>Pteronotus rubiginosus</i> & <i>P. sp.3</i> *	173	19	11	ins	1	P	3	1
Molossidae	59	2	3.3					
<i>Molossus barnesi</i> & <i>M. molossus</i>	57	2	3.4	ins	4	P	2	3
<i>Molossus rufus</i>	2	0		ins	4			
Phyllostomidae	760	78	10.3					
<i>Anoura geoffroyi</i>	81	7	8.6	omn	1	P	3	1
<i>Artibeus cinereus</i>	1	0		fru	1	M	1	3
<i>Artibeus concolor</i>	1	1		fru	1	M	1	3
<i>Artibeus gnomus</i>	1	0		fru	1	M	1	3
<i>Artibeus lituratus</i>	3	0		fru	1	M	1	3
<i>Artibeus obscurus</i>	5	0		fru	1	M	1	3
<i>Artibeus planirostris</i>	50	6	12	fru	1	M	1	3
<i>Carollia perspicillata</i>	214	15	7.0	fru	1	P	2	3
<i>Chiroderma villosum</i>	1	0		fru	3	M	1	2
<i>Desmodus rotundus</i>	294	42	14.2	hae	2	M	2	3
<i>Diaemus youngi</i>	5	1		hae	2	P	2	3
<i>Glossophaga soricina</i>	4	1		omn	4	P	2	3
<i>Micronycteris hirsuta</i>	1	0		ins	2	M	1	2
<i>Phylloderma stenops</i>	2	1		ins	2	M	1	2
<i>Phyllostomus discolor</i>	4	0		ins	2	P	1	1
<i>Phyllostomus elongatus</i>	2	0		ins	2	P	1	1
<i>Phyllostomus hastatus</i>	1	0		ins	2	P	1	1
<i>Phyllostomus latifolius</i>	5	0	0	ins	2	P	1	1
<i>Platyrrhinus brachycephalus</i>	2	0		fru	3	M	1	2
<i>Sturnira lilium</i>	43	1	2.0	fru	4	M	1	3
<i>Sturnira tildae</i>	20	2	10.0	fru	3	M	1	2
<i>Tonatia saurophila</i>	4	0		ins	2	P	2	2
<i>Tracops cirrhosus</i>	5	0		omn	2	P	1	2
<i>Uroderma bilobatum</i>	11	1	9.1	fru	3	M	1	2
Vespertiniolidae	3	1						
<i>Eptesicus furinalis</i>	3	1		ins	4	M	1	3

N = number of animals

Diet: fru = frugivore; hae = haematophagous; omn = omnivorous; ins = insectivorous.

Roost: 1 = caves only; 2 = caves, old trunks; 3 = foliage; 4 = opportunist (houses, foliage, caves, trunks)

Colony: M = monospecific, P = multispecific

Size of colony: 1 = small (some animals), 2 = medium (dozens of animals), 3 = large (hundreds of animals)

Opportunism refers to the level of ecological plasticity and tolerance to perturbation: 1 (strict ecological requirements) to 3 (highly tolerant/plastic)

* the two species of mustached bats (*Pteronotus* spp.) are currently under revision and are difficult to differentiate based on external morphology only [62].

doi:10.1371/journal.pntd.0004378.t001

both evidenced pressures on natural habitats (density of roads and tracks, logging, mining) and signs of human presence (settlements). Forest types follow the classification based on remote-sensing analysis of reflectance of the vegetation cover [41], biogeographic regions were identified from geomorphology and large vegetal communities [42]. Longitudinal

surveys of vampire bats were conducted in two breeding caves with the Marais de Kaw-Roura Nature Reserve.

Collection of specimens and biological material

A first set of 995 individuals (30 species) were captured on 24 sites (S1 Table) at night (from 07:00 pm to 11:00 pm) using a combination of long (12 × 2.6 m) and short (6 × 2.6 m) Japanese mist nets (Ecotone, Gdynia, Poland) on the forest floor, as implemented in the region [43]. Eight hundred and seventy-four animals were sampled for blood (between 20 and 50 µl) with a sterile needle and capillary at the brachial vein and for saliva with a swab, before release. External pressure was exerted on the vein with a sterilized absorbent hemostatic sponge to prevent bleeding and facilitate healing. Skin biopsies were also collected on the patagium using adapted small scissors for molecular identification and future genetic analyses. Blood samples were preserved at 4°C until arrival at the laboratory and centrifuged at 6500 g for 10 min to separate sera. Sera were preserved at -80°C and then sent for serological analyses to the NRC for Rabies, Institut Pasteur, Paris. Sixty-one vampires, collected on sites where human attacks were registered, were euthanized and organs collected (brain, heart, lung, kidney, spleen, saliva). Individuals were identified based on external morphology [44], associated with forearm measurement, and confirmed with molecular barcoding (sequencing of the cytochrome oxidase 1 and/or cytochrome b, [43]) for all species (Genbank accession numbers KU295471-KU295500).

Within the two breeding caves (Fig 1), captures were implemented every 4–5 months over a 4-year period, between Nov. 2009 and May 2013 (S2 Table). At each capture session, the population size was estimated visually by two independent observers. Captures were performed with nets, in the caves, during the day time to localize the colony at rest and target captures on vampires only, and avoid disturbing the other species. To prevent repeated disturbance of the colonies, captures were implemented by three persons only and lasted no more than 30 min. Whenever possible, females with their offspring were not captured and were directly released if they fell into the nets. All animals captured were kept in individual bags, and were identified, sampled and measured outside the caves. Seven and nine sessions of capture/recapture samplings were implemented in caves 1 and 2, respectively (Table 2), allowing marking (Passive

Table 2. Individual vampire seroconversion over time. Seropositivity titers are noted for each capture. Positive seroconversions are indicated by +, negative seroconversions by— and positive seroconversions followed by seronegativations by +/-.

Seroconversion	Cave 1								Cave 2							
	+	+/-	+	+/-	+/-	+	+	+/-	-	+/-	-	-	+	+	-	
Animal	Ind. 1	Ind. 2	Ind. 3	Ind. 4	Ind. 5	Ind. 7	Ind. 8	Ind. 9	Ind. 10	Ind. 11	Ind. 12	Ind. 13	Ind. 14	Ind. 15	Ind. 16	
November 2009	0															
February 2010		0	0	0												
July 2010				0.6	0											
November 2010		0	0	0	1.1											
February 2011												2.5	0.9			
March 2011	0	0		0		0	0	0								
June 2011			1.5			1.2	0.9	0.8					1.3	0	1.3	
November 2011	1.2	1.4			0	0.9	1.3	0	1.6	0				1.2	0	
April 2012								0	1.5	1	1.1					
August 2012		0							0	0						
September 2012												0				
May 2013											0					

doi:10.1371/journal.pntd.0004378.t002

Integer Transponder BackHome, Virbac, France, injected subcutaneously between the shoulders). Adult age was determined on the basis of completely fused phalangeal epiphyses.

Molecular screening, nucleoprotein and glycoprotein amplification, phylogenetic analysis

For molecular screening of all samples, total RNA was extracted from blood clots using the NucliSENS EasyMAG bio-robot (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). At the same time, for the common vampire bats only, total RNA was also extracted on swab saliva using the same protocol. cDNA was prepared with the SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Life Technologies, Inc.) and random hexamers (Roche, Mannheim, Germany). Presence of lyssavirus was investigated using a hemi-nested RT-PCR (hnRT-PCR) that has been described to amplify a wide range of lyssaviruses [45]. This hnRT-PCR amplifies a fragment of 249 nucleotides of the viral polymerase (L) gene. Amplification products at the expected size were confirmed by sequencing (Beckman Coulter Genomics, Takeley, UK).

The nucleoprotein (N) and glycoprotein (G) sequences obtained from the RABV-positive sample originating from a common vampire bat were obtained using a nested RT-PCR approach, after total RNA extraction from heart and cDNA synthesis, as described above. For the N gene, the first round of PCR was performed using primers 21G and 304S, as described in [35]. The nested PCR was performed using the forward primer RABV 719F (5'-ATTGAACATTTGTATTTCAGC-3') and the reverse primer RABV 827R (5'-CAGTGAGATTTATTTGCTT-3') designed in this study. To generate the complete sequence of the G gene, two sets of primers (umf2/994b and 760f/308b) amplifying two overlapping fragments were used in the first-round PCR as previously described [46]. Then, the initial umf2/994b PCR product was used as the template in a nested PCR using the forward primer RABV 3734F (5'-AAATCCTTATCCTGATTACCAC-3') and the reverse primer RABV 3876R (5'-CCAAACATTTCCCACCAGG AACACC-3'), while the initial PCR product 760f/308b was used as template in a nested PCR using the forward primer RABV 4717F (5'-GAAGTCCACCTCCCAGATGTTTC-3') and the reverse primer RABV 5044R (5'-GCAGTCTTCAGATCGCAGGATA-3'). Amplification products of the expected size were then sent for sequencing to Beckman Coulter Genomics (Takeley, UK). In addition to the samples analysed in this study, data obtained independently by the NRC for Rabies in its diagnostic and surveillance activities on moribund mammals were included in the analyses. Nine domestic animals (two dogs and seven cattle species) and one bat (*Artibeus planirostris*), collected in French Guiana between 1989 and 2009 were added. The N gene was amplified and sequenced for the ten animals and the G gene was only generated for the bat sample as previously described [47–49].

The two genomic regions (N and G complete gene sequences) were analysed separately. Raw sequences were analysed and edited in MEGA 5.05 [50]. Sequences were translated into amino acid and both nucleotide and amino acid sequences were checked for irregularities. Multiple sequence alignments were performed using MEGA 5.05 with other previously published rabies virus sequences, and alignments were checked manually. Phylogenetic trees were inferred from the aligned nucleotide sequences. The MrModeltest2.3 program [51] was used to determine the optimal model of nucleotide evolution for the two genes. The GTR model, with a gamma distribution shape parameter (G) and invariable sites (I), was identified and used for the Bayesian approach, which was performed with Mr. Bayes 3.2.2 to infer phylogenetic relationships [52]. Markov Chain Monte Carlo (MCMC) simulations were run for 10,000,000 generations, with four simultaneous chains, using a sample frequency of 100 and a burn-in of 25,000. Majority rule consensus trees were obtained from the output. Validation of the inference was assessed based on the standard deviation of split frequencies, which was less than the

expected threshold value of 0.01 (calculated value of 0.0018 and 0.0009 for the N and G genes, respectively).

Serologic methods

The technique used to detect RABV neutralizing antibodies is the Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) [53]. A constant dose of a previously titrated (calibrated to give 80% fluorescent focus infected cells) cell culture-adapted RABV challenge virus (CVS) was incubated with threefold dilutions of the sera. After incubation of the serum-virus mixtures, a suspension of a clone of BHK-21 (BSR) cells was added. After 24 h of incubation, the cell monolayer was acetone-fixed and labelled with a fluoresceinated anti-nucleocapsid antibody (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The optimal challenge dose (the dilution giving 80% infected cells for each virus production) was calculated. Titers of sera were calculated by comparison with a reference serum calibrated to the WHO reference serum. A minimal threshold of 0.5 IU/ml was considered for positivity. This titer is close to the positivity thresholds used in studies conducted on bats [11, 54–56] or other non-flying wild mammals [57–59] and is conservative and therefore further increases the specificity of the test.

Statistical analysis

Ecology and biology extensively vary among species (Table 1). To control the bias of unrelated sample size for each species at each capture site rather than specific prevalence, we used individual serological response. A multivariate logistic regression analysis was used with R [60] to infer the role of bioecological factors including diet, type of roots, type of colonies (monospecific vs. multispecific), size of colonies, and ecological plasticity [44,61], as well as the characteristics of capture sites, including vegetation type [41], landscape units [42] and disturbance index [40]. For vampire bats that were recaptured, only the serological result obtained at their first capture was considered. To limit the uncovered bias of likely temporal and geographic variations of serology (e.g., [22], this study), we considered the year of sampling and the capture sites as random effects. A two-step procedure was used in the logistic regression model to determine the most parsimonious multivariate model. First, the association of all factors and the positivity were assessed one by one in bivariate analyses with the year as random effect; a p -value < 0.1 allowed selecting candidate variables for the second step. In this second step, the same logistic regression model including all factors identified in the first step was applied, with a generalized linear mixed model fit by maximum likelihood. The best multivariate model was selected with AIC and BIC criteria.

Results

Molecular detection of RABV and phylogenetic relationships

The molecular survey realized on 995 healthy bats captured between 2005 and 2013, identified one positive common vampire bat *Desmodus rotundus* for RABV (Table 1). This animal was a female adult, not pregnant, that was captured in September 2010, on the Approuague River, North-East of French Guiana. RABV RNA was detected in blood, saliva and heart tissue (the brain was not tested). This animal was also positive by serology, with a low titer (0.6 IU/ml). Sequences of this RABV-positive sample (AT6) were obtained for the G and N genes and deposited in GenBank (accession numbers KT023100 and KT023101, respectively). Furthermore, the only other bat (*Artibeus planirostris*, specimen 09035FRA) detected as positive by the NRC for Rabies was found in a sublethal condition in Rémire-Montjoly, close to Cayenne in 2009. All the sequences obtained by the NRC were deposited in GenBank (accession

numbers KT276358 and KT276360 to KT2763688 for domestic species; KT276359 for the *Artibeus*).

For the N gene, all sequences isolated from bats, dogs and cattle in French Guiana belong to the haematophagous bat-related strains. They cluster in three different groups according to their isolation date. The first group, composed of strains isolated between 1989 and 2003, shows a high percentage of sequence identity within the group (between 98.5% and 100%). They are related to strains identified in Trinidad and Ecuador between 1995 and 2007. The second group of sequences is made up of strains isolated between 1997 and 1999. They show between 99.5 and 100% identity within the group. These strains have a basal position within the clade to which the two sequences identified from bats (AT6 and 09035FRA) belong. Sequences of AT6 and 09035FRA show a high percentage of identity (99.3% in nucleotide) within the group and with a group of haematophagous bat-related viruses identified in Brazil (Pará state) and Peru (99.8% and 99.3%, respectively). Phylogenetically, the most closely related sequences to the two strains identified in French Guiana in 2009 and 2010 are from Peru and the Pará state in Brazil and represent a clade circulating in the North of the Amazonian region (Fig 2). For the G gene, sequences obtained from *Desmodus rotundus* AT6 and from *Artibeus planirostris* 09035FRA show between 98.9 and 99.2% identity with Brazilian strains. Furthermore, they show 97.4 and 97.6% identity, respectively, with strain RABV 9001FRA isolated in French Guiana in 1990 [63]. These sequences are phylogenetically related to G sequences from strains identified in Brazil and isolated from frugivorous bats (*Artibeus lituratus*) (Fig 3). They all belong to the haematophagous bat-related clade.

Serological evidence of RABV circulation, biological and ecological factors influencing seroprevalence

Nine hundred and ninety-five bats (including those captured during vampire monitoring) belonging to 30 species were sampled and analysed to investigate the environmental and bio-ecological factors that could be related to variation in seroprevalence (Table 1).

Positive animals were recorded in 14 out of the 30 species analysed, with specific seroprevalence ranging up to 14% for the vampire species (seroprevalence rates were only calculated for species with $n > 10$ animals) (Table 1). At the family level, Phyllostomidae had a seroprevalence rate of 11.3%, Mormoopidae 11%, and Molossidae 3.3%. Nevertheless, sample sizes showed significant differences, both in terms of the number of samples collected and species richness within these families, thus precluding any relevant conclusions.

Overall, no difference was recorded between genders (10.5% in females vs. 9.9% in males, $\chi^2 = 0.08$, $df = 1$, $p = 0.78$) and both genders also exhibited the similar mean titer (1.0 ± 0.1). No difference was recorded between seasons: 11.9% and 11.7% during the dry and wet season, respectively ($\chi^2 = 0.01$, $df = 1$, $p = 0.92$). The univariate analysis identified diet (haematophagous vs. other types of diet, e.g., omnivorous, frugivorous, insectivorous), type of roosts (generalists species vs. those using specific roosts only such as caves, leaves, trunks), monospecific colonies and forest vegetation as factors favouring positivity. Selecting these factors only for the multivariate logistic regression analysis, two models of comparable relevance were identified. The first model (AIC = 595, BIC = 624) considered diet (haematophagous vs. other diets, $p = 0.003$, OR = 2.15) and vegetation classes (forest habitats vs. disturbed and open areas, $p = 0.0084$, OR = 2.0). The second model (AIC = 598.49, BIC = 626.00) considered the structure of the colonies (monospecific vs. multispecific, $p = 0.007$, OR = 2.1) and the vegetation classes (forest habitats vs. disturbed and open areas, $p = 0.003$, OR = 2.3). Considering these two models, haematophagous diet, monospecific colonies and dense forest habitats favour rabies virus seropositivity.



Fig 2. Phylogenetic tree constructed using Bayesian methods based on 1314 nucleotides of the nucleoprotein gene. Virus names are associated with their accession numbers. Novel sequences generated from the two rabid bats in this study are shown in bold. Support for nodes is provided by the posterior probabilities of the corresponding clades. All resolved nodes have a posterior probability greater than 0.8. Scale bar indicates nucleotide sequence divergence among sequences.

doi:10.1371/journal.pntd.0004378.g002

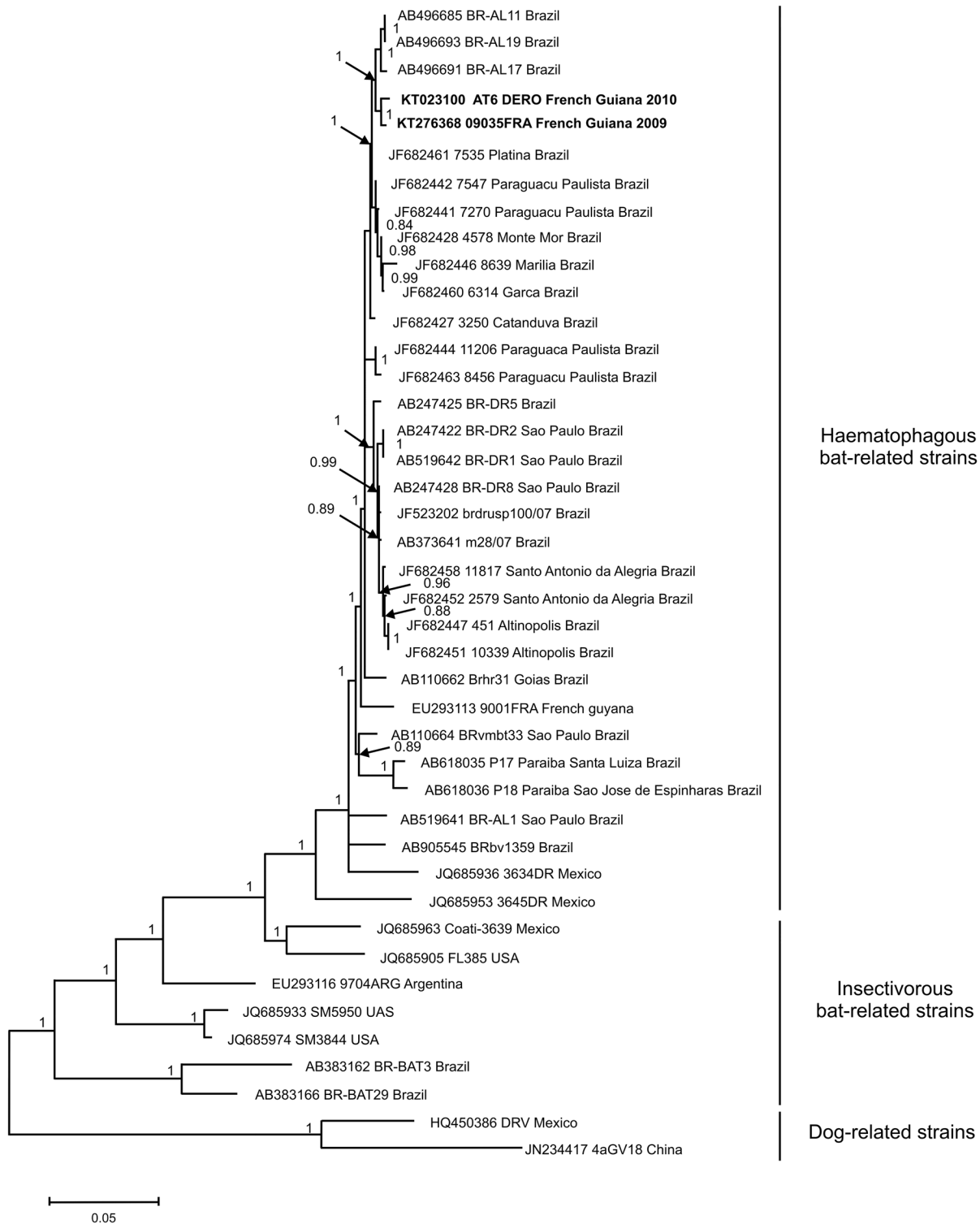


Fig 3. Phylogenetic tree constructed using Bayesian methods based on 1572 nucleotides of the complete glycoprotein gene. Virus names are associated with their accession numbers. Novel sequences generated from the two rabid bats in this study are shown in bold. Support for nodes is provided by the posterior probabilities of the corresponding clades. All resolved nodes have a posterior probability greater than 0.8. Scale bar indicates nucleotide sequence divergence among sequences.

doi:10.1371/journal.pntd.0004378.g003

Temporal variations of serology in the *Desmodus rotundus* vampires

In both caves, repeated visual estimations by two independent observers suggest that the size of the population ranges from 60 to 100 individuals in cave 1 and from 120 to 150 individuals in cave 2. Three hundred and one unique animals were captured over a 4-year period (144 animals in cave 1 and 157 in cave 2), including 279 adults and 22 juveniles (forearm < 55 mm). Among those animals, 33 were recaptured at least once (22 animals in cave 1 and 11 in cave 2) and up to five recaptures were noted for one animal (Table 2). No recapture was observed between the two caves located 25 km apart.

Pooling all juveniles showed an overall prevalence of 4.1% vs. 15% in adults but the low sample size of juveniles precludes detailed investigation and comparison related to age. During this longitudinal study, the first 2-year period showed an increase in the number of recaptured animals, as expected in a closed population, and then fewer captures of previously identified vampires, followed by a new increase. This is indicative of a partial departure of the population present during the first two years and the arrival of a second pool of individuals (Fig 4). Seroprevalence rates varied over time, from 0% to 38% to 0% (cave 1) and from 0% to 47% to 0% (cave 2), and almost concomitantly in the two caves (Fig 4). The increase and decrease in seroprevalence rates were concomitant with the increase and decrease of the recaptured/captured (*i.e.* new animals) ratio, but no mortality was observed.

At the individual level, on the basis of the 33 different animals recaptured, 18 animals were seronegative each time. We observed a positive seroconversion (seronegative to seropositive antirabies status) in six animals, a negative seroconversion in four, while five animals had a positive seroconversion followed by a negative one 6–12 months later (Table 2).

Discussion

In South America, numerous studies have investigated the circulation of RABV through molecular and serological surveys but only a few have focused on wild bat populations in the Amazonian forest region. Combining these two approaches, we conducted (i) a large survey on a wide diversity of habitats, characterized by different levels of specific richness in bat communities [7,64] and (ii) temporal monitoring of vampire colonies. This survey provides new insights into the distribution, circulation and dynamics of the RABV in bats communities from the Amazonian forest region.

High diversity of hosts

The survey reported herein increases the diversity of bat species explored for RABV infection in Amazonia and it demonstrates that a large set of species exhibit antibodies, some of which have not been evidenced before [2,29] such as, *Phylloderma stenops*, *Pteronotus rubiginosus* and *Sturnira tildae*. As can be expected [5], the common vampire *Desmodus rotundus* is the species with higher seroprevalence rates (19.3% in our study), but important differences were noted among sites and time periods. These results are in agreement with those previously reported in several countries such as Trinidad, Grenada and Peru [9,65]. Nevertheless, these rates are far lower than those observed in the Eastern Brazilian Amazon area with values ranging from 38 to 59% depending on the capture sites, which were located near cattle ranching [12]. The particular location of these sites could explain the high seroprevalence observed in these areas where transmission of rabies can be favoured by high vampire bat densities and their concentration around cattle, which may favour increased interactions between animals.

From a phylogenetic viewpoint, all RABV sequences of the N gene detected in French Guiana belong to the clade of haematophagous bat-related strains. Within this clade, two rabies lineages are circulating in French Guiana: (i) one with strains associated with Ecuadorian

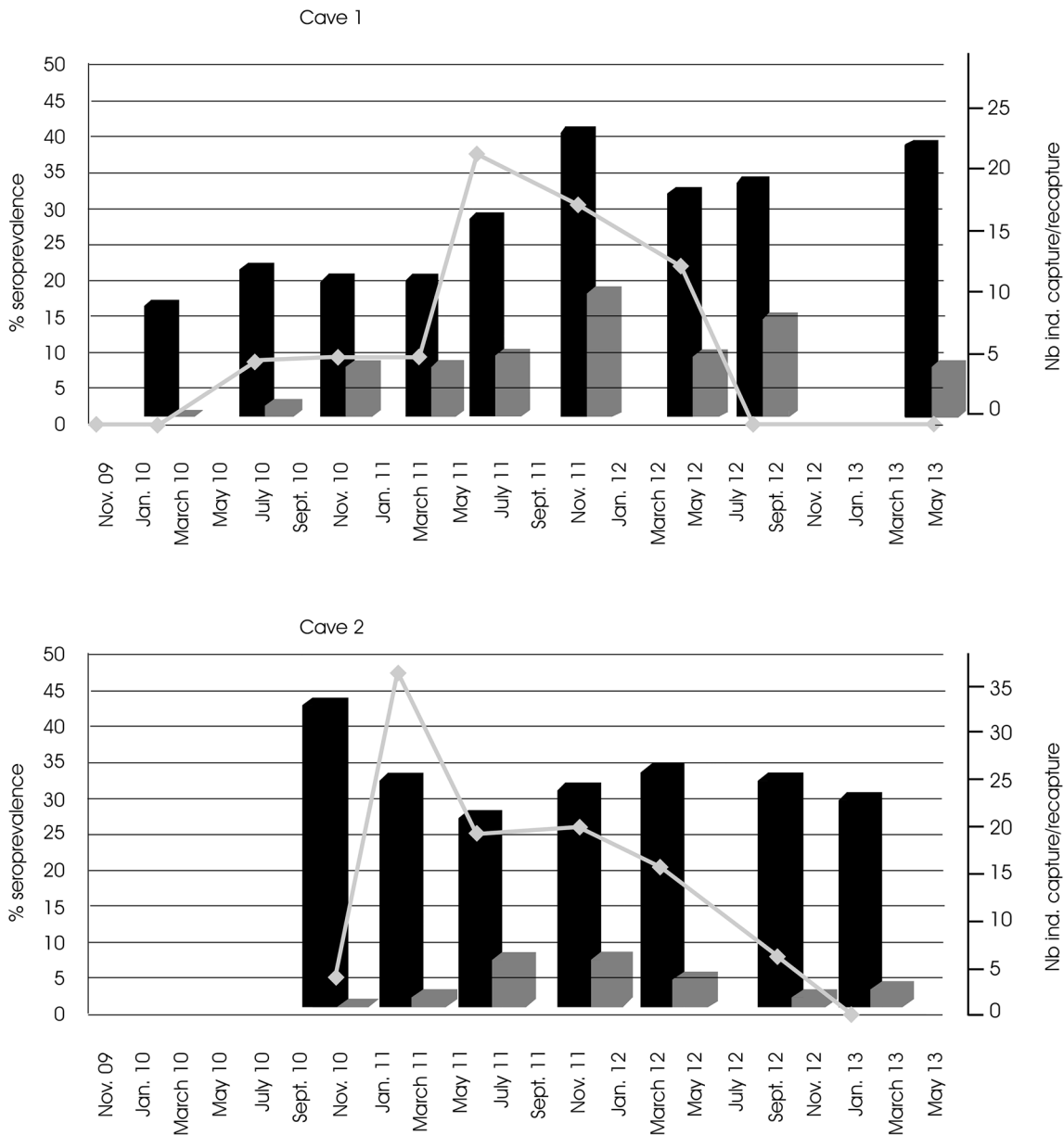


Fig 4. Changes in the percentage of RABV seropositive vampire bats from November 2009 to May 2013 in the two caves and the number of animals captured and recaptured during the same period. Grey line: % of seropositive animals. Black bar: total number of animals captured. Grey bar: number of recaptured animals.

doi:10.1371/journal.pntd.0004378.g004

strains and (ii) the other one with strains from Brazil and Peru. In the latter clade, the N sequences obtained from the two positive bats (*Artibeus planirostris* and *Desmodus rotundus*) fall within "lineage II" of sylvatic rabies strains that circulate within a large geographic range in South America [13]. Indeed, this lineage includes isolates originating from Peru (Cusco department in 2003, Madre de Dios and Puno departments during a human rabies outbreak in 2007), Brazil and Uruguay identified between 2004 and 2008, and now from Northern Amazonia. Furthermore, strains of this lineage could be dispersed *via* several species, such as *Artibeus* and *Desmodus* [35, 66]. Analysis of the G gene also shows that our RABV sequences are phylogenetically closely related to Brazilian strains identified in *Artibeus lituratus*.

Cross-species transmissions have been described to occur in phylogenetically closely related species and, to a lesser extent, have been related to ecological closeness [8]. In French Guiana, only the haematophageous clade has been evidenced, and no strain related to the insectivorous lineages (Fig 3) has been identified, although insectivorous species have been detected as positive in serology.

Factors influencing infection: Importance of habitat and community richness

We observed considerable variations of the seroprevalence rates according to species. The multivariate approach identifies three risk factors for bat infection. The first one is related to habitat, while the two others are related to the bioecology of the species. Forest habitats are associated with a significantly higher risk of positive serology; a similar result was observed in Mexico and attributed to more frequent interspecies interactions in areas of higher species richness [67]. In another Amazonian region, although regional differences have been recorded, no habitat pattern was detected [12]. With the current knowledge of RABV ecology, it is difficult to propose a hypothesis explaining the contribution of the vegetation type in the circulation of the virus. Nevertheless, given the structure of bat communities, with their diversity and richness influenced by forest types and level of habitat disturbance [68], one can envision that the spread of the virus lineages is related to the diversity and dynamics of bat populations and possible spill-overs among species. In agreement with this hypothesis, bats with a more fragmented distribution in South-East Asia were shown to have a lower viral richness [69]. In addition, considering the lower richness of bat communities in disturbed areas, one can observe a lower viral circulation, possibly related to geographic characteristics, which can affect bat dispersal, and transmission of the virus between bat species and colonies [70]. Also, edge effects tend to reduce the diversity of habitats, implying a reduction in the diversity of ecological niches, both for hosts and microorganisms.

The diversity of hosts raises the question of transmission of the virus between individuals from the same species and between species. In the case of multispecific roosts, such as the vampire and the mustached bats (*Pteronotus rubiginosus* and *P. sp. 3*), syntopy in caves could explain the high seroprevalence rates observed. Nevertheless, other species, such as the frugivorous *Artibeus*, with completely distinct ecological requirements, are also infected.

As previously mentioned, cross-species transmission between different bat species in the Americas seems to be correlated with phylogenetic distance between species and to a lesser extent to ecological factors [8]. However, contacts with heterologous rabies variants among bats could induce seroconversion even in the absence of infection, thus impacting the seroprevalence observed. In French Guiana, the bioecological diversity of species exhibiting antibodies suggests that contacts with heterologous rabies variants occur in all forest strata, in most habitats and between species that do not share the same microhabitat and are not in syntopy. The routes and mode of rabies virus exposure between bat species require further investigation, even between phylogenetically closely related species that may use different roosts and/or habitat (canopy, undergrowth, etc.). The possible contacts with rabies virus disseminated in aerosols (presence of rabies in lungs) and/or by other routes of excretion in urine and feces (virus identified in kidneys and stomach) could be suggested [71,72]. Nevertheless, seropositivity can also result from sporadic spillover among different species. Thus, the presence of RABV antibodies in different bat species sharing the same space should not be interpreted as circulation of the virus among these species and does not confirm a reservoir role for them *per se*.

The high prevalence rates observed in forest communities associated with a rather short period of detectable antibodies (see below) suggest frequent infections and re-infections. The

analysis of ecological factors that might affect the infection dynamics observed in European insectivorous bat colonies infected by another lyssavirus, the European bat lyssavirus type 1 (EBLV-1), demonstrated that the seroprevalence was significantly associated with colony size (similar to our study) and species richness (unlike our study). Indeed, the higher seroprevalence percentages were found in large multispecific colonies, suggesting that intra- and inter-specific contacts are major risk factors for EBLV-1 transmission in bat colonies [73].

Temporal variation of seroprevalence in vampires: Enzootic vs. epizootic cycles?

The temporal monitoring of vampire communities contributes new information since the pioneering work [22]. As shown in Peru, we observed considerable temporal variation of seroprevalence, but we did not link this variation to any seasonal or climatic factor. Also, unlike this first study in Peru, we observed that colonies are not stable over time. We cannot exclude a temporary abandonment of the sampled caves because of the disturbances caused by our study, even though we tried to limit the time spent in the caves (the youths were released immediately, we limited light and number of persons for captures, and all samples were collected outside the caves). More likely, however, increases and decreases of recaptures and seroprevalence rates in the two caves argue in favour of both dispersal and movement of individuals between vampire bat colonies and periodic reintroduction of RABV among colonies [73] (Fig 4). In contrast, the high number of apparently healthy and seropositive bats indicates that, at least in a large number of cases, the clinical expression of the virus, if any, is undetectable. Furthermore, some vampires proved to seroconvert during the monitoring period in both ways (Table 2). The question of virus control by the host and/or the ability of the virus to persist in the host need to be further investigated. Finally, high and fluctuating seroprevalence rates and high level of circulation of the virus among individuals, populations and species support an enzootic hypothesis once introduced in a new area [22]. Another hypothesis that seems, until now, less likely is that the virus persists in the host, escaping the immune response, thanks to reactivation phases induced by physiological, biological and ecological constraints. Few other studies have addressed the inter-annual dynamics of lyssaviruses among bat multispecies that are roosting in the same refuge and relate similar fluctuations in the percentage of seropositive bats observed and survival of the bats during the time of the study [56,74,75]. These longitudinal and temporal surveys demonstrate that cyclic lyssavirus infections occur with periodic oscillations, likely controlled by the number of immune and infected bats, and the variable persistence of immunity depending on the host species. These questions on virus control and persistence warrant further investigation.

The emergence risk: Importance of the conservation status of habitats and bat communities

Emergence of viral diseases, including rabies, is classically linked to pressures and threats on natural habitats. Higher seroprevalence rates in areas with cattle ranching attributed to disturbed or deforested areas were evidenced in the Amazonian region [12]. The highest seroprevalence rates we observed in bats living in forest habitats, similar to observations in Mexico [67] corresponding to more preserved areas, contradicted the earlier results reported in Amazonia [12]. In French Guiana, ranching activities are very scarce, with limited deforestation and few edge effects. We therefore hypothesize that, in areas with well-preserved habitats, RABV circulation is mainly maintained in forest areas where food is available for the main prevalent reservoir species (*Desmodus*). This particular context in French Guiana, with no or few human impacts except on littoral areas, could be considered as a “basal” situation of rabies virus

circulation in vampire and other sylvatic bat species. This situation supports an "amplification effect" hypothesis (as described by [76]), which predicts that diversity will increase the circulation of the virus, and underlines the relevance of different ecological factors in determining infection risk in bat populations under different levels of anthropic influence.

Contrasting with other Amazonian and neotropical regions where rabies emergence phenomena are reported (Peru, Ecuador, Mexico) and despite a growing human population, the Northern Amazonian region still faces low deforestation rates. Over the last decade (2000–2012), forest loss was less than 0.2% in French Guiana vs. 1.8% for the Peruvian Amazonia region, 1.4% for Ecuadorian Amazonia and 1.2% for Mexico (data derived from [31]). The good conservation status of forest habitats in French Guiana, and more widely in the region (Suriname, French Guiana, the Brazilian state of Amapa), low human density, rather favourable economic conditions limiting highly unhealthy living conditions, and efforts to provide post-exposure treatment for most of the population [37] likely explain the low to very low occurrence of human rabies cases. Long before spectacular deforestation, human activities may induce the more cryptic and insidious defaunation effect, with a cascade of ecological consequences [77]. One of these is the disappearance of resources for tertiary or secondary consumers, levels in the trophic chain that can include vampires. As predators, populations of vampires that would face quick disappearance of primary resources would have to shift to alternative resources, which in edge habitats could be cattle, domestic animals and humans, with associated crossing of the species barrier by the virus. Comparative use of stable isotopes or blood-meal PCR analyses in both forest and edge populations could help to support this hypothesis. A good forest status, allowing a dilution effect (*sensu* [78]) in highly rich bat communities and the maintenance of large populations of medium-sized and large mammals used as preys by haematophagous bats, should prevent their migration to anthropized areas. However, at a very local scale, even in a well-preserved country, vampire attacks are sometimes recorded in forest settlements such as tourist camps and small Amerindian villages ([37]; A. Lavergne & B. de Thoisy, pers. obs.). These attacks are likely the response to local defaunation processes such as overhunting [79], destruction of a colony's habitat or ecological opportunities such as a human settlement with its associated biomass of mammals. The risk of rabies virus transmission must nevertheless be adequately evaluated. Indeed, two bats of the approximately 1,000 tested (for vampires only, one positive animal out of 261) were positive for RNA and consequently had the potential for spreading and transmitting RABV.

With the identification of an increasing number of bat species potentially implicated in rabies epidemiology, the risk of interaction between bats, livestock, humans and domestic animals must more than ever be considered and further studies are necessary to clarify the role of not only haematophagous bats, but also sympatric and syntopic species. In addition, the role of environmental variables in virus circulation and persistence in hosts and colonies requires further attention. Without a full understanding of the biology of rabies virus in its reservoir, only transversal approaches on ecological, evolutionary, immunological and virological aspects will shed light on infection outcome and disease tolerance in bats and on the risk of transmission to other host species and humans.

Supporting Information

S1 Table. Study sites for bat sampling, French Guiana.

(DOCX)

S2 Table. Sampling dates of common vampire bats for capture / recapture monitoring.

(DOCX)

Acknowledgments

We are grateful to François Catzeflis, Alvaro Aguilar-Setien and Nidia Aréchiga for useful discussions on the biology, ecology and dynamics of bats, and to Sébastien Briolant for statistical analysis. All field volunteers and owners a/o managers of capture sites are warmly acknowledged for their support in captures.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BdT AL VL HB. Performed the experiments: BdT AL ED DD AG RL LD FL. Analyzed the data: BdT HB DP AL. Contributed reagents/materials/analysis tools: BdT MD HB DP FL AS VL AL. Wrote the paper: BdT VL AL HB DP LD MD.

References

1. Vigilato MA, Cosivi O, Knöbl T, Clavijo A, Silva HM. Rabies update for Latin America and the Caribbean. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19: 678–679. doi: [10.3201/eid1904.121482](https://doi.org/10.3201/eid1904.121482) PMID: [23750499](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23750499/)
2. Escobar LE, Peterson AT, Favi M, Yung V, Medina-Vogel G. Bat-Borne rabies in Latin America. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2015; 57: 63–72. doi: [10.1590/S0036-46652015000100009](https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000100009) PMID: [25651328](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25651328/)
3. Da Rosa ES, Kotait I, Barbosa TF, Carrieri ML, Brandão PE, Pinheiro AS, et al. Bat-transmitted human rabies outbreaks, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 1197–1202. PMID: [16965697](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16965697/)
4. Barbosa TF, Medeiros DB, Travassos Da Rosa ES, Casseb LM, Medeiros M, Pereira A de S, et al. Molecular epidemiology of rabies virus isolated from different sources during a bat-transmitted human outbreak occurring in Augusto Correa municipality, Brazilian Amazon. *Virology.* 2008; 370: 228–236. PMID: [17996263](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17996263/)
5. Schneider MC, Romijn PC, Uieda W, Tamayo H, da Silva DF, Belotto A, et al. Rabies transmitted by vampire bats to humans: an emerging zoonotic disease in Latin America? *Rev Panam Salud Publica.* 2009; 25: 260–269. PMID: [19454154](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19454154/)
6. Rupprecht CE, Hanlon CA, Hemachudha T. Rabies re-examined. *Lancet Infect Dis.* 2002; 2: 327–343. PMID: [12144896](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12144896/)
7. Johnson N, Aréchiga-Ceballos N, Aguilar-Setien A. Vampire bat rabies ecology, epidemiology and control. *Viruses.* 2014; 6: 1911–1928. doi: [10.3390/v6051911](https://doi.org/10.3390/v6051911) PMID: [24784570](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24784570/)
8. Streicker DG, Turmelle AS, Vonhof MJ, Kuzmin IV, McCracken GF, Rupprecht CE. Host phylogeny constrains cross-species emergence and establishment of rabies virus in bats. *Science.* 2010; 329: 676–679. doi: [10.1126/science.1188836](https://doi.org/10.1126/science.1188836) PMID: [20689015](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20689015/)
9. Salmón-Mulanovich G, Vásquez A, Albújar C, Guevara C, Laguna-Torres VA, Salazar M, et al. Human rabies and rabies in vampire and non vampire bat species, Southeastern Peru, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15: 1308–1310. doi: [10.3201/eid1508.081522](https://doi.org/10.3201/eid1508.081522) PMID: [19751600](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19751600/)
10. Sodré MM, da Gama AR, de Almeida MF. Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2010; 52: 75–81. PMID: [20464127](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20464127/)
11. de Almeida MF, Martorelli LFA, Sodré MM, Katakoaka PAG, de Rosa AR. Rabies diagnosis and serology in bats from the State of São Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011; 44: 140–145. PMID: [21468481](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21468481/)
12. Costa LJC, Andrade FAG, Uieda W, Martorelli LFA, Kataoaka PAG. Serological investigation of rabies virus neutralizing antibodies in bats captured in the eastern Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013; 107: 684–689. doi: [10.1093/trstmh/trt080](https://doi.org/10.1093/trstmh/trt080) PMID: [24100701](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24100701/)
13. Condori-Condori RE, Streicker DG, Cabezas-Sanchez C, Velasco-Villa A. Enzootic and Epizootic Rabies Associated with Vampire Bats, Peru. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19: 1463–1469.
14. Torres C, Lema C, Gury Dohmen F, Beltran F, Novaro L, Russo S, et al. Phylodynamics of vampire bat-transmitted rabies in Argentina. *Mol Ecol.* 2014; 23: 2340–2352. doi: [10.1111/mec.12728](https://doi.org/10.1111/mec.12728) PMID: [24661865](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24661865/)
15. Pereira Vieira LF, Gonçalves Pereira SRF, Carnieli P Jr., Tavares LCB, Kotait I. Phylogeography of rabies virus isolated from herbivores and bats in the Espírito Santo State, Brazil. *Virus Genes.* 2013; 46: 330–336. doi: [10.1007/s11262-012-0866-y](https://doi.org/10.1007/s11262-012-0866-y) PMID: [23264105](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23264105/)
16. Oliveira R de N, de Souza SP, Lobo RS, Castilho JG, Macedo CI, Carnieli P Jr, et al. Rabies virus in insectivorous bats: implications of the diversity of the nucleoprotein and glycoprotein genes for molecular epidemiology. *Virology.* 2010; 405: 352–360. doi: [10.1016/j.virol.2010.05.030](https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.05.030) PMID: [20609456](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20609456/)

17. Albas A, de Almeida Campos AC, Bastos Araujo D, Seabra Rodrigues C, Sodré MM, Durigon EL, et al. Molecular characterization of rabies virus isolated from nonhaematophagous bats in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011; 44: 678–683. PMID: [22231241](#)
18. Guarino H, Castilho JG, Souto J, Oliveira R de N, Carrieri ML, Kotait K. Antigenic and genetic characterization of rabies virus isolates from Uruguay. *Virus Res*. 2013; 173: 415–420. doi: [10.1016/j.virusres.2012.12.013](#) PMID: [23318595](#)
19. Delpietro H, de Diaz AM, Fuenzalida E, Bell JF. Determination of the rate of rabies attack in bats. *Bol Oficina Sanit Panam*. 1972; 73: 222–230. PMID: [4263044](#)
20. Mungrue K, Mahabir R. The rabies epidemic in Trinidad of 1923 to 1937: an evaluation with geographic information system. *Wilderness Envir Med*. 2011; 22: 28–36.
21. Blackwood JC, Streicker DG, Altizer S, Rohani P. Resolving the roles of immunity, pathogenesis, and immigration for rabies persistence in vampire bats. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110: 20837–20842. doi: [10.1073/pnas.1308817110](#) PMID: [24297874](#)
22. Streicker DG, Recuenco S, Valderrama W, Benavides JG, Vargas I, Pacheco V, et al. Ecological and anthropogenic drivers of rabies exposure in vampire bats: implications for transmission and control. *Proc R Soc B*. 2012; 279: 3384–3392. PMID: [22696521](#)
23. George DB, Webb CT, Farnsworth ML, O’Shea TJ, Bowen RA, Smith DL, et al. Host and viral ecology determine bat rabies seasonality and maintenance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108: 10208–10213. doi: [10.1073/pnas.1010875108](#) PMID: [21646516](#)
24. Streicker DG, Lemey P, Velasco-Villa A, Rupprecht CE. Rates of viral evolution are linked to host geography in bat rabies. *PLOS Patho*. 2012b; 8: e1002720.
25. Moreno J, Baer GM. Experimental rabies in the vampire bat. *Am J Trop Med Hyg*. 1980; 29: 254–259. PMID: [7369444](#)
26. Aguilar-Setién A, Loza-Rubio E, Salas-Rojas M, Brisseau N, Cliquet F, Pastoret PP, et al. Salivary excretion of rabies virus in healthy vampire bats. *Epidemiol Infect*. 2005; 133: 517–522. PMID: [15966107](#)
27. Kobayashi Y, Sato G, Shoji Y, Sato T, Ito T, Miura Y, et al. Molecular epidemiological analysis of bat rabies viruses in Brazil. *J Med Vet Sci*. 2005; 67: 647–652.
28. Velasco-Villa A, Orciari LA, Juarez-Islas V, Gómez-Sierra M, Padilla-Medina I, Flisser A, et al. Molecular diversity of rabies viruses associated with bats in Mexico and other countries of the Americas. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 1697–1710. PMID: [16672396](#)
29. Constantine DG. Bat rabies and other lyssavirus infections. Reston, VA: U.S. Geological Survey Circular 1329; 2009. 68 Available from: National Wildlife Health Center; Madison, WI; RA644.R3C665.
30. Zargar UR, Chishti MZ, Ahmad F, Rather MI. Does alteration in biodiversity really affect disease outcome?—A debate is brewing. *Saudi J Biol Sci*. 2014; 22: 14–18. doi: [10.1016/j.sjbs.2014.05.004](#) PMID: [25561877](#)
31. Hansen MC, Potapov PV, Moore R, Hancher M, Turubanova SA, Tyukavina A, et al. High-Resolution Global Maps of 21st-Century Forest Cover Change. *Science*. 2013; 342: 850–855. doi: [10.1126/science.1244693](#) PMID: [24233722](#)
32. Henry M, Cosson JF, Pons JM. Modelling multi-scale spatial variation in species richness from abundance data in a complex neotropical bat assemblage. *Ecol Model*. 2010; 221: 2018–2027.
33. Gilbert AT, Petersen BW, Recuenco S, Niezgodna M, Gómez J, Laguna-Torres VA, et al. Evidence of rabies virus exposure among humans in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 2012; 87: 206–215. doi: [10.4269/ajtmh.2012.11-0689](#) PMID: [22855749](#)
34. Direccion General de Epidemiologia. Brote de rabia silvestre en la comunidad nativa San Ramón- Yupicusa, distrito Imaza, provincia Bagua, Amazonas— 2011: Situación actual. *Bol Epidemiol (Lima)*. 2011; 20: 138–139.
35. Fahl WO, Carnieli P Jr, Castilho JG, Carrieri ML, Kotait I, Iamamoto K, et al. *Desmodus rotundus* and *Artibeus* spp. bats might present distinct rabies virus lineages. *Braz J Infect Dis*. 2012; 16: 545–551. doi: [10.1016/j.bjid.2012.07.002](#) PMID: [23146155](#)
36. Fernandes ME, Costa LJ, Andrade FA, Silva LP. Rabies in humans and non-human in the state of Pará, Brazilian Amazon. *Braz J Infect Dis*. 2013; 17: 251–253. doi: [10.1016/j.bjid.2012.10.015](#) PMID: [23477765](#)
37. Berger F, Desplanches N, Baillargeaux S, Joubert M, Miller M, Ribadeau-Dumas F, et al. Rabies risk: difficulties encountered during management of grouped cases of bat bites in 2 isolated villages in French Guiana. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7: e2258. PMID: [23826400](#)
38. Meynard JB, Flamand C, Dupuy C, Mahamat A, Eltges F, Queuche F, et al. First human rabies case in French Guiana, 2008: epidemiological investigation and control. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6: e1537. doi: [10.1371/journal.pntd.0001537](#) PMID: [22363830](#)

39. Sikes RS, Gannon WL, A. C. A. U. C. O. T. A. S. O. MAMMALOGISTS. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *J Mammal*. 2011; 92: 235–253.
40. de Thoisy B, Richard-Hansen C, Goguillon B, Joubert P, Obstancias J, Winterton P, et al. Rapid evaluation of threats to biodiversity: human footprint score and large vertebrate species responses in French Guiana. *Biodiv Conserv*. 2010; 19: 1567–1584.
41. Gond V, Freycon V, Molino JF, Brunaux O, Ingrassia F, Joubert P, et al. Broad-scale spatial pattern of forest landscapes types in the Guiana shield. *Int J Appl Earth Obs Geoinf*. 2011; 13: 357–367.
42. Paget D. Etude de la diversité spatiale des écosystèmes forestiers guyanais, Thèse de Doctorat de l'ENGREF, 1999, France.
43. Borisenko AV, Lim BK, Ivanova NV, Hanner RH, Hebert PDN. DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname. *Mol Ecol Res*. 2008; 8: 471–479.
44. Charles-Dominique P, Brosset A, Jouard S. Les Chauves-souris de Guyane. Collection Patrimoines Naturels, Ed MNHN, Paris n°49, pp 172. 2001.
45. Dacheux L, Reynes JM, Buchy P, Sivuth O, Diop BM. A reliable diagnosis of human rabies based on analysis of skin biopsy specimens. *Clin Infect Dis*. 2008; 47: 1410–1417. doi: [10.1086/592969](https://doi.org/10.1086/592969) PMID: [18937576](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18937576/)
46. Ellison JA, Johnson SR, Kuzmina N, Gilbert A, Carson WC, VerCauteren KC, et al. Multidisciplinary approach to epizootiology and pathogenesis of bat rabies viruses in the United States. *Zoonoses Public Health*. 2013; 60: 46–57. doi: [10.1111/zph.12019](https://doi.org/10.1111/zph.12019) PMID: [23137052](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23137052/)
47. Bourhy H, Reynes JM, Dunham EJ, Dacheux L, Larrous F, Huong VT, et al. The origin and phylogeography of dog rabies virus. *J Gen Virol*. 2008; 89: 2673–2681. doi: [10.1099/vir.0.2008/003913-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/003913-0) PMID: [18931062](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18931062/)
48. Delmas O, Holmes EC, Talbi C, Larrous F, Dacheux L, Bouchier C, et al. Genomic Diversity and Evolution of the Lyssaviruses. *PLoS ONE*. 2008; 3: e2057. doi: [10.1371/journal.pone.0002057](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002057) PMID: [18446239](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18446239/)
49. Talbi C, Holmes EC, de Benedictis P, Faye O, Nakouné E, Gamatié D, et al. Evolutionary history and dynamics of dog rabies virus in western and central Africa. *J Gen Virol*. 2009; 90: 783–791. doi: [10.1099/vir.0.007765-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.007765-0) PMID: [19264663](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19264663/)
50. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. 2011; 28: 2731–2739. doi: [10.1093/molbev/msr121](https://doi.org/10.1093/molbev/msr121) PMID: [21546353](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21546353/)
51. Nylander JAA. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, 2004.
52. Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol*. 2012; 61: 539–542. doi: [10.1093/sysbio/sys029](https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029) PMID: [22357727](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22357727/)
53. Bourhy H, Sureau P. Rapid fluorescent focus inhibitions test (RFFIT). In: Commission des Laboratoires de Référence et d'Expertise, editors. Méthodes de Laboratoire pour le Diagnostic de la Rage (in French); Institut Pasteur: Paris, France, 1990. pp. 191–193.
54. Reynes JM, Molia S, Audry L, Hout S, Ngin S, Walston J, et al. Serologic evidence of lyssavirus infection in bats, Cambodia. *Emerg Infect Dis*. 2004; 10: 2231–2234. PMID: [15663870](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15663870/)
55. Ellison JA, Gilbert AT, Recuenco S, Moran D, Alvarez DA, Kuzmina N, et al. Bat Rabies in Guatemala. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8: e3070. doi: [10.1371/journal.pntd.0003070](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003070) PMID: [25080103](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25080103/)
56. López-Roig M, Bourhy H, Lavenir R, Serra-Cobo J. Seroprevalence dynamics of European bat lyssavirus type 1 in a multispecies bat colony. *Viruses*. 2014; 6: 3386–3399. doi: [10.3390/v6093386](https://doi.org/10.3390/v6093386) PMID: [25192547](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25192547/)
57. Almeida MF, Massad E, Aguiar EAC, Martorelli LFA, Joppert AMS. Neutralizing Antirabies Antibodies in Urban Terrestrial Wildlife in Brazil. *J Wildl Dis*. 2001; 37: 394–398. PMID: [11310897](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11310897/)
58. East ML, Hofer H, Cox JH, Wulle U, Wiik H, Pitra C. Regular exposure to rabies virus and lack of symptomatic disease in Serengeti spotted hyenas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 15026–15031. PMID: [11742089](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11742089/)
59. Araujo DB, Martorelli LA, Kataoka AP, Campos AC, Rodrigues CS, Sanfilippo LF, et al. Antibodies to rabies virus in terrestrial wild mammals in native rainforest on the north coast of São Paulo State, Brazil. *J Wildl Dis*. 2014; 50: 469–77. doi: [10.7589/2013-04-099](https://doi.org/10.7589/2013-04-099) PMID: [24779464](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24779464/)
60. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
61. Brosset A, Charles-Dominique P, Cockle A, Cosson JF, Masson D. Bat communities and deforestation in French Guiana. *Can J Zool*. 1996; 74: 1974–1982.

62. de Thoisy B, Pavan AC, Delaval M, Lavergne A, Luglia T, Pineau K, et al. Cryptic diversity in Common Mustached bat *Pteronotus cf. parnellii* (Mormoopidae) in French Guiana and in Brazilian Amapa. *Acta Chiropterologica*. 2014; 16:1–13.
63. Kissi B, Tordo N, Bourhy H. Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene. *Virology*. 1995; 209: 526–537. PMID: [7778285](#)
64. Moratelli R, Dias D, Bonvicino CR. Estrutura e análise zoogeográfica de uma taxocenose de morcegos no norte do Estado do Amazonas, Brasil. *Chiroptera Neotropical*. 2010; 16: 661–671.
65. Price JL, Everard COR. Rabies virus and antibody in bats in Grenada and Trinidad. *J Wildl Dis*. 1977; 13: 131–134. PMID: [864845](#)
66. Mochizuki N, Kobayashi Y, Sato G, Hirano S, Itou T, Ito FH, et al. Determination and Molecular analysis of the complete genome sequence of two wild-type rabies viruses isolated from a haematophagous bat and a frugivorous bat in Brazil. *J Vet Med Sci*. 2011; 73: 759–766. PMID: [21301181](#)
67. Salas-Rojas M, Sánchez-Hernández C, Romero-Almaraz ML, Schnell GD, Schmid RK, Aguilar-Setién A. Prevalence of rabies and LPM paramyxovirus antibody in non-hematophagous bats captured in the Central Pacific coast of Mexico. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*. 2004; 98: 577–584. PMID: [15289094](#)
68. Delaval M, Charles-Dominique P. Edge effects on frugivorous and nectarivorous bat communities in a neotropical primary forest in French Guiana. *Rev Ecol*. 2006; 61: 343–352.
69. Gay N, Olival KJ, Bumrungsri S, Siriaronrat B, Bourgarel M, Morand S. Parasite and viral species richness of Southeast Asian bats: fragmentation of area distribution matters. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2014; 3: 161–170. doi: [10.1016/j.ijppaw.2014.06.003](#) PMID: [25161915](#)
70. Turmelle AS, Olival KJ. Correlates of viral richness in bats (order Chiroptera). *EcoHealth*. 2009; 6: 522–539. doi: [10.1007/s10393-009-0263-8](#) PMID: [20049506](#)
71. Bourhy H, Kissi B, Lafon M, Sacramento D, Tordo N. J. Antigenic and molecular characterization of bat rabies virus in Europe. *Clin Microbiol*. 1992; 30: 2419–26.
72. Scheffer K, Carrieri ML, Albas A, dos Santos HCP, Kotait I, Ito FH. Rabies virus in naturally infected bats in the State of São Paulo, Southeastern Brazil. *Rev Saúde Pública*. 2007; 41: 389–395. PMID: [17515992](#)
73. Serra-Cobo J, López-Roig M, Seguí M, Sánchez LP, Nadal J, Borrás M, et al. Ecological factors associated with European bat lyssavirus seroprevalence in spanish bats. *PLoS ONE*. 2013; 8: e64467. doi: [10.1371/journal.pone.0064467](#) PMID: [23700480](#)
74. Amengual B, Bourhy H, López-Roig M, Serra-Cobo J. Temporal dynamics of European bat Lyssavirus type 1 and survival of *Myotis myotis* bats in natural colonies. *PLoS ONE*. 2007; 2: e566. PMID: [17593965](#)
75. Amengual B, Bourhy H, López-Roig M, Serra-Cobo J. Active monitoring of EBLV infection in natural colonies of the mouse-eared Bat (*Myotis myotis*). *Dev Biol (Basel)*. 2008; 131: 547–553.
76. Kermack WO, G. A. McKendrick AG. A contribution to the mathematical theory of epidemics. Part 3. In further studies of the problem of endemicity. *Proc R Soc Lond (A) Mat*. 1927; 141: 92–122
77. Galetti M, Dirzo R. Ecological and evolutionary consequences of living in a defaunated world. *Biol Cons*. 2013; 163: 1–6.
78. 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: 567–571. PMID: [12525705](#)
79. de Thoisy B, Richard-Hansen C, Peres CA. Impacts of subsistence game hunting on amazonian primates. In: Garber Paul A., Estrada Alejandro, Bicca-Marques Júlio César, Heymann Eckhard W. and Strier Karen B. (eds). *South American Primates: Comparative Perspectives in the Study of Behavior, Ecology, and Conservation*. 2009. Book Series Developments in Primatology: Progress and Prospects, Springer Press, Chap 15, pp 389–412.

Supporting information

Supplemental Table S1. Study sites for bat sampling, French Guiana

Sampling sites	Location (lat/long, d,dd)	Vegetation 1	Biogeography	Disturbance
1. Grotte Parfum	4.06 / -52.64	19	15	0
2. Grotte Caiman	4.56 / -52.18	19	10	4
3. Grotte Mathilde	4.54 / -52.17	19	10	4
4. Grotte Fourgassier	4.61 / -52.17	19	10	4
5. Cacao	4.57 / -52.46	23	9	20
6. Roura	4.73 / -52.32	21	3	25
7. Athanase	4.23 / -52.24	18	16	8
8. Trésor	4.56 / -52.27	19	10	4
9. Paracou	5.23 / -52.94	19	7	20
10. Rémire Montjoly	4.89 / -52.29	22	3	32
11. Lac américain	4.84 / -52.34	21	3	25
12. Paramana	4.81 / -52.33	22	3	30
13. Camp Tigre	4.91 / -52.29	22	3	32
14. Bourda	4.94 / -52.27	22	3	32
15. Pasteur	4.93 / -52.33	22	3	40
16. Saint Georges	3.89 / -51.81	20	16	30
17. Apatou	5.16 / -54.32	20	5	15
18. Molokoi	4.55 / -52.42	19	10	20
19. Montsinery	4.89 / -52.51	23	3	25
20. Roura	4.72 / -52.32	21	3	25
21. Stoupan	4.77 / -52.34	21	3	25
22. Ineri	4.32 / -52.15	21	4	30
23. Chaumière	4.88 / -52.36	22	3	32
24. Macouria	4.97 / -52.49	23	3	25

Vegetation: categories are based on canopy reflectance [41].

Biogeography: categories are based on landscapes and geomorphology units [42].

Disturbance index: the continuous variable is based on index footprint method [40].

Supplemental Table S2. Sampling dates of common vampire bats for capture / recapture monitoring

	Cave 1	Cave 2
Collection dates		-
	06/02/2010	-
	24/07/2010	-
	27/11/2010	06/11/2010
	23/03/2011	20/02/2011
	10/06/2011	18/06/2011
	20/11/2011	26/11/2011
	29/04/2012	18/03/2012
	10/08/2012	08/09/2012
	18/05/2013	27/01/2013
	-	03/09/2013

3.

DIVERSITÉ IMMUNITAIRE DES CHIROPTÈRES

3.1. Environnement, déterminant majeur de l'adaptation ?

A. Résumé de l'étude CMH

Peu d'études ont été menées sur les capacités immunitaires adaptatives, notamment sur la variation génétique et les signatures de sélection naturelle des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) des chiroptères. Le CMH est d'une importance capitale dans les phénomènes de résistance ou de susceptibilité aux maladies. Les interactions hôtes-pathogènes sont des déterminants majeurs de l'extraordinaire polymorphisme de ces gènes. Le but principal de cette étude était de documenter la variabilité génétique du gène *DRB* du CMH de classe II de deux espèces de chauves-souris opportunistes (*C. perspicillata* et *M. molossus*) et une espèce de chauve-souris hématophage (*D. rotundus*). Ces chauves-souris évoluent en sympatrie dans les différents environnements de Guyane (ex. forêts, lisières, zones urbaines). Afin de mieux appréhender les mécanismes impliqués dans le polymorphisme du *DRB* chez ces trois espèces, l'impact de l'habitat sur la composition et la distribution des allèles dans ces populations et sur les signatures de sélection a été étudié. D'autres facteurs évolutifs tels que les processus de recombinaison et la démographie ont également été pris en compte afin de connaître leur implication dans le polymorphisme observé.

Vingt-quatre *C. perspicillata*, 39 *D. rotundus* et 40 *M. molossus* ont été testées pour l'amplification du *DRB* conduisant à la caractérisation de 19 allèles pour *C. perspicillata*, 30 pour *D. rotundus* et 28 pour *M. molossus*. Des individus présentant plus de deux allèles de *DRB* ont été identifiés chez *C. perspicillata* et *D. rotundus*. Les individus appartenant aux espèces *C. perspicillata* et *M. molossus* étaient majoritairement homozygotes tandis que ceux appartenant à l'espèce *D. rotundus* étaient majoritairement hétérozygotes. Un fort polymorphisme a été détecté dans les différentes populations étudiées, quel que soit l'environnement. *A contrario*, les signatures de sélection mises en évidence dans l'étude semblaient caractéristiques des environnements étudiés. De même, les signatures de sélection pouvaient être à la fois caractéristiques de l'environnement et de l'espèce, suggérant alors une réponse locale dépendante des caractéristiques biologiques de chaque espèce.

La diversité du *DRB* a été comparée à celle d'un marqueur neutre mitochondrial (mtDNA D-loop) amplifié sur les mêmes chauves-souris. Des patrons de diversité semblables entre *DRB* et mtDNA D-loop ont été mis en évidence pour *C. perspicillata* et *M. molossus* (*Molossidae*). A l'inverse, les *patterns* de diversité chez *D. rotundus* étaient très différents. L'histoire neutre des populations desmosdines étudiées a également révélé une structuration des populations non retrouvée dans l'histoire fonctionnelle de ces chauves-souris. Aucun événement de recombinaison ou de conversion génique n'a été identifié, écartant le rôle de ces phénomènes dans le polymorphisme observé chez les trois espèces étudiées. Les reconstructions des relations phylogénétiques du *DRB* des trois espèces étudiées avec celles d'autres espèces de chauves-souris d'Amérique a permis de révéler un mode d'évolution trans-spécifique pour certains allèles.

L'étude menée a permis de démontrer la force de l'environnement et des contraintes pathogéniques correspondantes dans la modulation de la diversité du *DRB* chez les chauves-souris. Les différences décelées dans les signatures de sélection ont mis en évidence le rôle du microenvironnement mais aussi celui des caractéristiques biologiques, dont entre autres le régime alimentaire, et par conséquent, le microbiote, dans l'élaboration de la réponse immune. De même, les effets de migrations et d'introgessions de populations ont été identifiés comme forces supplémentaires contribuant au polymorphisme du *DRB* chez *C. perspicillata* et *M. molossus*. Paradoxalement, la structuration génétique des populations observée chez *D. rotundus* ne semblait pas affecter la diversité du *DRB* observée et, chez cette espèce, le facteur environnemental semble être le déterminant majeur de la diversité du *DRB*. L'observation de polymorphisme trans-espèce au sein de la famille des phyllostomidés renforce le scénario du maintien, sur de longues périodes, des allèles de *DRB* par la sélection balancée et de la coévolution hôte-pathogène des chauves-souris.

B.

Article de recherche

Spatial Pattern of Genetic Diversity and Selection in The MHC

Class II *DRB* of Three Neotropical Bat Species

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Spatial pattern of genetic diversity and selection in the MHC class II *DRB* of three Neotropical bat species

Arielle Salmier¹, Benoit de Thoisy¹, Brigitte Crouau-Roy², Vincent Lacoste¹ and Anne Lavergne^{1*}

Abstract

Background: Although bats are natural reservoirs of many pathogens, few studies have been conducted on the genetic variation and detection of selection in major histocompatibility complex (MHC) genes. These genes are critical for resistance and susceptibility to diseases, and host–pathogen interactions are major determinants of their extensive polymorphism. Here we examined spatial patterns of diversity of the expressed MHC class II *DRB* gene of three sympatric Neotropical bats, *Carollia perspicillata* and *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae), and *Molossus molossus* (Molossidae), all of which use the same environments (e.g., forests, edge habitats, urban areas). Comparison with neutral marker (mtDNA D-loop) diversity was performed at the same time.

Results: Twenty-three *DRB* alleles were identified in 19 *C. perspicillata*, 30 alleles in 35 *D. rotundus* and 20 alleles in 28 *M. molossus*. The occurrence of multiple *DRB* loci was found for the two Phyllostomidae species. The *DRB* polymorphism was high in all sampling sites and different signatures of positive selection were detected depending on the environment. The patterns of *DRB* diversity were similar to those of neutral markers for *C. perspicillata* and *M. molossus*. In contrast, these patterns were different for *D. rotundus* for which a geographical structure was highlighted. A heterozygote advantage was also identified for this species. No recombination or gene conversion event was found and phylogenetic relationships showed a trans-species mode of evolution in the Phyllostomids.

Conclusions: This study of MHC diversity demonstrated the strength of the environment and contrasting pathogen pressures in shaping *DRB* diversity. Differences between positively selected sites identified in bat species highlighted the potential role of gut microbiota in shaping immune responses. Furthermore, multiple geographic origins and/or population admixtures observed in *C. perspicillata* and *M. molossus* populations acted as an additional force in shaping *DRB* diversity. In contrast, *DRB* diversity of *D. rotundus* was shaped by environment rather than demographic history.

Keywords: MHC, *DRB* polymorphism, Selection, *Carollia perspicillata*, *Desmodus rotundus*, *Molossus molossus*

Background

Regarding adaptation to infectious diseases, genes of the major histocompatibility complex (MHC) are the most commonly studied in mammals. MHC genes play a significant role in the functionality and effectiveness of the immune response of vertebrates and are directly involved in fitness and adaptation of hosts to their pathogens [1]. Therefore, studying MHC gene diversity in non-model animals, known to be reservoirs of pathogens, is a critical tool to assess its evolutionary process and implication in

(1) the variation of individual fitness, (2) population viability and (3) evolutionary potential in a changing environment [2]. Studies have essentially focused on the genetic variability of exon 2 of the MHC class II *DR beta* (*DRB*) gene given that this exon encodes the peptide-binding region (PBR) [1]. Hence, most of the variability displayed is recorded on this exon. Variations within the PBR define the repertoire of antigenic determinants and subsequently the ability to recognize a variable number of circulating pathogens [3]. Optimum resistance to pathogens is, therefore, the result of all intrinsic and extrinsic factors that influence the genetic variability of individuals' immune system [4]. Most of the vertebrate populations studied so far exhibited high levels of MHC diversity both

* Correspondence: alavergne@pasteur-cayenne.fr

¹Laboratoire des Interactions Virus-Hôtes, Institut Pasteur de la Guyane, 23 avenue Pasteur, BP 6010, 97306 Cayenne, Cedex, French Guiana
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2016 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

in the number of alleles and in their heterozygosities and allelic variation [5–8]. Pathogen-driven balancing selection and sexual selection seem to play a fundamental role in the preservation of this high level of polymorphism [2]. Pathogen-driven balancing selection acts through antagonistic host–parasite coevolution *via* several mechanisms: overdominant and frequency-dependent selection [9], as well as spatial and temporal variation in host pathogens [10]. Sexual selection pressures encompass mechanisms such as maternal–fetal interactions [11] and mate selection [12]. However, when assessing the genetic variability of both neutral markers and MHC genes, studies have highlighted the role of past demographic processes (e.g., fragmentation, bottlenecks, geographic isolation) in shaping the pattern of MHC variability that can sometimes surpass that of natural selection [13–18].

Local immunogenetic adaptation of hosts that live in different environments was associated with different parasite and pathogen pressures [19–22]. Indeed, differences in the diversity of pathogens (inducing different selection pressures on the hosts) are directly linked to environmental components. These latter (e.g., vegetation cover and density, landscape fragmentation, human occupation) modulate parasite and pathogen species richness, their survival and adaptability, as well as their distribution, transmission, developmental success and their ability to induce diseases [23]. Environmental components likewise impact the richness, population dynamics, immunocompetence and nutritional status of host species, all of which subsequently determine resistance or susceptibility to disease [24, 25]. A strong correlation was also shown between host and parasite species richness, their life history and ecological traits [26–28]. Moreover, anthropogenic alterations of habitats induce changes in host–pathogen–environment interactions and are consequently linked to the emergence of infectious zoonotic diseases [29–31]. Therefore, considering the role of the environment is critical for the assessment of MHC gene variability.

Bats (*Chiroptera*) are the second largest species-rich mammalian order, accounting for 20 % of all mammal species in the world. Compared to other mammals, their uncommon biological features (e.g., ability to fly, long lifespan, complex social structures) and their long-term evolutionary history with pathogens make them excellent reservoirs and spreaders of viruses (e.g., rabies virus, henipaviruses, coronaviruses), which have a significant impact on both human and animal health [32]. However, bats rarely exhibit clinical or pathological signs of diseases and appear to coexist with their pathogens in a disease-free state, characteristic of reservoir hosts [33]. At the order level, the monophyly of *Chiroptera* was evidenced *via* phylogenetic relationships inferred from intron sequences of *DRB* [34]. The monophyletic origin of *DRB* genes was also evidenced at the family level *via*

phylogenetic relationships inferred from *DRB* sequences from *Saccopteryx bilineata*, *Myotis* spp., *Noctilio* spp. and *Carollia perspicillata* [35]. Other studies, investigating the diversity of MHC *DRB*, showed significant differences in the polymorphism of MHC genes between species. This polymorphism was essentially influenced by (1) a pathogen-driven selection [36], (2) a social structure driven by MHC-mediated post-copulatory mechanisms [37], (3) diversifying selection and recombination events [35, 38] and (4) geographical constraints resulting in spatial variation of pathogen-mediated selection and enhanced susceptibility to environmental changes [39, 40].

The Amazon, a major biodiversity hotspot in South America, possesses a large diversity of bat species and pathogens in a wide variety of climates and vegetation formations [41, 42]. French Guiana, a tropical Amazonian region near the equatorial zone, harbors a great diversity of bats, with 103 species registered [43]. In this region, the impact of deforestation on the composition and dynamics of bat communities was assessed [44, 45] as well as, the role of habitats on rabies virus circulation and maintenance [46].

In this study, we analyzed the genetic variability of the expressed MHC class II *DRB* exon 2 in three bat species: two Phyllostomidae, *Carollia perspicillata* and *Desmodus rotundus*, and one Molossidae, *Molossus molossus*. These three widely distributed species have ecological plasticity and tolerance to disturbance. In French Guiana, these species are sympatric and use the same habitats (e.g., forests, edge habitats, and urban areas).

The key hypothesis of this study was that composition and distribution of MHC *DRB* alleles were specific to the environments (forests *vs.* disturbed areas), rather than randomly distributed in space. Consequently, we should observe local immunogenetic adaptation to the contrasting pathogen pressures or equally adapted alleles. To assess which are the best factors that predict the MHC diversity, pathogen-mediated selection, recombination, gene conversion, demographic history and population structure were investigated.

There is a higher diversity of microorganisms in forest environments, compared to disturbed environments, due to greater host species richness and better transmission-promoting parameters [47, 48]. For this reason, we expect higher levels of MHC diversity in forest environments facing lower disturbance pressures, where higher parasite and pathogen diversities imply a higher selection pressure. Furthermore, assuming that bats using the same roosting area and/or the same foraging areas would be subjected to similar pathogen pressures, we should observe similar trends in intra- and inter-specific MHC diversity. In contrast, once the demographic neutral genetic histories—which may also influence MHC diversity—are controlled, we should

observe differences in selective histories between bats inhabiting different environments.

To identify different signatures of selection in the *DRB* exon 2, which would imply area-specific recognition capabilities, conformation of the *HLA-DRB1* was used as a reference to detect putative sites directly involved in antigen binding (ABS) and consequently subjected to selection. Additionally, to reduce the misidentification bias of ABS, the selection signature within the PBR was investigated without *a priori* identifying species-specific ABS for further comparisons.

MHC genes exhibit high levels of allele similarity within species as well as between related species and the occurrence of identical MHC alleles in related species is frequent. Convergence and trans-species polymorphism are thought to be responsible for this trans-species evolution. To highlight which of these two mechanisms acts predominantly on the evolutionary history of the *DRB* gene in the three species investigated, phylogenetic relationships were inferred from the *DRB* sequences obtained here and with other available chiropteran sequences. Finally, MHC spatial diversity was compared to that of neutral markers (mtDNA D-loop) to highlight the impact of demographic processes and population structure on the diversity pattern in the three bat species investigated.

Methods

Ethics statement

Animals were captured, handled, sampled and, whenever necessary, euthanized following ASM guidelines [49] under the supervision of researchers who had been granted the French “Expérimentation animale niveau 1” diploma. Bats are not protected by law in French Guiana; however, the project was submitted to the Conseil Scientifique Régional pour le Patrimoine Naturel de la Guyane and approved. Captures that occurred within protected areas (nature reserves) received approval by the Conseil Scientifique Régional du Patrimoine Naturel on 26 January 2010 and ad-hoc authorizations (no. 2011-35 dated 05/30/2011, no. 35 and 59 obtained on 03/21/2013 and 04/17/2013, respectively, and delivered by the Prefecture of French Guiana).

Study areas, sample collection, DNA and RNA extraction

The three bat species (*C. perspicillata*, *D. rotundus* and *M. molossus*) were sampled at 14 sites. Three sites were located in pristine lowland forests (PF sites) with low disturbance pressure, four sites were located in edge habitats (EH sites), five in anthropized areas (AA sites), and two in urban and periurban areas (UR sites) (Fig. 1, Additional file 1: Table S1 and Additional file 2: Figure S1).

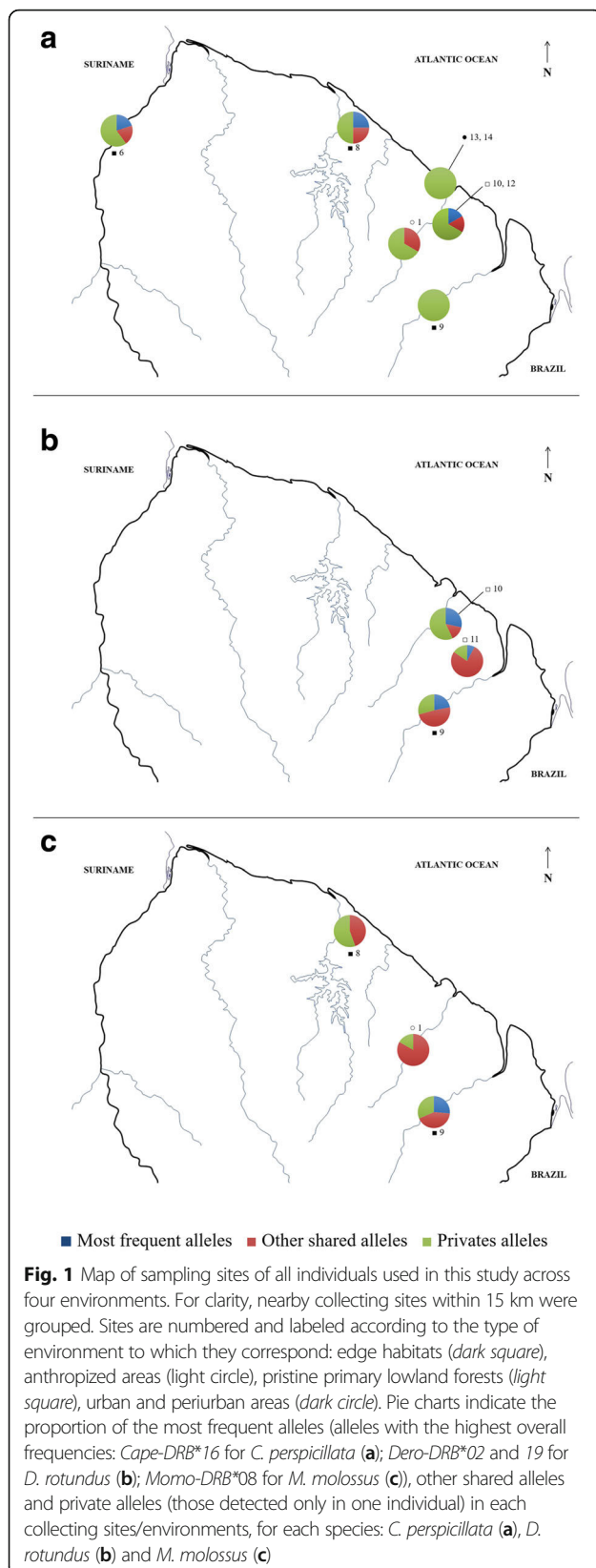
Bats were trapped with mist nets erected near breeding sites, roosts, at forest edges, around livestock, or

through putative foraging courses. Bat species were identified in the field using external morphology and, prior to release, a brachial vein puncture and wing biopsies were performed. A few individuals captured were euthanized at the laboratory to collect organs. A total of 45 *C. perspicillata*, 59 *D. rotundus* and 42 *M. molossus* were sampled.

Nucleic acids were extracted from blood, liver or spleen depending on sampling. Extractions were performed using the NucliSENS easyMAG bio-robot (bioMérieux®).

Amplification and genotyping of the MHC class II DRB gene

All amplifications of MHC *DRB* genes for the three species were performed using cDNA obtained from liver and spleen RNAs. All cDNAs were synthesized using SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen) and random hexamers (Roche) following the manufacturer's recommendations. Expressed MHC *DRB* genes of the three bat species were amplified by a minimum of two independent polymerase chain reactions (PCRs) using a standard procedure with the AmpliTaq Gold DNA Polymerase PCR kit (Thermo Fisher Scientific). To optimize the detection of different alleles, a minimum of two distinct PCRs per individual were performed. Species-specific primers were designed for *C. perspicillata* and *D. rotundus* to avoid occurrence of non-amplifying alleles (Table 1). To amplify the *M. molossus DRB* gene, primers designed by Richman *et al.* [39] were modified. Primers located in conserved parts of exon 1 (JSex1.5, [37]; EX1Fd, modified from [39]), exon 2 (JS2Cape, [37]), exon 3 (EX3Rd, modified from [39]) and exon 4 (L729, [50]) were used to amplify functional MHC class II *DRB* alleles from the cDNA of three bats from each species, *C. perspicillata*, *D. rotundus* and *M. molossus*. The sequences obtained were used to design specific primers complementary to conserved parts of exon 1 (BatCMHIIF (F) and BatCMHIIF.1 (F1), Table 1) and exon 4 (BatCMHIIR (R) and BatCMHIIR.1 (R1), Table 1). The primer combinations F-R and F1-R1 were used as the first PCR for *D. rotundus* and *C. perspicillata* (Additional file 3: Figure S2). For the second PCR, all of the newly designed primers were used together with JSex1.5, EX1Rd, EX3Rd and L729 in different combinations to screen the cDNA of a total of 24 *C. perspicillata* and 39 *D. rotundus* (Additional file 3: Figure S2). Two different primer combinations with JS2Cape, EX3Rd, R and R1 were used to amplify the *DRB* alleles from the cDNA of 40 *M. molossus* (Additional file 3: Figure S2). The PCR products were cloned using the pCR™4-TOPO® TA CLONING® KIT (Invitrogen). Ten clones per PCR amplification were sent for sequencing to Beckman Coulter Genomics (Takeley, UK) using T7 and T3 primers.



Amplification and sequencing of the mtDNA D-loop

All amplifications of mitochondrial DNA (mtDNA) control region (D-loop) for the three species were performed using genomic DNA. The primers F(mt) and P(mt) [51] were used to amplify the hypervariable domain HVI of mtDNA D-loop. PCRs were performed using a standard procedure with BIOTAQ™ DNA Polymerase PCR kit (Bioline). Sequencing was carried out by Beckman Coulter Genomics (Takeley, UK) using F(mt) and P(mt) primers.

Sampling analysis

To assess the environmental impact on the MHC class II *DRB* diversity, the data were analyzed according to the location of the capture sites and the type of environment at these sites. For *D. rotundus* and *M. molossus*, each capture site corresponded to one environment type. *D. rotundus* sampling sites corresponded to two different roots (Cave F (CF) and Cave M (CM)), considered as PF sites, and one foraging area (Saut Athanase (SA)), an EH site (Fig. 1, Additional file 1: Table S1). *M. molossus* individuals were captured in one foraging area (Cacao (CC)), an AA site, and two different roosts located at the EH site with different disturbance levels: Paracou (PA) with a high level of disturbance and the SA site with a low level of disturbance (Fig. 1, Additional file 1: Table S1). *C. perspicillata* individuals were captured in the four types of environments PF, EH, AA and UR (Fig. 1, Additional file 1: Table S1). To explore the potential bias induced by the spatial structure of collecting sites in *C. perspicillata* samples, spatial structure was compared with environment structure.

Data analysis

Sequences were edited using GENEIOUS R6 [52]. DNA sequences were aligned using the MAFFT alignment tool [53] included in the software. Sequences were confirmed as MHC class II *DRB* and mtDNA D-loop by homology analysis using the NCBI BLAST search [54]. A *DRB* clone sequence was regarded as valid if the following criteria were met: (1) incidence in at least two independent PCRs either from the same individual or different ones, or amplification by two different primer pairs, and (2) identified by at least three identical clones [55]. Haplotypes were reconstructed for each bat species using the DNASP 5 [56]. As proposed by [57], the nomenclature of MHC alleles for non-human species was used: to each allele a prefix (the first two letters of the genus and the species names) was given, with the serial number attached as follows: *Cape-DRB* for *C. perspicillata*, *Dero-DRB* for *D. rotundus* and *Momo-DRB* for *M. molossus*. *Cape-DRB* alleles identified in this study were named after the 15 alleles previously described by [35].

Table 1 PCR primers used to amplify MHC class II DR *beta* loci in the three species investigated: *C. perspicillata*, *D. rotundus* and *M. molossus*

Primers	Code ^a	Position ^a	5' to 3' Sequence	Designed for	Source
BatCMHIIF	F	Exon 1	GATHCTGTGGYACTGAGC	<i>D. rotundus</i>	This study
BatCMHIIF.1	F1	Exon 1	TGGTGATMCTGTTGGCACTGAGC	Bats	This study
EX1Fd ^b	X1	Exon 1	CTGWTGGYACTGAGCCCTCYCTGGCT	<i>Myotis</i> sp.	Richman et al. [39]
JSex1.5-DRB	JS1	Exon 1	KGGGCCAGRGRACACCA	Bats	Schad et al. [35]
JS2Cape-DRB	JS2	Exon 2	AGTGCTAKTWTCCAACSGGAC	<i>C. perspicillata</i>	Schad et al. [35]
EX3Rd ^b	X3	Exon 3	CAGSAGTTGTGGTGTGCAG	<i>Myotis</i> sp.	Richman et al. [39]
BatCMHIIR	R	Exon 4	TTCAGACTGYGCCCTCCAYT	<i>D. rotundus</i>	This study
BatCMHIIR.1	R1	Exon 4	CAGACTGYGCCCTCCAYTCCA	Bats	This study
DRB-L729	L729	Exon 4	ACTCAMCATCTTGTCTGTG	Mammals	Bowen et al. [50]

^asee Additional file: Figure S2, ^bPrimer modified from Richman et al. [39] to amplify the exon 2 of MHC class II DRB gene

Sequence diversity

Allele frequencies (F), proportion of segregating sites (S), nucleotide diversity (π), observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosities, and gene diversity (H_D) were estimated using ARLEQUIN 3.5 [58]. Allelic richness (R), with a correction for sample size using a rarefaction method and inbreeding coefficients (F_{IS}) were calculated using FSTAT 2.9. [59]. The mean number of differences between nucleotide and amino acid alleles were counted using MEGA 6.06 [60]. Analyses were performed per species for the entire dataset, and for each environment subgroup separately.

Gene conversion and recombination events

Evidence of genetic recombination or gene conversion events between DRB sequences was assessed using GENECONV 1.81a [61]. This program detects lengthy patterns shared between sequences despite the existence of a pronounced polymorphism. P -values were determined from both global and pairwise permutation tests, with 10,000 replicates. No mismatches between fragments were accepted, and global p -values were corrected for multiple comparisons ($g_{scale} = 0$). Recombination breakpoints were identified using the GARD and SBP algorithms [62] implemented in the HyPhy package [63], available in the standard Datamonkey analysis library (<http://www.datamonkey.org/>, Delpont et al. [64]).

Codon-based analysis of positive selection

Putative antigen-binding sites (ABS) were identified by comparison with the human ABS of the *HLA-DRB1* [65]. The relative rates of d_N and d_S substitutions were calculated for putative ABS, non-ABS and all codons following the method of Nei and Gojobori with the Jukes and Cantor correction for multiple hits [66, 67]. A Z-test was performed to assess the deviation of the d_N/d_S (ω) ratio from 1.0. These tests were performed using MEGA 6.06.

Codons potentially subjected to positive selection were further identified with no *a priori* assumption of ABS. For this purpose, two maximum-likelihood (ML) frameworks were carried out as proposed by [68]. First, two alternative models comprised in the CodeML Program included in the PAML package version 4.7 were executed [69]. The first one (M7) allows codons to evolve either neutrally ($\omega = 1$) or under purifying selection ($\omega < 1$), while the second one (M8) considers a class of sites under positive selection ($\omega > 1$). These models were compared with a likelihood ratio test (LTR; $2\Delta l = 2l_1 - l_0$) with two degrees of freedom ($\alpha = 0.05$) [70]. As previously described, each analysis was run twice, with starting ω values of 0.5 and 1.5, to ensure convergence [68]. The $F3 \times 4$ model of codon frequencies was assumed for all analyses. The amino acids positively selected were identified using the Bayes empirical Bayes approach (BEB), as recommended by Yang [71], with the cutoff posterior probability set at 90 %. Secondly, five ML methods proposed in the HyPhy package were used. For all analyses, the best fitting nucleotide substitution model was assessed with the automatic model selection tool available on the server. A single likelihood ancestor counting (SLAC) model was used to detect evidence of the non-neutral evolution of the DRB gene [72]. Based on ancestral reconstruction, this model counts d_N and d_S changes at each codon position in a phylogeny. Fixed (FEL) and random effects likelihood (REL) models were performed to estimate the ω ratio on a site-by-site basis [72]. For the FEL model, ω ratios were estimated with an *a priori* distribution of rates across sites, while this distribution was determined by the present data for the REL model. An internal FEL (IFEL) model was carried out to highlight selection pressure at the population level (i.e., along internal branches). Finally, a mixed effects model of evolution (MEME) was performed to highlight both diversifying and importantly episodic selection at individual sites [73]. Codon positions were regarded as candidates for positive selection if the following two

criteria were met: (1) p -values < 0.1 for SLAC, FEL, IFEL and MEME and (2) Bayes Factor > 50 for REL. Accordingly, only sites identified as being under positive selection by at least two approaches were considered [68]. Analyses were performed per species for the entire dataset and for each environment subgroup separately.

Genetic differentiation and past population dynamics

For both neutral and functional markers, the genetic differentiation (F_{ST}) among environment subgroups and collecting sites was calculated through an implementation of analysis of molecular variance (AMOVA; 10,000 permutations) using ARLEQUIN 3.5.

Isolation-by-distance (IBD) was examined with the web service IBDWS v.3.23 (<http://ibdws.sdsu.edu/~ibdws/>; [74]) by assessing the statistical significance of the correlation in a Mantel test with 30,000 permutations. The quantity $F_{ST}/(1 - F_{ST})$ was used as a genetic distance according to Rousset [75]. Geographic distances between populations were determined from GPS coordinates recorded at each collecting site.

To add a measurement of relationships between alleles at the intraspecific level, haplotype networks were constructed for each species using the parsimony statistical algorithm TCS implemented in PopArt 1.7 [76].

A Bayesian skyline plot was used to investigate changes in effective population size (N_e) over time with Beast 1.8.1 [77], using mtDNA D-loop data only. Markov Chain Monte Carlo samples were based on 2×10^7 generations, logging every 200 steps, with the first 2,000,000 generations discarded as the burn-in. The best-fitted model HKY + G was used with a relaxed molecular clock. The number of stepwise changes in N_e was set at five.

MHC class II DRB phylogeny

Phylogenetic relationships and trans-species polymorphism between DRB alleles were inferred using a Bayesian inference approach implemented in MrBayes 3 [78]. The *HLA-DRB1* sequence (accession number: NG_029921) was used as outgroup. The GTR + G + I model was selected as the best-fitted model of nucleotide substitution using jModelTest 2 [79, 80] under corrected Akaike information criteria (AICc). The program was run 10×10^7 generations, with a sampling frequency of 500 and a 25 % burn-in. Validation of the inference was assessed based on the standard deviation of split frequencies, less than the expected threshold value of 0.01.

Results

DRB sequence characterization

One hundred and three bats (24 *C. perspicillata*, 39 *D. rotundus* and 40 *M. molossus*) were tested for the amplification of MHC DRB using cDNA. PCR product sizes ranged from 357 bp to 600 bp, for both *C. perspicillata*

and *D. rotundus* and covered all of exon 2 (267 bp in length) (Additional file 3: Figure S2). For *M. molossus*, we successfully amplified 244 bp, excluding primers, of exon 2. We successfully obtained 674 MHC DRB-like fragments from 97 bats (148 MHC DRB-like fragments for 22 *C. perspicillata*, 311 for 36 *D. rotundus* and 215 for 39 *M. molossus*, Additional file 1: Table S2). Based on BLAST searches, sequences showed homologies to only DRB loci.

Considering validation criteria, 480 sequences were validated, corresponding to 82 bats (Additional file 1: Table S2). One hundred and ten sequences were validated for 19 *C. perspicillata*, corresponding to 23 *Cape-DRB* alleles (previously reported *Cape-DRB*05*, GenBank accession number: JQ388834, and *Cape-DRB*16-37*; GenBank accession numbers: KU896612–KU896633; Additional file 1: Table S3). Two hundred and thirty-three sequences were validated for 35 *D. rotundus*, corresponding to 30 *Dero-DRB* alleles (*Dero-DRB*01-30*; GenBank accession numbers: KU896562–KU896591; Additional file 1: Table S4). One hundred and forty-seven sequences were validated for 28 *M. molossus*, corresponding to 20 *Momo-DRB* alleles (*Momo-DRB*01-20*; GenBank accession numbers: KU896592–KU896611; Additional file 1: Table S5). All amino acid sequences were unique.

A maximum of three transcribed alleles per individual was detected in one *C. perspicillata* and two *D. rotundus* individuals (Additional file 1: Tables S3 and S4). No more than two transcribed alleles were identified in *M. molossus* samples (Additional file 1: Table S5).

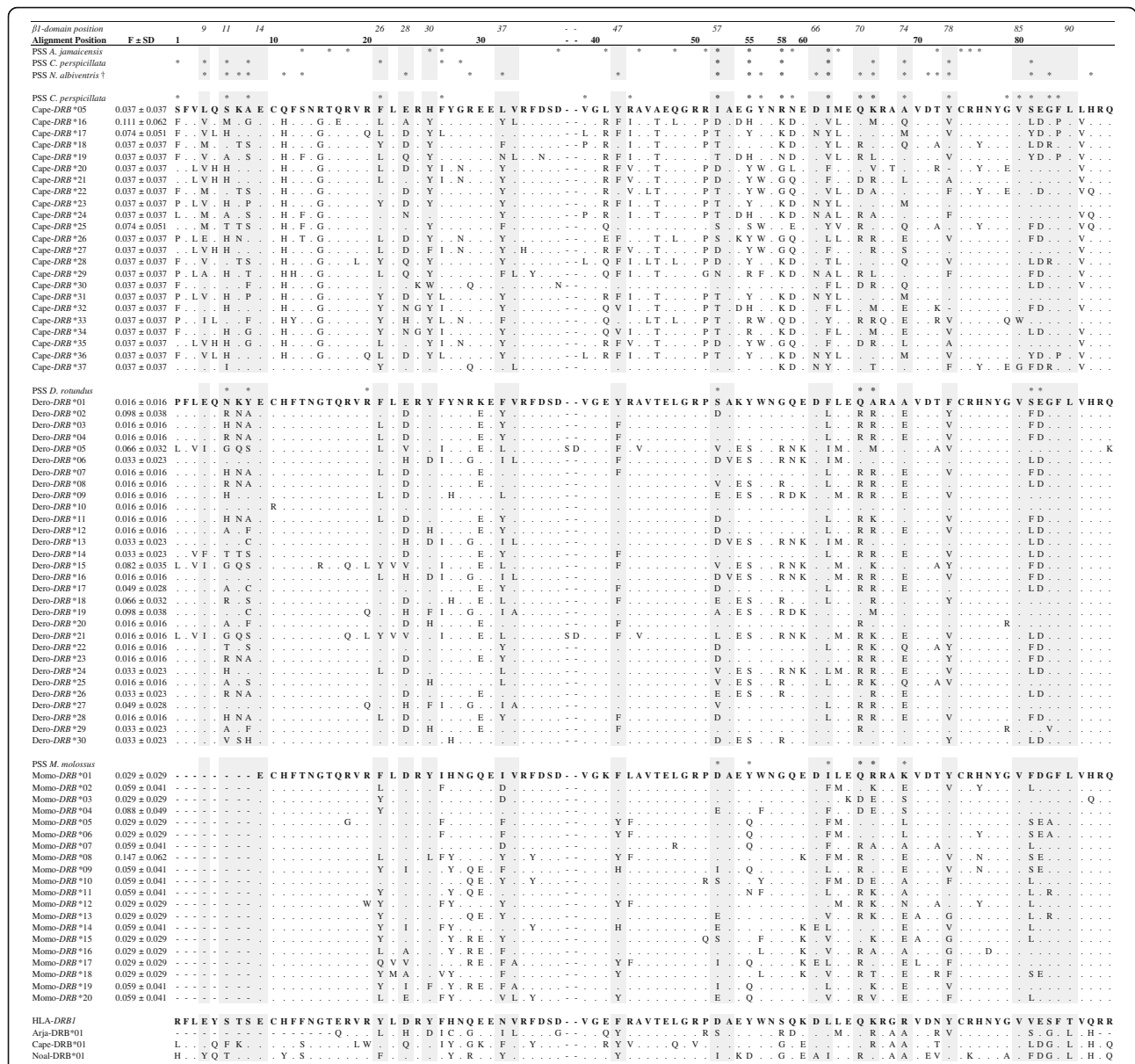
All sequences showed BLAST homology with the *HLA-DRB1* locus (accession number: NG_029921), with a maximum of 85 % nucleotide identity and 75 % amino acid identity. The percentage of nucleotide and amino acid identity with other bat species (*S. bilineata*, *M. davidii*, *C. perspicillata* and *N. albiventris*) was above 87 % and 75 % for all transcripts, respectively.

Detection of indels

Two alleles (*Cape-DRB*20* and *32*) presented a 3-bp deletion at position 217–219 of the nucleotide alignment (Fig. 2). These single-codon indels did not induce a frame-shifting mutation or a stop codon. Bats carrying these alleles were heterozygotes and found in EH and UR environments. Two other alleles (*Dero-DRB*05* and *Dero-DRB*21*) presented a 6-bp insertion at position 115–120 of the alignment. These two-codon indels – one serine (S) and one asparagine (D) – did not alter the reading frame. *Dero-DRB*05* was carried by four bats, all captured in SA, with one homozygote. *Dero-DRB*21* was carried by one heterozygote bat captured in CF. No indel event was detected for *M. molossus*.

mtDNA D-loop sequence characterization

We amplified the first hypervariable segment (HVI) of the mitochondrial DNA (mtDNA) control region (D-loop) for



the 146 bats tested. We obtained a 291-bp alignment for *M. molossus*, a 340-bp alignment for *C. perspicillata* and a 359-bp alignment for *D. rotundus*. Thirty-nine mtDNA D-loop haplotypes were identified for *C. perspicillata* (45 individuals, Genbank accession numbers: KU896735–KU896779), 29 for *M. molossus* (42 individuals, Genbank accession numbers: KU896693–KU896734) and only five for *D. rotundus* despite the high number of sequenced

individuals (59 individuals, Genbank accession numbers: KU896634–KU896692) (Table 2).

DRB allelic diversity

Overall, *C. perspicillata* presented the highest values of allelic richness ($R = 23.000$), number of segregating sites ($S = 114$), nucleotide diversity ($\pi = 0.140 \pm 0.070$), gene diversity ($H_D = 0.986$) and mean nucleotide and amino

Table 2 The MHC class II DR *beta* (exon 2) allelic diversity in 19 *C. perspicillata*, 35 *D. rotundus* and 28 *M. molossus*

Species	Site	n	#	R	S	$\pi \pm SD$	Mean # differences $\pm SD$		H_O	H_E	H_D	F_{IS}	<i>p</i> -value	
							Nucleotide	Amino acid						
<i>C. perspicillata</i>	MHC	All	19	23	23.000	114	0.140 \pm 0.070	37.387 \pm 3.154	25.249 \pm 2.477	0.368	0.963	0.986	0.624	0.0001
		UR	5	8	6.576	81	0.132 \pm 0.074	34.536 \pm 3.341	24.036 \pm 2.772	0.600	0.86	1.000	0.400	0.0191
		EH	11	11	6.211	97	0.142 \pm 0.074	38.145 \pm 3.368	26.200 \pm 2.697	0.182	0.884	0.974	0.667	0.0001
		PF	3	6	6.000	79	0.143 \pm 0.084	38.133 \pm 3.671	25.667 \pm 2.754	0.667	0.778	1.000	0.745	0.1969
	D-LOOP	All	45	39	38.873	69	0.048 \pm 0.024	16.439 \pm 1.995	-	-	-	0.993	-	-
		AA	16	16	8.458	58	0.051 \pm 0.027	17.375 \pm 2.260	-	-	-	1.000	-	-
		UR	5	4	4.000	31	0.046 \pm 0.029	15.600 \pm 2.961	-	-	-	0.9	-	-
		EH	16	16	8.458	52	0.050 \pm 0.026	16.967 \pm 2.506	-	-	-	1.000	-	-
<i>D. rotundus</i>	MHC	All	35	30	22.371	71	0.105 \pm 0.051	24.451 \pm 2.733	16.722 \pm 2.374	0.649	0.963	0.9679	0.330	0.0001
		SA	23	22	6.855	75	0.995 \pm 0.049	24.697 \pm 2.750	16.775 \pm 2.367	0.640	0.936	0.957	0.334	0.0001
		CM	8	10	6.467	55	0.087 \pm 0.046	24.556 \pm 2.927	16.156 \pm 2.522	0.625	0.883	0.9615	0.352	0.0005
		CF	4	7	7.000	69	0.112 \pm 0.066	29.952 \pm 3.370	21.190 \pm 2.817	0.750	0.844	1.000	0.250	0.1696
	D-LOOP	All	59	5	4.913	8	0.008 \pm 0.005	2.936 \pm 1.561	-	-	-	0.67	-	-
		SA	22	5	4.334	8	0.007 \pm 0.004	2.520 \pm 1.410	-	-	-	0.576	-	-
		CM	27	3	2.853	6	0.008 \pm 0.005	2.735 \pm 1.497	-	-	-	0.581	-	-
		CF	10	2	2.000	1	0.001 \pm 0.001	0.200 \pm 0.269	-	-	-	0.200	-	-
<i>M. molossus</i>	MHC	All	28	20	18.351	70	0.102 \pm 0.051	23.595 \pm 2.729	15.847 \pm 2.410	0.214	0.945	0.945	0.777	0.0001
		SA	15	12	6.606	57	0.092 \pm 0.047	23.091 \pm 2.751	15.333 \pm 2.429	0.267	0.883	0.924	0.875	0.0001
		PA	8	9	7.375	57	0.089 \pm 0.049	21.611 \pm 2.622	13.889 \pm 2.277	0.125	0.942	1.000	0.705	0.0001
		CC	5	5	5.000	51	0.102 \pm 0.060	26.600 \pm 3.253	17.500 \pm 2.728	0.200	0.867	0.933	0.789	0.0035
	D-LOOP	All	42	25	25.000	55	0.041 \pm 0.021	11.856 \pm 1.845	-	-	-	0.977	-	-
		SA	22	16	9.045	35	0.031 \pm 0.016	8.879 \pm 0.638	-	-	-	0.97	-	-
		PA	14	12	8.648	32	0.033 \pm 0.018	9.604 \pm 1.070	-	-	-	0.978	-	-
		CC	6	5	5.000	20	0.030 \pm 0.019	8.733 \pm 1.087	-	-	-	0.933	-	-

The sample size (*n*), number of alleles (#), allelic richness (*R*), number of segregating sites (*S*), nucleotide diversity ($\pi \pm$ standard deviation), number of nucleotide and amino acid differences (\pm standard error) per sequence from averaging overall sequence pairs, observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosities, gene diversity (H_D), inbreeding coefficients (F_{IS}) and their *p*-values are given for each species and defined subgroups. - computations not performed

acid differences (37.387 \pm 3.154 and 25.249 \pm 2.477, respectively), while *M. molossus* exhibited the lowest values (Table 2). The highest observed heterozygosity (H_O) was recorded in *D. rotundus* and, as for the two other species, H_O was lower than expected heterozygosities (H_E). Considering environment subgroups, the highest value of *R* was detected in UR for *C. perspicillata*, (*R* = 6.576), in CF for *D. rotundus* (*R* = 7.0), and in PA for *M. molossus* (*R* = 7.375). *S* ranged from 51 in CC for *M. molossus* to 97 in EH for *C. perspicillata*. The highest values of π were found in PF for *C. perspicillata*, CF for *D. rotundus* and CC for *M. molossus* (Table 2). F_{IS} values were high in all species as well as in all the subgroups per species, with values ranging from 0.330 (*p* < 0.001) for *D. rotundus* to 0.777 (*p* < 0.001) for *M. molossus*.

Recombination tests did not reveal fragments involved in gene conversion, recombination events or breakpoints

among individuals from the same species or within a given environment or between species.

mtDNA D-loop allelic diversity

C. perspicillata had the highest allelic richness values (*R* = 38.873), number of segregating sites (*S* = 69), gene diversity (H_D = 0.993) and mean nucleotide differences: 16.439 \pm 7.460 (Table 2). Nucleotide diversity, for each species, was low (< 0.05 in *C. perspicillata* and *M. molossus*, < 0.01 in *D. rotundus*). Considering environment subgroups, π values ranged from 0.001 \pm 0.001 in CF (*D. rotundus*) to 0.051 \pm 0.027 in AA (*C. perspicillata*). The highest *R* values were detected in SA (*M. molossus* and *D. rotundus*), AA and EH (*C. perspicillata*). *S* ranged from one in CF (*D. rotundus*) to 58 in AA (*C. perspicillata*), and H_D ranged from 0.200 in CF (*D. rotundus*) to 1.0 in AA and EH (*C. perspicillata*).

Distribution of DRB alleles across the different environments

C. perspicillata

Three alleles (*Cape-DRB*16*, *17*, and *25*) were shared either between bats trapped in the same environment (EH) or between bats trapped in distinct environments (EH vs. PF). These three alleles were the most common, with an overall frequency ($F \pm SD$) of 0.111 ± 0.062 for *Cape-DRB*16* and 0.074 ± 0.051 for both *Cape-DRB*17* and *Cape-DRB*25* (Fig. 2). *Cape-DRB*16* was shared between one bat trapped in PF ($n = 3$) and two bats trapped in EH. *Cape-DRB*17* was shared between two bats trapped in EH ($n = 11$). Nine individuals in this region were homozygotes (Additional file 1: Table S3). *Cape-DRB*25* was shared between two bats trapped in PF and EH. Alleles found in UR were private alleles and three of the five trapped bats were heterozygotes.

D. rotundus

Up to 14 alleles were shared either between bats roosting in the same area or between bats foraging in the same area. Out of these alleles, one (*Dero-DRB*19*) was shared between six bats from the three sampling sites (CF, CM, and SA sites) (Additional file 1: Table S3). Five alleles (*Dero-DRB*13*, *17*, *18*, *27* and *30*) were shared between bats from SA and CM sites, and two alleles (*Dero-DRB*02* and *15*) between the SA and CF sites. *Dero-DRB*02* and *19* had the highest overall frequency of 0.085 ± 0.037 (Fig. 2). Four alleles (*Dero-DRB*05*, *06*, *14* and *29*) were exclusively shared between individuals trapped in SA. Two alleles (*Dero-DRB*24* and *26*) were solely shared between individuals trapped in CM. We did not find shared alleles between bats trapped in CF (Additional file 1: Table S4). Sixteen of the 23 bats captured in SA were heterozygotes, five in CM ($n = 8$) and three in CF ($n = 4$).

M. molossus

Up to ten shared alleles were identified but none was shared between the three sampling sites (Additional file 1: Table S5). Three alleles (*Momo-DRB*02*, *04* and *19*) were shared between bats captured in the SA and PA sites. Two alleles (*Momo-DRB*09* and *10*) were shared between individuals from the SA and CC sites. One allele (*Momo-DRB*07*) was shared between two bats captured in the CC and PA sites. Three alleles (*Momo-DRB*08*, *11* and *20*) were exclusively shared within SA. *Momo-DRB*08* had the highest overall frequency: 0.147 ± 0.062 (Fig. 2). Four of the five bats trapped in CC were homozygotes, seven in PA ($n = 8$), and 11 in SA ($n = 15$).

Detection of selection signature

An excess of d_N substitutions was detected for the three species ($d_N/d_S = [2.049-3.548]$, $Z = [2.600-5.619]$, $p = [< 10^{-5} - 0.01]$ – Table 3). More specifically, in putative

antigen binding sites (ABS), d_N/d_S values were highly significant ($p < 10^{-3}$) and ranged from 4.081 for *D. rotundus* to 4.939 for *C. perspicillata*. We found significant d_N substitutions also occurring in putative non-ABS for *C. perspicillata* ($d_N/d_S = 2.792$, $Z = 3.283$, $p = 0.0013$) but none in both *D. rotundus* and *M. molossus* samples ($p > 0.40$).

PAML analyses (performed by species and within subgroups per species) showed significant support for M7 and M8 (log likelihood estimates (LTR), $2\Delta l = [63.985-123.085]$, $df = 2$, $p < 0.0001$), indicating an effect of positive selection acting on the *DRB* gene. Overall, 22 codons appeared to be under positive selection for *C. perspicillata*, eight for *D. rotundus*, and six for *M. molossus* (BEB posterior probability $p \geq 90\%$, SLAC, FEL, IFEL and MEME p -values < 0.1 , and REL Bayes Factor > 50 ; Table 4). Three positively selected sites (PSS 52, 65 and 66; Fig. 2) were common to the three species investigated. These codons were the only common between *D. rotundus* and *M. molossus*. Six of the eight PSS identified in *D. rotundus* were also found in *C. perspicillata*, and all of the PSS identified in *M. molossus* were identified in *C. perspicillata*.

Regarding environment subgroups for all species, a maximum of 13 PSS was identified in UR for *C. perspicillata*, eight in CF for *D. rotundus* and 11 in SA for *M. molossus*. Three PSS were found in all environment subgroups for *D. rotundus*, four in *C. perspicillata* and four in *M. molossus*. A maximum of six unique PSS (sites detected as positive only within the defined subgroup) was observed for *C. perspicillata*, four for *M. molossus* and two unique PSS were observed in the two roosts (CF and CM) for *D. rotundus* (Table 4). None of the PSS detected in *C. perspicillata* was shared between UR and PF. The same result was obtained between SA and CM for *D. rotundus* and between PA and CC or SA for *M. molossus*. Thirteen of the 22 PSS identified were located within the human ABS region for *C. perspicillata*, seven for *D. rotundus* and five for *M. molossus* (Fig. 2). All the PSS identified in *M. molossus* were described as PSS for *N. albiventris*, 13 for *C. perspicillata* and six for *D. rotundus*. Six PSS in *C. perspicillata* were also found in *A. jamaicensis*, three for *M. molossus* and one for *D. rotundus*. The sites where PSS differed were located within one to six amino acid residues (3–18 bp) of the human ABS or other bat species PSS, depending on the bat species investigated.

DRB population structure

We found no significant genetic differentiation between *DRB* alleles of the environment subgroups defined for each species (*C. perspicillata*: F_{ST} range: $[(-0.068) to 0.042]$; *D. rotundus*: F_{ST} range: $[(-0.047) to 0.012]$; *M. molossus*: F_{ST} range: $[0.013-0.055]$, Additional file 1: Table S6(A)–8). Taking into account the collecting sites, pairwise differentiation tests did not reveal significant genetic differentiation between *DRB* alleles (*C. perspicillata*: F_{ST} range:

Table 3 Non-synonymous (d_N) and synonymous (d_S) substitutions (\pm standard deviation) for *C. perspicillata*, *D. rotundus* and *M. molossus*

Species	Region	N	$d_N \pm SD$	$d_S \pm SD$	d_N/d_S	Z-test	p-value
<i>C. perspicillata</i>							
	ABS	25	0.405 \pm 0.131	0.082 \pm 0.064	4.939	5.119	<10 ⁻⁵
	Non-ABS	64	0.121 \pm 0.047	0.043 \pm 0.029	2.792	3.283	0.0013
	All	89	0.187 \pm 0.053	0.0528 \pm 0.026	3.548	5.619	<10 ⁻⁵
<i>D. rotundus</i>							
	ABS	25	0.314 \pm 0.116	0.077 \pm 0.055	4.081	3.811	0.0002
	Non-ABS	64	0.049 \pm 0.035	0.045 \pm 0.032	1.075	0.156	0.8764
	All	89	0.114 \pm 0.470	0.054 \pm 0.032	2.119	2.713	0.0077
<i>M. molossus</i>							
	ABS	21	0.323 \pm 0.103	0.068 \pm 0.058	4.753	4.080	0.0001
	Non-ABS	60	0.060 \pm 0.021	0.056 \pm 0.031	1.078	0.186	0.8528
	All	81	0.120 \pm 0.028	0.058 \pm 0.030	2.049	2.599	0.0105

Putative ABS and non-ABS were identified assuming functional homology to the human ABS of the *HLA-DR1* molecule Brown et al. [65]. N is the number of codons in each sequence region. Z-test values and p-values are shown

[(-0.048) to 1.000]; *D. rotundus*: F_{ST} range: [(-0.047) to 0.012]; *M. molossus*: F_{ST} range: [0.013–0.055], (Additional file 1: Table S6(B)–8). Minimum spanning trees showed complex connections between the haplotypes, marked by numerous nucleotide mutations, without clustering of haplotypes either by site or by environment (Figs. 3, 4, 5 and 6). We did not find relevant isolation-by-distance in our samples (Additional file 1: Table S9).

mtDNA D-loop population structure

We found significant genetic differentiation between some populations of *D. rotundus* (CF vs. CM F_{ST} : 0.475, p -value <0.0001; CM vs. SA F_{ST} : 0.617, p -value <0.0001; but CM vs. SA F_{ST} : 0.016, p -value not significant). No significant genetic differentiation was observed between populations for the two other species (*C. perspicillata* F_{ST} range: [(-0.029) to (-0.016)]; *M. molossus* F_{ST} range: [(-0.040) to 0.017], Additional file 1: Table S6(A)–8). Pairwise computations performed between collecting sites did not reveal significant genetic differentiation (*C. perspicillata* F_{ST} range: [0.072 to 1.000]; *M. molossus* F_{ST} range: [(-0.040) to 0.017], Additional file 1: Table S6(B)–8). The haplotype networks for *C. perspicillata* revealed two main groups of haplotypes that possessed all the haplotypes found in the different environments or collecting sites (Figs. 3 and 4). The same result was obtained for *M. molossus*, with a maximum of four mutations between haplotypes (Fig. 5). The lowest number of mutations was found for *D. rotundus* for which the five haplotypes were linked by one connection, marked by only one or two mutations (Fig. 6). No population expansion or collapse was observed for the three species. We did not find

relevant isolation-by-distance in our samples (Additional file 1: Table S7).

DRB phylogenetic relationships

The analysis included the 73 *DRB* sequences identified in this study (174 bp; nucleotide position 48–219), as well as the 63 published chiropteran *DRB* sequences selected randomly from *A. jamaicensis* [38], 15 from *C. perspicillata* [35], 15 from *Myotis* spp. (*M. velifer* and *M. vivesi* [39]), 28 from *Noctilio* spp. (*N. albiventris* and *N. leporinus* [35, 37]) and 17 from *S. bilineata* [35, 36]. The phylogenetic tree showed six major clades (Fig. 7). We observed a clustering by species or genus supported by medium and high posterior probabilities – *C. perspicillata* (0.61), *D. rotundus* (0.67), *M. molossus* (1), *Noctilio* spp. (0.50) – with an intermingled clustering of *N. albiventris* and *N. leporinus* *DRB* alleles. Within the *C. perspicillata* clade, *DRB* sequences clustered with the previously published sequences, with a high posterior probability (0.85). One *DRB* sequence of *C. perspicillata* was related to a *D. rotundus* clade with a posterior probability of 0.79. One *DRB* sequence from *S. bilineata* clustered with the clade *Noctilio* spp., with a low posterior probability value. The 63 *DRB* sequences of the *A. jamaicensis* species clustered with five *DRB* sequences of *D. rotundus* and two *DRB* sequences of *C. perspicillata*, with a posterior probability of 0.70. Within this phyllostomid clade, we observed a species-dependent clustering with high posterior probabilities. Two *DRB* sequences of *C. perspicillata* clustered with a low posterior probability with two sequences from *A. jamaicensis*. We did not observe a

Table 4 Identification of species-specific positively selected sites (PSS) by maximum likelihood (ML) analysis

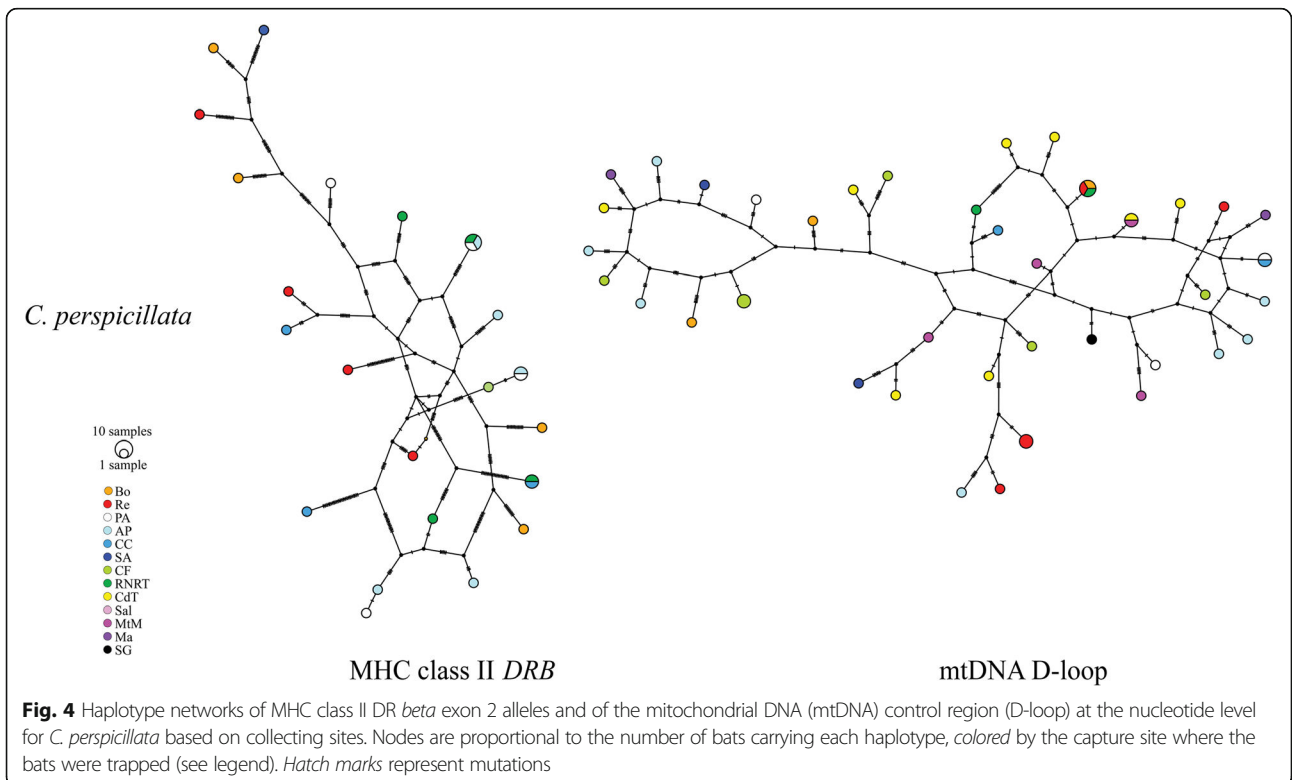
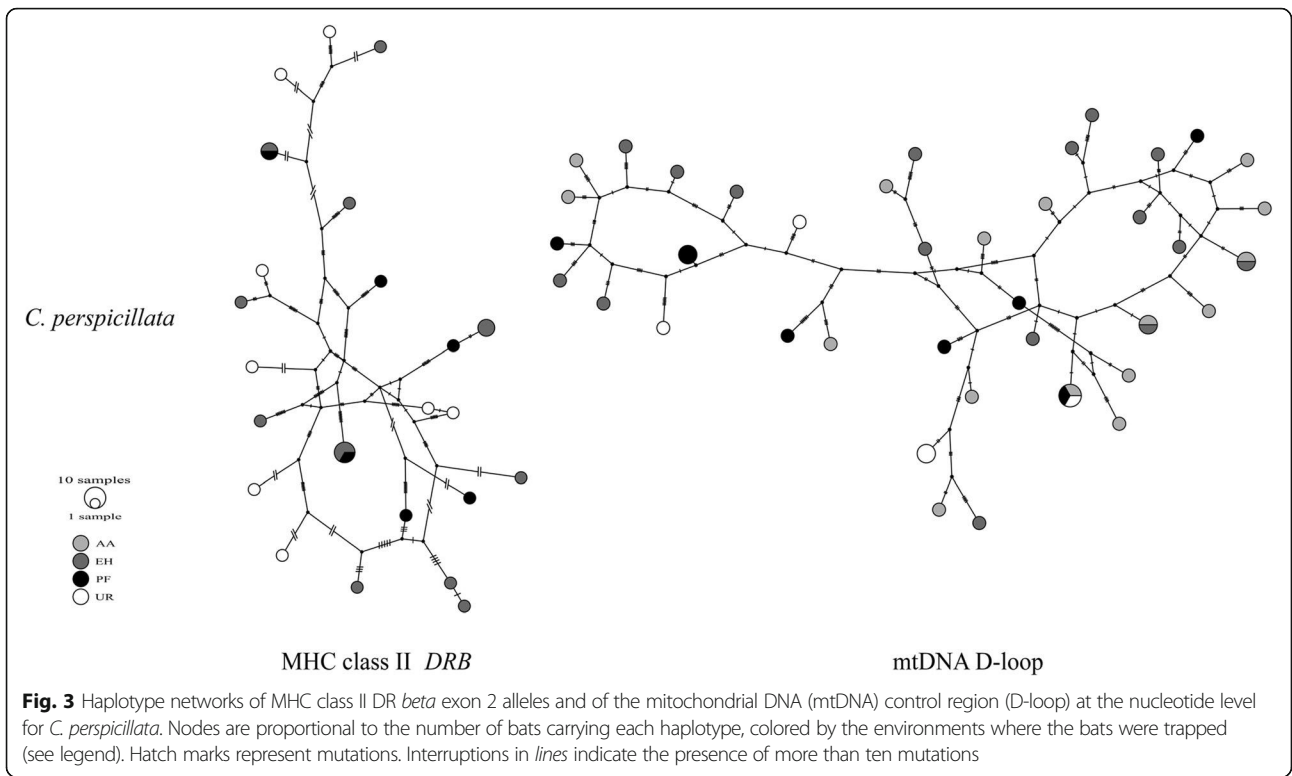
Species	Area	n	lnL M7	lnL M8	PAML M8	SLAC	MEME	FEL	IFEL	REL	Total
<i>C. perspicillata</i>	All	19	-1933.702365	-1869.971839	<u>1, 6, 8, 21, 26,</u> <u>52, 62, 65, 66,</u> <u>69, 73, 81</u>	<u>1, 8, 39,</u> <u>62, 65, 69</u>	<u>1, 6, 8, 28,</u> <u>39, 43, 52,</u> <u>55, 56, 58,</u> <u>59, 62, 65,</u> <u>66, 69, 79,</u> <u>80, 83, 84</u>	<u>1, 6, 8, 39,</u> <u>55, 62, 65,</u> <u>69, 79, 83</u>	<u>1, 8, 21,</u> <u>43, 55,</u> <u>69</u>	<u>1, 3, 4, 5, 6, 7, 8,</u> <u>13, 21, 23, 25, 26,</u> <u>32, 39, 41, 43, 48,</u> <u>51, 52, 54, 55, 56,</u> <u>58, 59, 61, 62, 63,</u> <u>65, 66, 69, 72, 73,</u> <u>76, 79, 80, 81, 82,</u> <u>83, 84, 86</u>	22
	EH	11	-1048.439008	-1014.337425	<u>1, 6, 8, 23†, 26,</u> <u>32, 43, 52, 55,</u> <u>56, 58, 65, 66,</u> <u>69, 73, 81, 83</u>	<u>8</u>	<u>6, 8, 21†, 28,</u> <u>39, 43, 52, 84</u>	<u>8, 52, 55, 69</u>	<u>21, 28,</u> <u>43, 52,</u> <u>55, 65,</u> <u>66, 69</u>	<u>8, 23, 66, 69</u>	11
	PF	3	-1039.547367	-1018.683534	<u>6, 43, 52, 62,</u> <u>69, 73†, 81</u>	none	<u>6, 28, 43, 52,</u> <u>56, 69, 73, 84</u>	none	<u>28, 52</u>	none	6
	UR	5	-966.977779	-945.555902	<u>1†, 4†, 6, 8, 23,</u> <u>24†, 25, 26, 52,</u> <u>55, 62†, 65, 66,</u> <u>69, 81, 82†</u>	none	<u>1, 6, 8, 39†,</u> <u>43, 62, 66, 69</u>	<u>1, 8, 62, 66,</u> <u>69</u>	<u>1, 6, 43,</u> <u>55, 62,</u> <u>69</u>	<u>1, 3, 4, 6, 8, 24, 32,</u> <u>39, 43, 55, 62, 65,</u> <u>66, 69, 82, 86</u>	13
<i>D. rotundus</i>	All	35	-1590.748855	-1538.671943	<u>6, 8, 52, 73, 81</u>	<u>6, 8, 52,</u> <u>65, 66</u>	<u>6, 8, 21, 33,</u> <u>52, 55, 59,</u> <u>65, 66, 81</u>	<u>6, 8, 52, 58,</u> <u>65, 66, 82</u>	<u>6, 8, 20,</u> <u>52, 66,</u> <u>82</u>	<u>1, 6, 10, 13, 18, 30,</u> <u>20, 22, 24, 34, 43,</u> <u>46, 48, 50, 52, 53,</u> <u>75, 83, 85, 88</u>	8
	CF	4	-810.300385	-793.445859	<u>6, 8, 52, 66, 73,</u> <u>81</u>	none	<u>6, 55</u>	<u>2†, 26, 27†,</u> <u>68, 73</u>	<u>2, 27,</u> <u>68, 73</u>	<u>6, 8, 20, 52, 63, 65,</u> <u>66, 69, 81, 82</u>	8
	CM	8	-937.123919	-915.387528	<u>6, 8, 81</u>	<u>8</u>	<u>6, 8, 55†, 81</u>	<u>6, 8</u>	<u>6, 52,</u> <u>58</u>	<u>6, 8, 20, 21, 25, 33,</u> <u>42, 52, 55, 58†, 62,</u> <u>63, 65, 66, 69, 82</u>	6
	SA	23	-1334.945758	-1295.671805	<u>6, 8, 52, 66, 73,</u> <u>81</u>	<u>6, 8, 66</u>	<u>6, 8, 52, 55,</u> <u>66</u>	<u>2, 4, 27, 68,</u> <u>73</u>	<u>6, 33,</u> <u>52, 66</u>	<u>6, 52, 66</u>	5
<i>M. molossus</i>	All	28	-1341.359673	-1309.366867	<u>21, 23, 27, 29,</u> <u>42, 52, 55, 56,</u> <u>62, 65, 66, 69,</u> <u>73, 81, 83</u>	<u>65, 66</u>	<u>25, 52, 55,</u> <u>62, 65, 66, 69</u>	<u>65, 66</u>	<u>65, 69</u>	<u>22, 33, 51, 63, 70,</u> <u>72, 82</u>	6
	CC	5	-625.132415	-618.540513	<u>21, 23†, 28, 32,</u> <u>42†, 52, 55, 65,</u> <u>66, 73</u>	none	<u>55</u>	none	<u>52, 66</u>	<u>21, 23, 29, 32, 42,</u> <u>52, 55, 65, 66, 73</u>	9
	PA	8	-758.415189	-747.544468	<u>32, 55, 62, 66,</u> <u>69†, 81</u>	none	<u>32, 69</u>	<u>20, 26, 36,</u> <u>43, 58, 61,</u> <u>73</u>	<u>69</u>	<u>32, 55, 66, 69, 73</u>	5
	SA	15	-950.892509	-930.566898	<u>21, 29†, 32, 42,</u> <u>52, 55, 56†,</u> <u>62†, 65, 66, 69,</u> <u>73, 81†, 83</u>	none	<u>21, 52, 55,</u> <u>65, 73</u>	<u>26, 43</u>	<u>62, 73</u>	<u>21, 29, 32, 52, 56,</u> <u>65, 66, 81, 82</u>	11

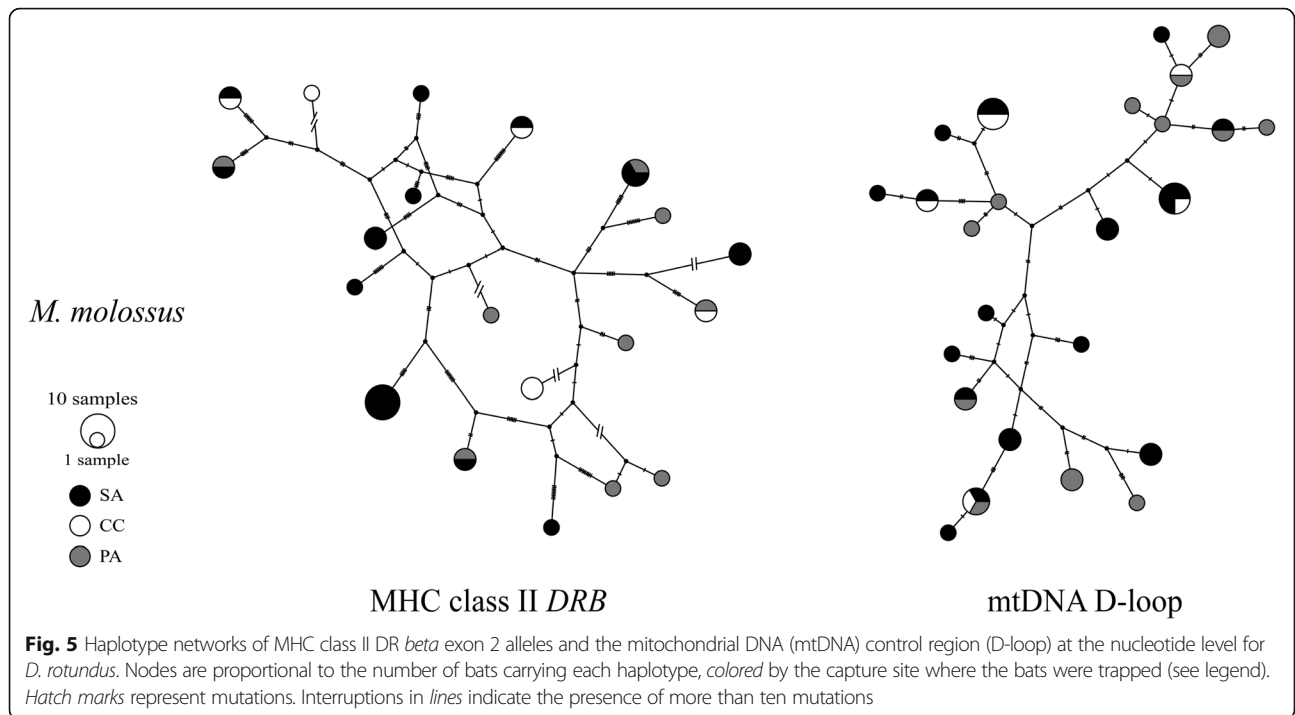
Sample size (n) considered for each analysis is shown. Sites identified as positively selected by at least two ML analyses are underlined. Codons are given with a posterior probability $\geq 90\%$ in the Bayes Empirical Bayes (BEB) analysis for PAML M8; p -values < 0.1 for SLAC, FEL, IFEL and MEME; Bayes Factor > 50 for REL. † indicates PSS found only in a specific region for each species. Validated PSS also found with human antigen-binding sites (ABS) are shadowed

characteristic clustering for *S. bilineata* and *Myotis* spp. However, one *DRB* sequence from *M. velifer* clustered together with six *DRB* sequences from *S. bilineata* with a low posterior probability.

Discussion

In this study, we explored the genetic variability of the expressed MHC *DRB* genes of three sympatric Neotropical bat species, looking for selection signatures within



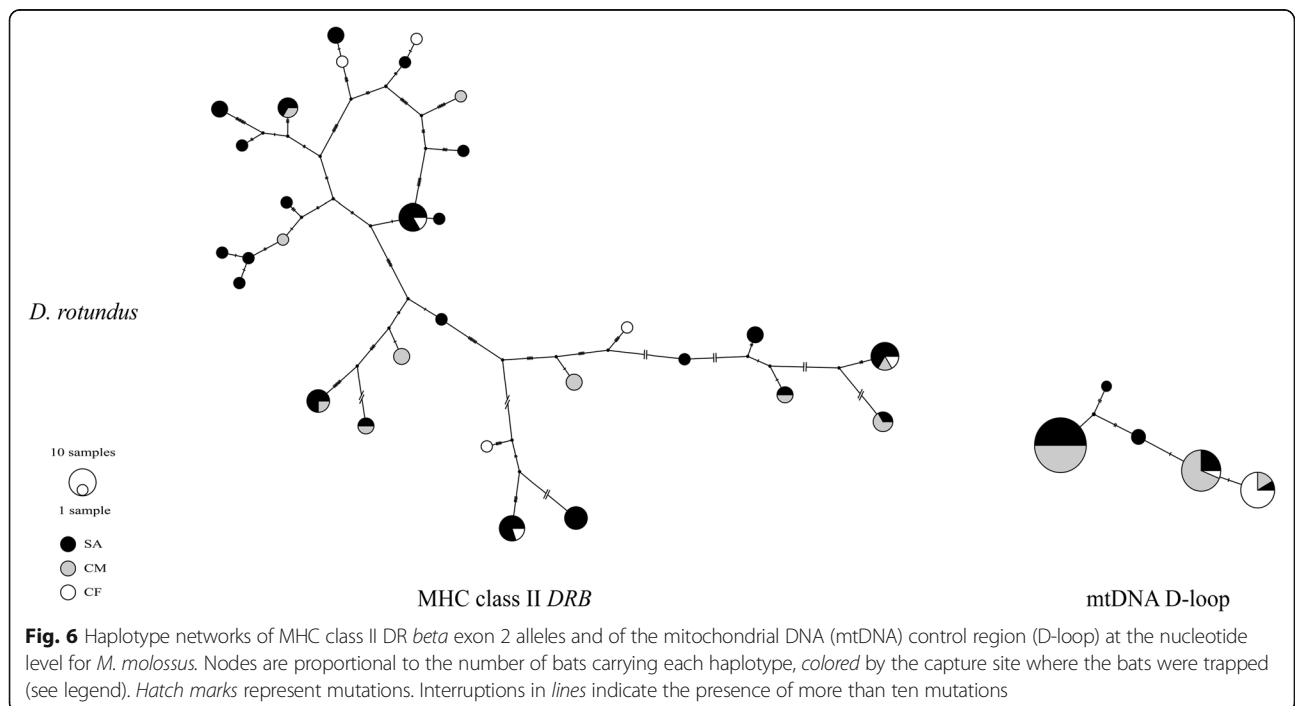


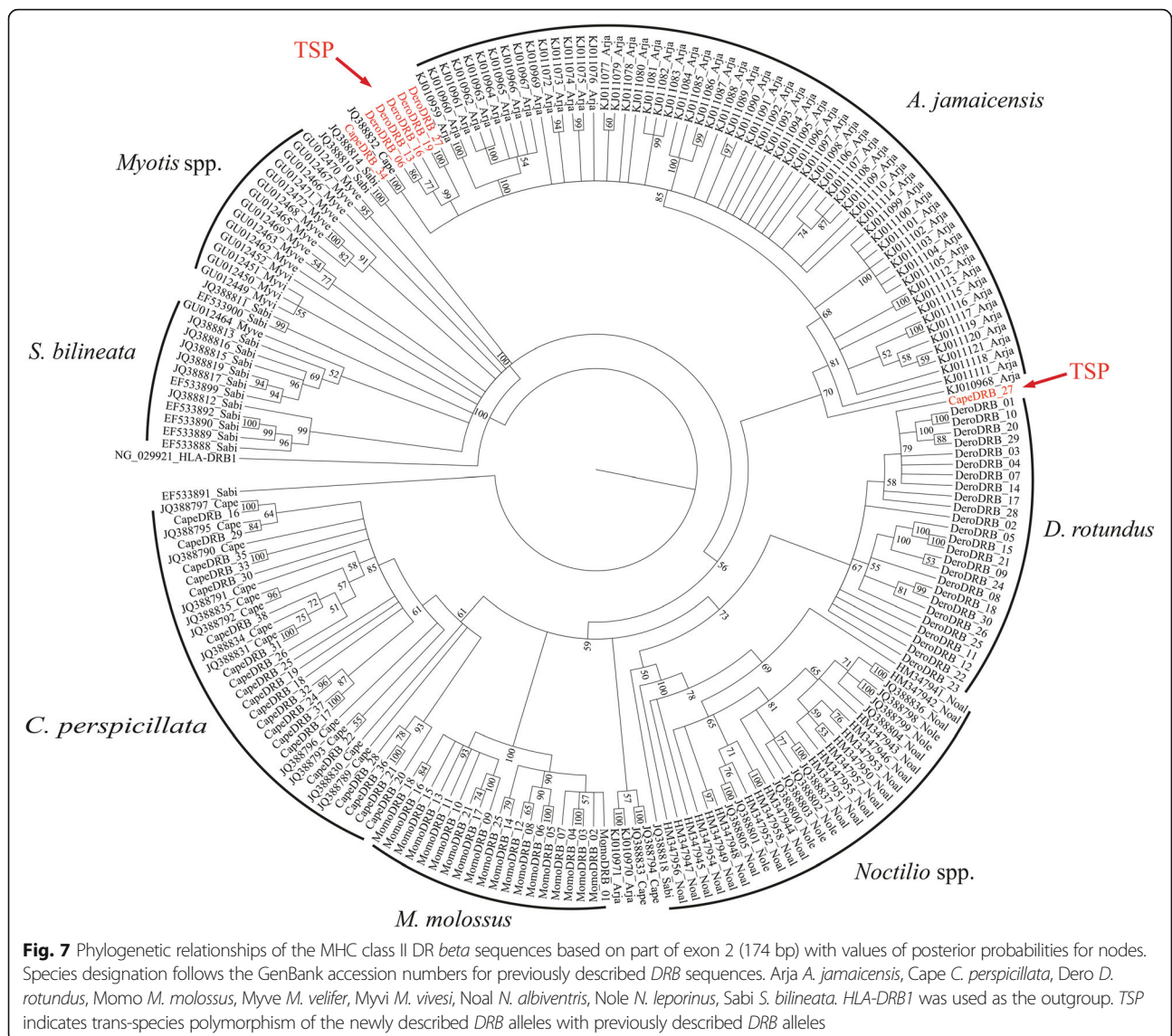
the PBR and investigating the role of the environment and the population structure on MHC diversity.

Diversity patterns in the MHC class II *DRB* gene

In the three species, identified alleles (23 in *C. perspicillata*, 30 in *D. rotundus* and 20 in *M. molossus*) were unique in amino acid sequences, suggesting a

non-redundant nucleotide polymorphism. The number of alleles detected per species and per environment subgroup within each species indicated a relatively high level of MHC *DRB* variation. These results are in agreement with previously reported allelic copy number variation between or within bat species [1, 35–40].





This high DRB polymorphism was observed in the three species whatever the degree of habitat disturbance (heavily disturbed, slightly impacted or pristine). In addition, no loss of polymorphism induced by low host and/or pathogen diversity, expected to occur in disturbed environments [47, 48] was observed. Furthermore, mtDNA D-loop sequences, considered as neutral, revealed high levels of genetic diversity for *C. perspicillata* and *M. molossus*. High levels of neutral diversity have been associated with either multiple geographic origin and/or population admixture [81, 82], suggesting that *C. perspicillata* and *M. molossus* populations originated from one of these two phenomena or from both. The high level of DRB polymorphism can be related to population history for these two species with the effects of additional selection factors such as pathogen-mediated selection.

A high number of DRB homozygotes was also found in *M. molossus* in all habitats as well as in *C. perspicillata* but in edge habitats only. For these two species, the presence of a specific allele (*allele-specific overdominance*) ensuring an adequate immunity can be hypothesized [1]. Considering *D. rotundus*, a high number of heterozygotes for DRB was observed in all habitats. This result suggests a heterozygote advantage related to the forest (pristine and edge habitats) environment known to encompass higher species and pathogen richness [83, 84].

The most frequent MHC DRB alleles encountered in each bat species (*Dero-DRB*02*, *Dero-DRB*15*, *Dero-DRB*19*, *Cape-DRB*16* and *Momo-DRB*08*) were all identified in forest environments. These alleles are likely ancient and play a significant role in the immune response, conferring a selective advantage to the bats in

sympatry in these habitats. Indeed, given that forest environments are characterized by a high level of pathogen diversity, these alleles most likely possess enhanced recognition capabilities and might be able to recognize a broader range of pathogens. They thus allow a more efficient immune response in line with the ecological diversity. Moreover, the geographical structure highlighted in *D. rotundus*, using mtDNA D-loop results, did not affect the allelic distribution. Indeed, most of the alleles identified in *D. rotundus* were shared between sites, and one allele (*Dero-DRB*19*) was present at all sites. In contrast, no geographical structure was found in *C. perspicillata* even if the alleles identified in urban and periurban areas were rare and not shared with other groups. These results suggest that environment rather than population structure drives the allelic distribution, corroborating a local adaptation hypothesis. Although edge and forest habitats may differ in pathogenic pressures (see above), the results observed for *C. perspicillata* may be related to the high tolerance of this species to habitat disturbance and to its dominance in bat communities in edge habitats [45], likely allowing continuous exposure to the communities of pathogens of both pristine and disturbed forests, and pathogen transfer between these habitats.

Duplication detected in Phyllostomidae

Gene conversion and recombination events were not detected for any species. The identification of three expressed *DRB* alleles in individuals from *C. perspicillata* and *D. rotundus* supported the existence of at least two functional *DRB* loci. However, underestimation of the number of alleles and expressed loci can be suspected, considering the limited number of recombinant clones per primer combinations and the use of cDNA only allowing the detection of the most frequently expressed alleles. The occurrence of multiple MHC *DRB* loci varying in the number of loci between individuals and species was reported in Neotropical bat species such as *C. perspicillata* (three *DRB* loci), *S. bilineata* (ten *DRB* loci) [35], *A. jamaicensis* (three *DRB* loci) [38], as well as in other animals [1, 7, 85, 86]. Together with environmental and biological patterns, gene conversion and recombination processes are known to drive the extensive MHC polymorphism [18, 87].

Variable gene duplication between closely related taxa and among individuals from the same species is characteristic of MHC genes and plays a critical role in the adaptive evolution of the host [88]. Gene duplication can occur over different time scales and therefore predates or follows speciation events. Furthermore, the absence of recombination between alleles of different species was reported. This result was regarded as evidence of recent duplication events between loci that occurred after speciation [35]. Our findings support this hypothesis since some recent

radiation events occurred in Neotropical bat species during the Pleistocene era (0.01–1.8 Mya) [89–91].

Despite the indels detected in some *C. perspicillata* and *D. rotundus* sequences, the reading frames remained unaltered, suggesting that these sequences encode functional proteins (Fig. 2). Nevertheless, the heterozygote-dominant character of individuals with these alleles suggests a turnover of these loci generated by evolutionary processes such as the silencing of duplicate genes by mutation or deletion [88]. Under the birth-and-death model, genes created by duplication can be maintained for long periods, deleted or transformed as pseudogenes and, therefore, contribute to host fitness and adaptability [92]. The phenomenon is especially significant among heterozygote *D. rotundus*, for which one of the two alleles is among the most widespread in the population studied (*Dero-DRB*02*, *05* and *15*), and supports a shift towards an allele with better recognition capabilities.

Evidence of historical positive selection

Higher rates of non-synonymous (d_N) vs. synonymous (d_S) nucleotide substitutions were observed, especially in sites supposedly involved in antigen-binding. This excess of d_N over d_S in ABS is consistent with balancing selection acting on *DRB* loci, as a sign of historical positive selection in polymorphic MHC genes [93]. Furthermore, an unexpected excess of d_N in putative non-ABS for *C. perspicillata* suggests strong positive selection acting on these sites and highlights species-specific divergence on sites involved in antigen recognition.

A high congruence was observed between species-specific positively selected sites (PSS) in the three species and human ABS demonstrating the functional homology of these sites. In contrast, PSS not identified as human ABS might play a role in MHC *DRB* recognition capability or in the molecule stability for the species studied. Here, nine of the PSS were detected in *C. perspicillata*, while only one was detected in both *D. rotundus* and *M. molossus*. Therefore, the observed excess of d_N in *C. perspicillata* was attributed to PSS identified as non-ABS in humans. This result demonstrates the critical role of positive selection in shaping MHC diversity and corroborates that positive selection is driven by a species-specific immune response. Focusing on *C. perspicillata*, comparisons of PSS identified here with those previously described revealed high congruence, even among PSS not identified as human ABS [35]. A similar result was observed between *C. perspicillata* and *A. jamaicensis*, two Phyllostomidae with the same diet [38]. Taken together, these findings reveal family and species-specific selection pressures acting on MHC genes. Moreover, the high similarity of PSS between

A. jamaicensis and *C. perspicillata* highlights that bat species sharing similar feeding strategies might be subjected – independently of their habitats – to similar pathogenic pressures, mainly from their microbiota [94]. Comparisons between each environment subgroup, for each present case, revealed the existence of private PSS depending on the area, suggesting a habitat-specific selection pressure process. Indeed, while six private PSS were counted in urban and peri-urban areas for *C. perspicillata*, only two were detected in edge habitats and one in pristine forest.

Phylogeny, trans-species polymorphism and demographic process

Two mechanisms are thought to be responsible for the trans-specific similarity of MHC genes: convergent evolution [93] and trans-species polymorphism [95, 96]. Evidence of trans-species polymorphism in bats was reported in both *Myotis* spp. and *Noctilio* spp. [35] and at the family level between the two phyllostomids *A. jamaicensis* and *C. perspicillata* [38]. Phylogenetic analyses in our study did not reveal any characteristic clustering of MHC alleles depending on the habitat, but rather clades at the family, genus and species levels (Fig. 3). These results suggest either similar pathogenic pressures or that these alleles possess a larger antigenic recognition capability that constitutes a major asset to the immune response of these species. Intermingled clusterings observed in this survey (between *DRB* sequences from *A. jamaicensis*, *C. perspicillata* and *D. rotundus*) are in agreement with trans-species polymorphism reported in bats [35, 38]. The observed trans-species polymorphism for *Myotis* spp. [35] was not detected in the present study. The results highlighted clustering between *S. bilineata* and *M. velifer*. However, this clustering was no longer observed by analyzing full-length exon 2. Observation of trans-species polymorphism within bat families (e.g., Phyllostomidae) strengthens the scenario of independent modes of evolution of MHC *DRB* alleles, allowing balancing selection to retain substantial allelic lineages before speciation events [95, 96]. Extended periods of host–pathogen coevolution is thought to contribute to trans-species polymorphism given that host-sharing pathogens and exposure to similar pathogen pressures are believed to induce similar changes in different host species [97].

Although pathogen-driven selection is known to be crucial in MHC diversity [98], demographic processes such as genetic drift, bottlenecks, expansions, fragmentation and geographic isolation have been demonstrated to also participate in the shaping of this extensive polymorphism [15, 17, 99, 100]. Evolutionary analyses of MHC *DRB* alleles for the three species did not reveal any area-dependent clustering effect. Furthermore,

analyses of partial sequences of the mtDNA D-loop revealed no structuration for *C. perspicillata* and *M. molossus*, whereas it was observed for *D. rotundus*. Demographic analysis performed for the three species did not detect any substantial bottleneck or expansion. While the patterns observed for the first two species corroborate the hypothesis of a similarity between the intrinsic genetic diversity of the species and that of MHC, the lack of similarity between these patterns of diversity for *D. rotundus* contradicts this statement. These results suggest that the signature of an area-limited pathogen-driven selection, supported by the presence of private PSS rather than by demographic processes such as distance isolation, is observed in this case.

Conclusions

This study was the first to investigate MHC *DRB* polymorphism in three sympatric bat species, *M. molossus*, *C. perspicillata* and *D. rotundus*, from the Amazonian region. Our results revealed a high genetic variability in the MHC *DRB* gene. Natural selection, as well as local adaptation driven by different parasite and pathogen exposures across environments, contribute to the maintenance of an extensive MHC polymorphism. The richness of pathogens in the different habitats should be investigated to strengthen our assumptions on potential local adaptation. Further studies using finer neutral markers such as microsatellites will be necessary to detect possible confounding effects, such as hidden structuring and demographic history, and thus to better understand the drivers of MHC allelic diversity.

Additional files

Additional file 1: Table S1. Supplementary methods, including the characteristics of all capture sites (Table S1), the list of samples successfully amplified for the MHC class II *DRB* loci (Table S2), the distribution of *DRB* alleles per species (Table S3-5), the pairwise differentiation computations per species (Table S6-8), as well as the correlations of genetics and geographic distance (Table S9). (XLS 179 kb)

Additional file 2: Figure S1. Map of French Guiana showing the capture sites of *C. perspicillata*, *D. rotundus* and *M. molossus*. For clarity, nearby sites within 15 km were grouped. Sites are numbered and labeled according to the type of environment to which they correspond: edge habitats (dark square), anthropized areas (light circle), pristine primary lowland forests (light square), urban and periurban areas (dark circle). Pie chart indicates the proportion of bat species sampled, with *C. perspicillata* in light grey, *D. rotundus* in black and *M. molossus* in dark grey. Small charts indicate a total number of individuals caught ≤ 10 , medium-sized charts (16-22 individuals), large charts (34-61 individuals). Characteristics of the different sites are given in Additional file 1: Table S1. (PDF 432 kb)

Additional file 3: Figure S2. Positions of PCR primers used to amplify the indicated fragments of the MHC class II loci in *C. perspicillata*, *D. rotundus* and *M. molossus*, based on cDNA. The structure of the cDNA of the MHC class II *DRB* gene is based on [50]. According to each species, boxes indicate the amplified region using each couple of primers. The shaded region represents the region of interest, namely exon 2. Sequences and references of all primers used are given in Table 1. (PDF 26 kb)

Abbreviations

ABS: Antigen-binding sites; AICc: Corrected Akaike information criteria; BEB: Bayes empirical Bayes; DRB: Exon 2 of the MHC class II DR beta; FEL: Fixed effects likelihood; IFEL: Internal fixed effects likelihood; MEME: Mixed effects model of evolution; MHC: Major histocompatibility complex; ML: Maximum-likelihood; mtDNA D-Loop: Mitochondrial DNA control region; PBR: Peptide-binding region; PCR: Polymerase chain reaction; PSS: Species-specific positively selected sites; REL: Random effects likelihood; SLAC: Single likelihood ancestor counting

Acknowledgments

We are grateful to François Catzeflis and Marguerite Delaval for useful discussions on the biology, ecology and dynamics of bats. All field volunteers and owners and/or managers of capture sites are warmly acknowledged for their assistance in captures.

Funding

A. Salmier was supported by a grant from European funds (PO FSE 2007-2013) and "Investissement d'Avenir" managed by Agence Nationale de la Recherche (CEBA, Ref. ANR-10- LABEX-25-01). This study was conducted within the CAROLIA program supported by European funds (ERDF/FEDER) and assistance from Région Guyane and Direction Régionale pour la Recherche et la Technologie. It also received a European Commission "REGPOT-CT-2011-285837- STRonGer" grant within the FP7 and "Investissement d'Avenir" grants managed by the Agence Nationale de la Recherche (CEBA, Ref. ANR-10- LABEX-25-01). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Availability of data and materials

Nucleotide sequences for the 73 DRB alleles and for mtDNA D-loop are available on Genbank (Accession numbers: KU896562–KU896633 and KU896634–KU896779, respectively).

Authors' contribution

Conceived and designed the experiments: AS AL. Analyzed the data: AS AL. Contributed reagents/materials/analysis tools: AS BdT VL AL. Wrote the paper: AS BdT BCR VL AL. Field work and acquisition data: AS AL BdT. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Laboratoire des Interactions Virus-Hôtes, Institut Pasteur de la Guyane, 23 avenue Pasteur, BP 6010, 97306 Cayenne, Cedex, French Guiana. ²CNRS, Université Toulouse 3 UPS, ENFA, UMR 5174 EDB (Laboratoire Évolution et Diversité Biologique), 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse, France.

Received: 20 April 2016 Accepted: 14 October 2016

Published online: 26 October 2016

References

- Sommer S. The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Front Zool.* 2005;2:16.
- Piertney SB, Oliver MK. The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity.* 2006;96:7–21.
- Kloch A, Babik W, Bajer A, Siński E, Radwan J. Effects of an MHC-DRB genotype and allele number on the load of gut parasites in the bank vole *Myodes glareolus*. *Mol Ecol.* 2010;19:255–65.
- Penn DJ, Ilmonen P. Major Histocompatibility Complex (MHC). In: John Wiley & Sons, Ltd, editor. *Encycl. Life Sci.* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2005 [cited 2015 May 20]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1038/npg.els.0003986>
- Meyer-Lucht Y, Otten C, Püttker T, Sommer S. Selection, diversity and evolutionary patterns of the MHC class II DAB in free-ranging Neotropical marsupials. *BMC Genet.* 2008;9:39.
- Castro-Prieto A, Wachter B, Sommer S. Cheetah Paradigm Revisited: MHC diversity in the world's largest free-ranging population. *Mol Biol Evol.* 2011;28:1455–68.
- Rivero-de Aguilar J, Schut E, Merino S, Martínez J, Komdeur J, Westerdahl H. MHC class II B diversity in blue tits: a preliminary study. *Ecol Evol.* 2013;3:1878–89.
- Yao G, Zhu Y, Wan Q-H, Fang S-G. Major histocompatibility complex class II genetic variation in forest musk deer (*Moschus berezovskii*) in China. *Anim Genet.* 2015;46:535–43.
- Hughes AL, Yeager M. Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. *Annu Rev Genet.* 1998;32:415–35.
- Hedrick PW. Pathogen resistance and genetic variation at MHC loci. *Evolution.* 2002;56:1902–8.
- Hedrick PW. HLA-sharing, recurrent spontaneous abortion, and the genetic hypothesis. *Genetics.* 1988;119:199–204.
- Ditchkoff SS, Lochmiller RL, Masters RE, Hooper SR, Bussche RA. Major-histocompatibility-complex-associated variation in secondary sexual traits of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*): evidence for good-genes advertisement. *Evolution.* 2001;55:616–25.
- Oosterhout C, Joyce DA, Cummings SM, Blais J, Barson NJ, Ramnarine IW, et al. Balancing selection, random genetic drift, and genetic variation at the major histocompatibility complex in two wild populations of guppies (*Poecilia reticulata*). *Evolution.* 2006;60:2562–74.
- Babik W, Pabijan M, Arntzen J w, Cogalniceanu D, Durka W, Radwan J. Long-term survival of a urodele amphibian despite depleted major histocompatibility complex variation. *Mol Ecol.* 2009;18:769–81.
- Alcaide M. On the relative roles of selection and genetic drift in shaping MHC variation. *Mol Ecol.* 2010;19:3842–4.
- Marsden CD, Woodroffe R, Mills MGL, McNUTT JW, Creel S, Groom R, et al. Spatial and temporal patterns of neutral and adaptive genetic variation in the endangered African wild dog (*Lycaon pictus*): Spatial and temporal diversity in wild dogs. *Mol Ecol.* 2012;21:1379–93.
- Zeisler I, Beebe TJC. Drift rather than selection dominates MHC class II allelic diversity patterns at the biogeographical range scale in natterjack toads *Bufo calamita*. *PLoS ONE.* 2014;9:e100176.
- Yu F-J, Zhu Y, Xiong T-Y, Wan Q-H, Zhang H-M. Balancing selection and recombination drive genetic variation at MHC class I genes in the giant panda. *Sci Bull.* 2015;60:136–8.
- Dionne M, Miller KM, Dodson JJ, Caron F, Bernatchez L. Clinal variation in MHC diversity with temperature: evidence for the role of host-pathogen interaction on local adaptation in Atlantic salmon. *Evol Int J Org Evol.* 2007;61:2154–64.
- Lenz TL, Eizaguirre C, Rotter B, Kalbe M, Milinski M. Exploring local immunological adaptation of two stickleback ecotypes by experimental infection and transcriptome-wide digital gene expression analysis. *Mol Ecol.* 2013;22:774–86.
- Froeschke G, Sommer S. Role of selection versus neutral processes determining genetic variation in a small mammal along a climatic gradient in southern Africa. *Evol Ecol.* 2014;28:1169–90.
- Clozato CL, Mazzoni CJ, Moraes-Barros N, Morgante JS, Sommer S. Spatial pattern of adaptive and neutral genetic diversity across different biomes in the lesser anteater (*Tamandua tetradactyla*). *Ecol Evol.* 2015;5:4932–48.
- Froeschke G, Matthee S. Landscape characteristics influence helminth infestations in a peri-domestic rodent-implications for possible zoonotic disease. *Parasit Vectors.* 2014;7:393.
- Fuller CA, Postava-Davignon MA, West A, Rosengaus RB. Environmental conditions and their impact on immunocompetence and pathogen susceptibility of the Caribbean termite *Nasutitermes acajutlae*. *Ecol Entomol.* 2011;36:459–70.
- Hayman DTS, Pulliam JRC, Marshall JC, Cryan PM, Webb CT. Environment, host, and fungal traits predict continental-scale white-nose syndrome in bats. *Sci Adv.* 2016;2:e1500831.
- Kamiya T, O'Dwyer K, Nakagawa S, Poulin R. Host diversity drives parasite diversity: meta-analytical insights into patterns and causal mechanisms. *Ecography.* 2014;37:689–97.
- Poulin R. Parasite biodiversity revisited: frontiers and constraints. *Int J Parasitol.* 2014;44:581–9.
- Zukal J, Bandouchova H, Bartonicka T, Berkova H, Brack V, Brichta J, et al. White-nose syndrome fungus: a generalist pathogen of hibernating bats. *PLoS One.* 2014;9:e97224.
- Johnson JS, Reeder DM, McMichael III JW, Meierhofer MB, Stern DWF, Lumadue SS, et al. Host, pathogen, and environmental characteristics predict white-nose syndrome mortality in captive little brown myotis (*Myotis lucifugus*). *PLoS One.* 2014;9:e12502.
- Zarlenga DS, Hoberg E, Rosenthal B, Mattiucci S, Nascetti G. Anthropogenics: human influence on global and genetic homogenization of parasite populations. *J Parasitol.* 2014;100:756–72.

31. Becker DJ, Streicker DG, Altizer S. Linking anthropogenic resources to wildlife-pathogen dynamics: a review and meta-analysis. *Ecol Lett.* 2015;18:483–95.
32. Chomel BB, Stuckey MJ, Boulouis H-J, Aguilar-Setién A. Bat-Related Zoonoses. In: Sing A, editor. *Zoonoses - Infect. Affect. Hum. Anim.* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2015 [cited 2015 May 20]. p. 697–714. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-9457-2_28
33. Brook CE, Dobson AP. Bats as “special” reservoirs for emerging zoonotic pathogens. *Trends Microbiol.* 2015;23:172–80.
34. Kupfermann H, Satta Y, Takahata N, Tichy H, Klein J. Evolution of Mhc-DRB introns: implications for the origin of primates. *J Mol Evol.* 1999;48:663–74.
35. Schad J, Voigt CC, Greiner S, Dechmann DKN, Sommer S. Independent evolution of functional MHC class II DRB genes in New World bat species. *Immunogenetics.* 2012;64:535–47.
36. Mayer F, Brunner A. Non-neutral evolution of the major histocompatibility complex class II gene DRB1 in the sac-winged bat *Saccopteryx bilineata*. *Heredity.* 2007;99:257–64.
37. Schad J, Dechmann DK, Voigt CC, Sommer S. MHC class II DRB diversity, selection pattern and population structure in a neotropical bat species, *Noctilio albiventris*. *Heredity.* 2011;107:115–26.
38. Real-Monroy MD, Martínez-Méndez N, Ortega J. MHC-DRB Exon 2 Diversity of the Jamaican Fruit-Eating Bat (*Artibeus jamaicensis*) from Mexico. *Acta Chiropterologica.* 2014;16:301–14.
39. Richman AD, Herrera MLG, Ortega-García S, Flores-Martínez JJ, Arroyo-Cabrales J, Morales-Malacara JB. Class II DRB polymorphism and sequence diversity in two vesper bats in the genus *Myotis*: DRB polymorphism in *Myotis*. *Int J Immunogenet.* 2010;37:401–5.
40. Palmer JM, Berkman LK, Marquardt PE, Donner DM, Jusino MA, Lindner DL. Preliminary characterization of little brown bats (*Myotis lucifugus*) immune MHC II DRB alleles using next-generation sequencing. *Peer J Prepr.* 2016;4:e1662v1.
41. Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature.* 2000;403:853–8.
42. Fenton MB, Simmons NB. It’s a bat! In: *Bats: a world of science and mystery.* University of Chicago Press; 2015 [cited 20 mai 2015].
43. Catzeflis F, Dewynter M, Pineau K. Liste taxonomique commentée des chiroptères de Guyane. *Le Rhinologue.* 2013;19:89–102.
44. Brosset A, Charles-Dominique P, Cockle A, Cosson J-F, Masson D. Bat communities and deforestation in French Guiana. *Can J Zool.* 1996;74:1974–82.
45. Delaval M, Charles-Dominique P. Edge effects on frugivorous and nectarivorous bat communities in a neotropical primary forest in French Guiana. *Revue d’écologie.* 2006;61:343–52.
46. de Thoisy B, Bourhy H, Delaval M, Pontier D, Dacheux L, Darcissac E, et al. Bioecological drivers of rabies virus circulation in a Neotropical bat community. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10:e0004378.
47. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature.* 2008;451:990–3.
48. Pedersen AB, Davies TJ. Cross-species pathogen transmission and disease emergence in primates. *Ecohealth.* 2010;6:496–508.
49. Sikes RS, Gannon WL. Guidelines of the American society of mammalogists for the use of wild mammals in research. *J Mammal.* 2011;92:235–53.
50. Bowen L, Aldridge BM, Gulland F, Van Bonn W, DeLong R, Melin S, et al. Class II multifunctionality generated by variable MHC-DRB region configurations in the California sea lion (*Zalophus californianus*). *Immunogenetics.* 2004;56:12–27.
51. Wilkinson GS, Chapman AM. Length and sequence variation in evening bat D-loop mtDNA. *Genetics.* 1991;128:607–17.
52. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics.* 2012;28:1647–9.
53. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:3059–66.
54. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezukh Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res.* 2008;36:W5–9.
55. Kennedy L, Ryvar R, Gaskell R, Addie D, Willoughby K, Carter S, et al. Sequence analysis of MHC DRB alleles in domestic cats from the United Kingdom. *Immunogenetics.* 2002;54:348–52.
56. Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 2009;25:1451–2.
57. Klein J, Bontrop RE, Dawkins RL, Erlich HA, Gyllenstein UB, Heise ER, et al. Nomenclature for the major histocompatibility complexes of different species: a proposal. *Immunogenetics.* 1990;31:217–9.
58. Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 2010;10:564–7.
59. Goudet J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3).
60. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30:2725–9.
61. Sawyer S. Statistical tests for detecting gene conversion. *Mol Biol Evol.* 1989;6:526–38.
62. Pond SLK, Posada D, Gravenor MB, Woelck CH, Frost SDW. Automated phylogenetic detection of recombination using a genetic algorithm. *Mol Biol Evol.* 2006;23:1891–901.
63. Pond SLK, Frost SDW, Muse SV. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics.* 2005;21:676–9.
64. Delport W, Poon AFY, Frost SDW, Pond SLK. Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics.* 2010;26:2455–7.
65. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, et al. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature.* 1993;364:33–9.
66. Jukes TH, Cantor CR. CHAPTER 24 - Evolution of protein molecules. In: Munro HN, editor. *Mamm. Protein Metab.* [Internet]. Academic Press; 1969 [cited 2015 Jul 25]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781483232119500097>
67. Nei M, Gojobori T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol.* 1986;3:418–26.
68. Wlasiuk G, Nachman MW. Adaptation and constraint at toll-like receptors in primates. *Mol Biol Evol.* 2010;27:2172–86.
69. Yang Z. PAML 4: Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood. *Mol Biol Evol.* 2007;24:1586–91.
70. Yang Z, Nielsen R, Goldman N, Pedersen A-MK. Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites. *Genetics.* 2000;155:431–49.
71. Yang Z. Bayes empirical bayes inference of amino acid sites under positive selection. *Mol Biol Evol.* 2005;22:1107–18.
72. Pond SLK, Frost SDW. Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Mol Biol Evol.* 2005;22:1208–22.
73. Murrell B, Wertheim JO, Moola S, Weighill T, Scheffler K, Kosakovsky Pond SL. Detecting individual sites subject to episodic diversifying selection. *PLoS Genet.* 2012;8:e1002764.
74. Jensen JL, Bohonak AJ, Kelley ST. Isolation by distance, web service. *BMC Genet.* 2005;6:13.
75. Rousset F. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-Statistics under isolation by distance. *Genetics.* 1997;145:1219–28.
76. Leigh JW, Bryant D. popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol.* 2015;6(9):1110–6.
77. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol.* 2012;29:1969–73.
78. Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics.* 2003;19:1572–4.
79. Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol.* 2003;52:696–704.
80. Darriba R, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods.* 2012;9:772–72.
81. Consuegra S, Phillips N, Gajardo G, de Leaniz CG. Winning the invasion roulette: escapes from fish farms increase admixture and facilitate establishment of non-native rainbow trout. *Evol Appl.* 2011;4:660–71.
82. Monzón-Argüello C, García de Leaniz C, Gajardo G, Consuegra S. Less can be more: loss of MHC functional diversity can reflect adaptation to novel conditions during fish invasions. *Ecol Evol.* 2013;3(10):3359–68.
83. Dunn RR, Davies TJ, Harris NC, Gavin MC. Global drivers of human pathogen richness and prevalence. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 2010;14:rsbp20100340.
84. Gay N, Olival KJ, Bumrungsri S, Siriaronrat B, Bourgarel M, Morand S. Parasite and viral species richness of Southeast Asian bats: Fragmentation of area distribution matters. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2014;3:161–70.
85. Winternitz JC, Wares JP. Duplication and population dynamics shape historic patterns of selection and genetic variation at the major histocompatibility complex in rodents. *Ecol Evol.* 2013;3:1552–68.

86. Pechouskova E, Dammhahn M, Brameier M, Fichtel C, Kappeler PM, Huchard E. MHC class II variation in a rare and ecological specialist mouse lemur reveals lower allelic richness and contrasting selection patterns compared to a generalist and widespread sympatric congener. *Immunogenetics*. 2015;67:229–45.
87. Schaschl H, Wandeler P, Suchentrunk F, Obexer-Ruff G, Goodman SJ. Selection and recombination drive the evolution of MHC class II DRB diversity in ungulates. *Heredity*. 2006;97:427–37.
88. Hughes AL, Yeager M. Natural selection and the evolutionary history of major histocompatibility complex loci. *Front Biosci*. 1998;3:d509–16.
89. Martins FM, Templeton AR, Pavan AC, Kohlbach BC, Morgante JS. Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): Marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. *BMC Evol Biol*. 2009;9:294.
90. Pavan AC, Martins F, Santos FR, Ditchfield A, Redondo RA. Patterns of diversification in two species of short-tailed bats (*Carollia* Gray, 1838): the effects of historical fragmentation of Brazilian rainforests. *Biol J Linn Soc*. 2011;102:527–39.
91. Rojas D, Warsi OM, Dávalos LM. Bats (Chiroptera: Noctilionoidea) challenge a recent origin of extant neotropical diversity. *Syst Biol*. 2016;65:432–48.
92. Nei M, Gu X, Sitnikova T. Evolution by the birth-and-death process in multigene families of the vertebrate immune system. *Proc Natl Acad Sci*. 1997;94:7799–806.
93. Hughes A. Balancing selection: The major histocompatibility complex. *Adaptive Evolution of Genes and Genomes*. New York: Oxford University Press. 1999; pp. 54–89.
94. Carrillo-Araujo M, Taş N, Alcántara-Hernández RJ, Gaona O, Schondube JE, Medellín RA, et al. Phyllostomid bat microbiome composition is associated to host phylogeny and feeding strategies. *Evol Genomic Microbiol*. 2015;6:447.
95. Klein J. Origin of major histocompatibility complex polymorphism: The trans-species hypothesis. *Hum Immunol*. 1987;19:155–62.
96. Těšický M, Vinkler M. Trans-species polymorphism in immune genes: general pattern or MHC-restricted phenomenon? *J Immunol Res*. 2015;2015:1–10.
97. de Bellocq JG, Suchentrunk F, Baird SJE, Schaschl H. Evolutionary history of an MHC gene in two leporid species: characterisation of Mhc-DQA in the European brown hare and comparison with the European rabbit. *Immunogenetics*. 2008;61:131–44.
98. Prugnolle F, Manica A, Charpentier M, Guégan JF, Guernier V, Balloux F. Pathogen-driven selection and worldwide HLA Class I diversity. *Curr Biol*. 2005;15:1022–7.
99. Miller HC, Allendorf F, Daugherty CH. Genetic diversity and differentiation at MHC genes in island populations of tuatara (*Sphenodon* spp.). *Mol Ecol*. 2010;19:3894–908.
100. Fumagalli M, Sironi M, Pozzoli U, Ferrer-Admetlla A, Pattini L, Nielsen R. Signatures of environmental genetic adaptation pinpoint pathogens as the main selective pressure through human evolution. *PLoS Genet*. 2011;7:e1002355.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Supporting information

Supplementary Table 1. Characteristics of the 14 capture sites used, with their GPS coordinates

#	Sampling site	Type	Landscape	GPS coordinates	
				Latitude (N)	Longitude (W)
1	Cacao	Foraging area	Anthropized area	4° 34' 33.771"	52° 28' 4.926"
2	Camp du Tigre	Foraging area	Anthropized area	4° 54' 46.764"	52° 18' 23.219"
3	Les Salines	Foraging area	Anthropized area	4° 54' 57.821"	52° 16' 18.452"
4	Macouria	Foraging area	Anthropized area	5° 1' 0.12"	52° 28' 59.879"
5	Saint-Georges	Foraging area	Anthropized area	3° 53' 60"	51° 47' 59.999"
6	Apatou	Foraging area	Edge habitats	5° 9' 20.419"	54° 19' 59.336"
7	Mont Matoury, Lac des Américains	Foraging area	Edge habitats	4° 51' 28"	52° 22' 6.999"
8	Paracou	Roost	Edge habitats	5° 14' 21.282"	52° 55' 24.218"
9	Saut Athanase	Mixed†	Edge habitats	4° 11' 14.706"	52° 19' 11.21"
10	Cave F	Roost	Pristine primary lowland forests	4° 38' 59.144"	52° 17' 35.441"
11	Cave M	Roost	Pristine primary lowland forests	4° 32' 6.82"	52° 9' 6.239"
12	Réserve naturelle régionale Trésor (RNRT)	Foraging area	Pristine primary lowland forests	4° 36' 50.513"	52° 17' 10.449"
13	Bourda	Foraging area	Urban and periurban areas	4° 54' 58.712"	52° 17' 3.48"
14	Rémire	Foraging area	Urban and periurban areas	4° 54' 57.821"	52° 16' 18.453"

† *D. rotundus* and *C. perspicillata* individuals were trapped in this area while foraging, with mist nets erected around livestock or through putative foraging courses, whereas *M. molossus* individuals were trapped in their roosts.

Supplementary Table 2. List of samples successfully amplified for the MHC class II DRB loci.

Species	Sample ID	Sex	Capture site	Landscape	Subgroup	MHC class II DRB exon 2	
						Positive clones	Verified clones
<i>C. perspicillata</i>	5	F	Paracou	Edge habitats	EH	4	3
<i>C. perspicillata</i>	9	M	Paracou	Edge habitats	EH	11	8
<i>C. perspicillata</i>	11	F	Paracou	Edge habitats	EH	7	3
<i>C. perspicillata</i>	ap12	F	Apatou	Edge habitats	EH	3	3
<i>C. perspicillata</i>	ap13	F	Apatou	Edge habitats	EH	6	6
<i>C. perspicillata</i>	ap14	F	Apatou	Edge habitats	EH	1	0
<i>C. perspicillata</i>	ap30	F	Apatou	Edge habitats	EH	1	0
<i>C. perspicillata</i>	ap33	M	Apatou	Edge habitats	EH	1	1
<i>C. perspicillata</i>	e1031	M	Bourda	Urban and periurban areas	UR	7	4
<i>C. perspicillata</i>	e1032	M	Bourda	Urban and periurban areas	UR	8	6
<i>C. perspicillata</i>	e1036	NR	Bourda	Urban and periurban areas	UR	3	3
<i>C. perspicillata</i>	r105	M	Rémire	Urban and periurban areas	UR	15	12
<i>C. perspicillata</i>	r107	NR	Rémire	Urban and periurban areas	UR	13	12
<i>C. perspicillata</i>	r152	F	Apatou	Edge habitats	EH	4	4
<i>C. perspicillata</i>	r215†	M	Cacao	Anthropized areas	AA→EH	7	7
<i>C. perspicillata</i>	r216†	M	Cacao	Anthropized areas	AA→EH	7	3
<i>C. perspicillata</i>	r347	M	Paracou	Edge habitats	EH	8	3
<i>C. perspicillata</i>	r364	M	Cave F	Pristine primary lowland forests	PF	12	10
<i>C. perspicillata</i>	r44	F	RNRT	Pristine primary lowland forests	PF	14	12
<i>C. perspicillata</i>	r62	F	RNRT	Pristine primary lowland forests	PF	10	6
<i>C. perspicillata</i>	r848	NR	Saut Athanaze	Edge habitats	PF	6	4
<i>C. perspicillata</i>	r895	F	Cave F	Pristine primary lowland forests	PF	1	0
<i>D. rotundus</i>	at7	F	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	9	7
<i>D. rotundus</i>	at9	F	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	24	21
<i>D. rotundus</i>	r184	F	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	5	3
<i>D. rotundus</i>	r200	M	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	7	6
<i>D. rotundus</i>	r201	F	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	6	4
<i>D. rotundus</i>	r202	M	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	4	1
<i>D. rotundus</i>	r203	F	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	6	6
<i>D. rotundus</i>	r270	F	Cave F	Pristine primary lowland forests	CF	10	7
<i>D. rotundus</i>	r407	M	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	19	15
<i>D. rotundus</i>	r408	M	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	17	13
<i>D. rotundus</i>	r417	M	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	15	13
<i>D. rotundus</i>	r426	M	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	3	2
<i>D. rotundus</i>	r497	M	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	9	6
<i>D. rotundus</i>	r498	F	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	10	7
<i>D. rotundus</i>	r499	M	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	4	3
<i>D. rotundus</i>	r500	F	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	7	7
<i>D. rotundus</i>	r602	M	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	8	7
<i>D. rotundus</i>	r604	M	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	6	6
<i>D. rotundus</i>	r606	F	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	9	8
<i>D. rotundus</i>	r607	M	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	10	10
<i>D. rotundus</i>	r691	M	Cave M	Pristine primary lowland forests	CM	1	0
<i>D. rotundus</i>	r693	M	Cave F	Pristine primary lowland forests	CF	10	9
<i>D. rotundus</i>	r714	M	Cave F	Pristine primary lowland forests	CF	10	6
<i>D. rotundus</i>	r717	F	Cave F	Pristine primary lowland forests	CF	10	2
<i>D. rotundus</i>	r742	M	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	11	3
<i>D. rotundus</i>	r743	M	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	9	8
<i>D. rotundus</i>	r747	M	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	6	6
<i>D. rotundus</i>	r749	M	Cave M	Pristine primary lowland forests	CM	8	5
<i>D. rotundus</i>	r757	F	Cave M	Pristine primary lowland forests	CM	8	8
<i>D. rotundus</i>	r764	F	Cave M	Pristine primary lowland forests	CM	6	3
<i>D. rotundus</i>	r780	F	Cave M	Pristine primary lowland forests	CM	8	8
<i>D. rotundus</i>	r782	F	Cave M	Pristine primary lowland forests	CM	8	7
<i>D. rotundus</i>	r790	F	Cave M	Pristine primary lowland forests	CM	3	1
<i>D. rotundus</i>	r795	M	Cave M	Pristine primary lowland forests	CM	10	9
<i>D. rotundus</i>	r798	M	Cave M	Pristine primary lowland forests	CM	4	4
<i>D. rotundus</i>	r800	F	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	6	2

Sex (F, female; M, male; NR, not registered) are given, as well as capture sites, corresponding landscapes and assignment to subgroups. Ten recombinant clones were sent for sequencing. The total number of clone sequences positive (according to BLAST searches) for the MHC class II DRB exon 2 obtained for each individual and verified sequences (see validation criteria) are given. Sequences were regarded as valid if the following criteria were met: (1) incidence in at least two independent PCRs either from the same individual or different ones, or amplification by two different primer pairs, and (2) identified by at least three identical clones (Kennedy et al. 2002). † Corresponding subgroup was modified due to insufficient successfully amplified samples to be considered as a whole group.

Supplementary Table 2. Suite.

Species	Sample ID	Sex	Capture site	Landscape	Subgroup	MHC class II DRB exon 2	
						Positive clones	Verified clones
<i>M. molossus</i>	r1016	F	Paracou	Edge habitats	PA	11	6
<i>M. molossus</i>	r1017	F	Paracou	Edge habitats	PA	5	0
<i>M. molossus</i>	r1018	F	Paracou	Edge habitats	PA	5	3
<i>M. molossus</i>	r1019	F	Paracou	Edge habitats	PA	4	1
<i>M. molossus</i>	r1020	F	Paracou	Edge habitats	PA	1	0
<i>M. molossus</i>	r1022	F	Paracou	Edge habitats	PA	6	5
<i>M. molossus</i>	r1024	F	Paracou	Edge habitats	PA	9	5
<i>M. molossus</i>	r1025	F	Paracou	Edge habitats	PA	8	4
<i>M. molossus</i>	r1026	F	Paracou	Edge habitats	PA	8	4
<i>M. molossus</i>	r1027	M	Paracou	Edge habitats	PA	6	5
<i>M. molossus</i>	r1030	F	Paracou	Edge habitats	PA	3	0
<i>M. molossus</i>	r1031	M	Paracou	Edge habitats	PA	4	0
<i>M. molossus</i>	r1032	F	Paracou	Edge habitats	PA	2	0
<i>M. molossus</i>	r490	F	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	2	0
<i>M. molossus</i>	r491	F	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	4	2
<i>M. molossus</i>	r493	M	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	5	4
<i>M. molossus</i>	r494	M	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	1	0
<i>M. molossus</i>	r495	F	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	3	2
<i>M. molossus</i>	r731	F	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	1	1
<i>M. molossus</i>	r732	F	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	3	0
<i>M. molossus</i>	r733	M	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	4	0
<i>M. molossus</i>	r734	F	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	6	4
<i>M. molossus</i>	r735	M	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	7	7
<i>M. molossus</i>	r736	F	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	5	0
<i>M. molossus</i>	r738	M	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	2	2
<i>M. molossus</i>	r739	M	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	8	8
<i>M. molossus</i>	r740	M	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	4	4
<i>M. molossus</i>	r741	F	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	17	14
<i>M. molossus</i>	r748	F	Cacao	Anthropized areas	CC	10	8
<i>M. molossus</i>	r826	M	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	4	3
<i>M. molossus</i>	r828	F	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	8	7
<i>M. molossus</i>	r829	M	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	7	4
<i>M. molossus</i>	r835	F	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	1	0
<i>M. molossus</i>	r837	F	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	6	5
<i>M. molossus</i>	r838	M	Saut Athanaze	Edge habitats	SA	7	5
<i>M. molossus</i>	v3049	F	Cacao	Anthropized areas	CC	7	6
<i>M. molossus</i>	v3051	F	Cacao	Anthropized areas	CC	7	3
<i>M. molossus</i>	v3054	M	Cacao	Anthropized areas	CC	12	11
<i>M. molossus</i>	v3055	F	Cacao	Anthropized areas	CC	6	4
Total						674	480

Sex (F, female; M, male; NR, not registered) are given, as well as capture sites, corresponding landscapes and assignment to subgroups. Ten recombinant clones were sent for sequencing. The total number of clone sequences positive (according to BLAST searches) for the MHC class II DRB exon 2 obtained for each individual and verified sequences (see validation criteria) are given. Sequences were regarded as valid if the following criteria were met: (1) incidence in at least two independent PCRs either from the same individual or different ones, or amplification by two different primer pairs, and (2) identified by at least three identical clones (Kennedy et al. 2002). † Corresponding subgroup was modified due to insufficient successfully amplified samples to be considered as a whole group.

Supplementary Table 3. MHC class II *DRB* exon 2 alleles found in *C. perspicillata* individuals and sampling areas.

<i>DRB</i> allele	#1: EH sites (n =11)											#2: PF sites (n =3)			#3: UR sites (n =5)					N	Nseq	Subgroup
	AP12	AP13	AP33	R152	R215	R216	5	9	11	R347	R848	R364	R44	R62	E1031	E1032	E1036	R105	R107			
Cape- <i>DRB</i> *05†																3				1	3	UR
Cape- <i>DRB</i> *16			1				3						2							3	6	EH, PF
Cape- <i>DRB</i> *17				4					3											2	7	EH
Cape- <i>DRB</i> *18								8												1	8	EH
Cape- <i>DRB</i> *19	3																			1	3	EH
Cape- <i>DRB</i> *20‡		3																		1	3	EH
Cape- <i>DRB</i> *21		3																		1	3	EH
Cape- <i>DRB</i> *22														4						1	4	UR
Cape- <i>DRB</i> *23															3					1	3	UR
Cape- <i>DRB</i> *24																3				1	3	UR
Cape- <i>DRB</i> *25						3						7								2	10	EH, PF
Cape- <i>DRB</i> *26												3								1	3	PF
Cape- <i>DRB</i> *27														3						1	3	PF
Cape- <i>DRB</i> *28													3							1	3	PF
Cape- <i>DRB</i> *29																		7		1	7	UR
Cape- <i>DRB</i> *30																		5		1	5	UR
Cape- <i>DRB</i> *31																			9	1	9	UR
Cape- <i>DRB</i> *32‡																			3	1	3	UR
Cape- <i>DRB</i> *33					3															1	3	EH
Cape- <i>DRB</i> *34					4															1	4	EH
Cape- <i>DRB</i> *35									3											1	3	EH
Cape- <i>DRB</i> *36											10									1	10	PF
Cape- <i>DRB</i> *37										4										1	4	EH
# per individual	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	3	2	1	2	1	2	2		110		

N is the total number of bats carrying the allele, Nseq is the total number of clones/sequences validated for the corresponding allele. Number of alleles (#) carried per individual. † Allele previously described by Schad et al. (2012), ‡ Allele presenting a 3-bp deletion. Shared alleles and the highest frequency in each area are shadowed.

Supplementary Table 4. MHC class II *DRB* exon 2 alleles found in *D. rotundus* individuals and sampling areas.

<i>DRB</i> allele	#1: CF (n=4)				#2: CM (n=8)								#3: SA (n=23)															N	Nseq	Subgroup								
	R270	R693	R714	R717	R749	R757	R764	R780	R782	R790	R795	R798	AT7	AT9	R184	R200	R201	R202	R203	R407	R408	R417	R426	R497	R498	R499	R500				R602	R604	R606	R607	R742	R743	R747	R800
Dero- <i>DRB</i> *01												6																								1	6	SA
Dero- <i>DRB</i> *02			3										9	1	1										4				1							6	19	CF, SA
Dero- <i>DRB</i> *03													9																						1	9	SA	
Dero- <i>DRB</i> *04													3																						1	3	SA	
Dero- <i>DRB</i> *05‡																5						13			3											4	25	SA
Dero- <i>DRB</i> *06																4								5											2	9	SA	
Dero- <i>DRB</i> *07																			3																1	3	SA	
Dero- <i>DRB</i> *08																			3																1	3	SA	
Dero- <i>DRB</i> *09	4																																	1	4	CF		
Dero- <i>DRB</i> *10	3																																	1	3	CF		
Dero- <i>DRB</i> *11																				6															1	6	SA	
Dero- <i>DRB</i> *12																				9															1	9	SA	
Dero- <i>DRB</i> *13						7															13														2	20	CM, SA	
Dero- <i>DRB</i> *14																										3		3						2	6	SA		
Dero- <i>DRB</i> *15			2																								3	1	3				2	5	11	CF, SA		
Dero- <i>DRB</i> *16																										4								1	4	SA		
Dero- <i>DRB</i> *17									1															1					3						3	5	CM, SA	
Dero- <i>DRB</i> *18								4				1			2												4	5						4	14	CM, SA		
Dero- <i>DRB</i> *19†	3				1																			2			4	5			9	5		6	22	CF, CM, SA		
Dero- <i>DRB</i> *20	6																																	1	6	CF		
Dero- <i>DRB</i> *21‡		3																																1	3	CF		
Dero- <i>DRB</i> *22																																3			1	3	SA	
Dero- <i>DRB</i> *23																																	3			1	3	SA
Dero- <i>DRB</i> *24					5		5																											2	10	CM		
Dero- <i>DRB</i> *25						3																												1	3	CM		
Dero- <i>DRB</i> *26							3		4																									2	7	CM		
Dero- <i>DRB</i> *27									5	1																								3	7	CM, SA		
Dero- <i>DRB</i> *28										3																								1	3	CM		
Dero- <i>DRB</i> *29																		1									2								2	3	SA	
Dero- <i>DRB</i> *30								3																										2	4	CM, SA		
# per individual	2	2	2	1	1	2	1	2	2	1	2	2	2	3	2	2	1	1	2	2	1	1	1	2	2	1	2	3	2	2	2	1	2	2	2	233		

N is the total number of bats carrying the allele, Nseq is the total number of clones/sequences validated for the corresponding allele. Number of alleles (#) carried per individual.

† Allele present in all of the sampling areas, ‡ Allele presenting a 6-bp insertion. Shared alleles and the highest frequency in each area are shadowed.

Supplementary Table 5. MHC class II *DRB* exon 2 alleles found in *M. molossus* individuals and sampling areas.

<i>DRB</i> allele	#1: CC site (n=5)					#2: PA site (n=8)							#3: SA site (n=15)										N	Nseq	Subgroup						
	V3049	V3051	V3054	V3055	R748	R1016	R1018	R1019	R1022	R1024	R1025	R1026	R1027	R491	R493	R495	R731	R734	R735	R738	R739	R740				R741	R826	R828	R829	R837	R838
Momo- <i>DRB</i> *01						3																							1	3	PA
Momo- <i>DRB</i> *02						3												3											2	6	PA, SA
Momo- <i>DRB</i> *03							3																						1	3	PA
Momo- <i>DRB</i> *04									5										7						7				3	19	PA, SA
Momo- <i>DRB</i> *05									5																				1	5	PA
Momo- <i>DRB</i> *06										4																			1	4	PA
Momo- <i>DRB</i> *07						4						5																2	9	CC, PA	
Momo- <i>DRB</i> *08														4		3				3		3					3	5	16	SA	
Momo- <i>DRB</i> *09						3												3										2	6	CC, PA	
Momo- <i>DRB</i> *10						3																5						2	8	CC, PA	
Momo- <i>DRB</i> *11																					3				3			2	6	SA	
Momo- <i>DRB</i> *12																								10				1	10	SA	
Momo- <i>DRB</i> *13																								4				1	4	SA	
Momo- <i>DRB</i> *14						8																						2	16	CC	
Momo- <i>DRB</i> *15																											5	1	5	SA	
Momo- <i>DRB</i> *16																											5	1	5	SA	
Momo- <i>DRB</i> *17																												1	6	CC	
Momo- <i>DRB</i> *18											4																	1	4	PA	
Momo- <i>DRB</i> *19									3																		3	2	6	PA, SA	
Momo- <i>DRB</i> *20																		3								3	2	6	SA		
# per individual	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	2	1	1	1	1	147			

N is the total number of bats carrying the allele, Nseq is the total number of clones/sequences validated for the corresponding allele. Number of alleles (#) carried per individual. Shared alleles and the highest frequency in each area are shadowed.

Supplementary Table 6A. Pairwise differentiation between *C. perspicillata* environment subgroups using conventional F-statistic based on haplotype frequencies.

MHC				D-LOOP			
	PF	EH	UR	AA	PF	PF	UR
PF	*	NS	NS	AA	*	NS	NS
EH	-0.068	*	NS	PF	-0.029	*	NS
UR	0.042	0.026	*	EH	-0.010	-0.022	*
				UR	0.012	-0.023	-0.016

Computations were performed for both MHC and mtDNA D-loop data. Population pairwise FSTs are given below the diagonal and significant p -values above diagonal. Significance level $\alpha \leq 0.05$. NS: p -values not significant ($\alpha > 0.05$).

Supplementary Table 6B. Pairwise differentiation between *C. perspicillata* collecting locations using conventional F-statistic based on haplotype frequencies.

MHC									D-LOOP													
	AP	SA	Bourda	CC	CF	PA	Rémire	RNRT	Camp du Tigre	Saint Georges	Macouria	Salines	CC	PA	AP	Mt Matoury	SA	RNRT	CF	Bourda	Rémire	
AP	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	Camp du Tigre	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SA	0.319	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	Saint Georges	0.266	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Bourda	0.119	0.355	*	NS	NS	NS	NS	NS	Macouria	0.163	0.529	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CC	0.132	0.420	0.148	*	NS	NS	NS	NS	Salines	0.123	0.400	0.258	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CF	0.319	1.000	0.355	0.420	*	NS	NS	NS	CC	0.163	0.529	0.333	0.258	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
PA	0.000	0.342	0.138	0.153	0.342	*	NS	NS	PA	0.123	0.400	0.258	0.200	0.111	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Rémire	0.062	0.314	0.074	0.083	0.314	0.083	*	NS	AP	0.072	0.276	0.171	0.130	0.171	0.130	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
RNRT	-0.002	0.314	0.074	-0.048	0.314	0.020	0.000	*	Mt Matoury	0.101	0.342	0.220	0.170	0.220	0.170	0.107	*	NS	NS	NS	NS	NS
									SA	0.163	0.529	0.333	0.258	0.333	0.258	0.171	0.220	*	NS	NS	NS	NS
									RNRT	0.163	0.529	0.333	0.111	0.333	0.258	0.171	0.220	0.333	*	NS	NS	NS
									CF	0.108	0.331	0.218	0.172	0.218	0.172	0.113	0.147	0.218	0.218	*	NS	NS
									Bourda	0.227	0.586	0.411	0.143	0.411	0.333	0.236	0.292	0.411	0.111	0.282	*	NS
									Rémire	0.362	1.000	0.667	0.529	0.667	0.529	0.375	0.461	0.667	0.667	0.429	0.680	*

Computations were performed for both MHC and mtDNA D-loop data. Population pairwise FSTs are given below the diagonal and significant p -values above diagonal. Significance level $\alpha \leq 0.05$. NS: p -values not significant ($\alpha > 0.05$).

Supplementary Table 7. Pairwise differentiation between *D. rotundus* subgroups using conventional F-statistic based on haplotype frequencies.

MHC				D-LOOP			
	CM	SA	CF		CM	SA	CF
CM	*	NS	NS	CM	*	NS	0.000 ± 0.000
SA	0.012	*	NS	SA	0.617	*	0.000 ± 0.000
CF	0.008	-0.047	*	CF	0.475	0.016	*

Computations were performed for both MHC and mtDNA D-loop data. Environmental subgroups correspond to collecting locations, consequently the results presented are the same for both analyses. Population pairwise FSTs are given below the diagonal and significant *p*-values above diagonal. Significance level $\alpha \leq 0.05$. NS: *p*-values not significant ($\alpha > 0.05$).

Supplementary Table 8. Pairwise differentiation between *M. molossus* subgroups using conventional F-statistic based on haplotype frequencies.

MHC				D-LOOP			
MOMO	SA	PA	CC	MOMO	SA	PA	CC
SA	*	NS	NS	SA	*	NS	NS
PA	0.043	*	NS	PA	0.017	*	NS
CC	0.017	0.042	*	CC	-0.040	0.006	*

Computations were performed for both MHC and mtDNA D-loop data. Environmental subgroups correspond to collecting locations, consequently the results presented are the same for both analyses. Population pairwise FSTs are given below the diagonal and significant *p*-values above diagonal. Significance level $\alpha \leq 0.05$. NS: *p*-values not significant ($\alpha > 0.05$).

Supplementary Table 9. Correlations of genetics and geographic distance for the three investigated species, *C. perspicillata*, *D. rotundus*, *M. molossus*

Species	Marker	<i>n</i>		Z	r	R ²	<i>p</i> -value
		Individuals	Localities				
<i>Carollia perspicillata</i>	MHC	19	8	-48.537	-0.064	4.122E-03	0.563
	D-LOOP	45	13	-49.057	-0.004	1.515E-05	0.519
<i>Desmodus rotundus</i>	MHC	35	3	-11.104	-0.684	4.670E-01	1.000
	D-LOOP	59	3	-1.969	-0.295	8.720E-02	0.499
<i>Molossus molossus</i>	MHC	28	3	-6.140	-0.972	9.450E-01	1.000
	D-LOOP	47	3	-7.336	0.508	2.580E-01	0.334

The correlation between $\log(\text{genetic distance (FST/(1-FST)))}$ and $\log(\text{geographic distance})$ is presented here for both MHC and mtDNA D-loop (DLP) markers. The number of individuals tested, as well as the number of corresponding populations (collection locations) are given. The Z-score, the Pearson's correlation coefficient (r), the coefficient of determination (R²), as well as the *p*-values are given.

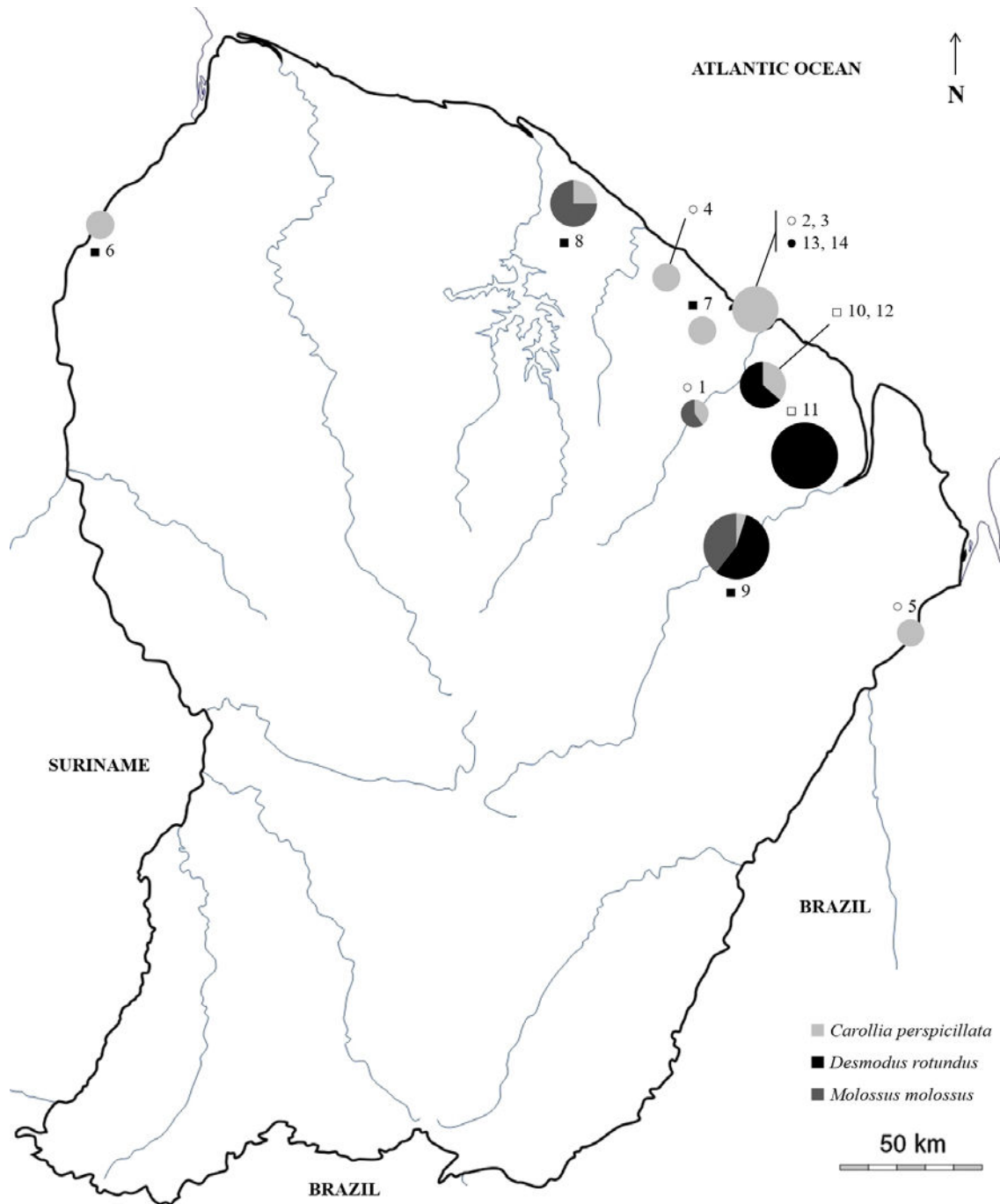


Figure S1. Map of French Guiana showing the capture sites of *C. perspicillata*, *D. rotundus* and *M. molossus*. For clarity, nearby sites within 15 km were grouped. Sites are numbered and labeled according to the type of environment to which they correspond: edge habitats (dark square), anthropized areas (light circle), pristine primary lowland forests (light square), urban and periurban areas (dark circle). Pie chart indicates the proportion of bat species sampled, with *C. perspicillata* in light grey, *D. rotundus* in black and *M. molossus* in dark grey. Small charts indicate a total number of individuals caught ≤ 10 , medium-sized charts (16-22 individuals), large charts (34-61 individuals). Characteristics of the different sites are given in Additional file 1: Table S1.

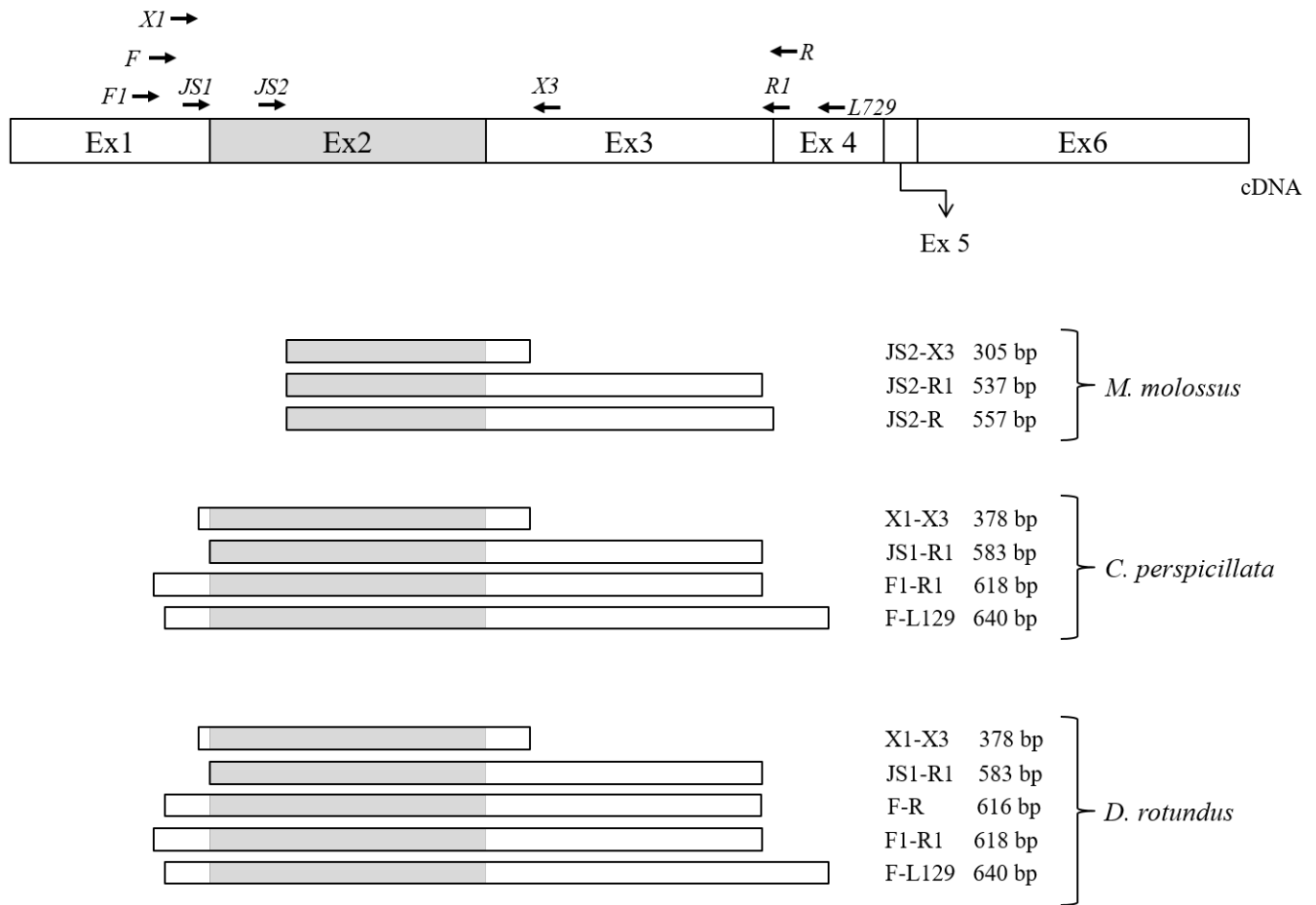


Figure S2. Positions of PCR primers used to amplify the indicated fragments of the MHC class II loci in *C. perspicillata*, *D. rotundus* and *M. molossus*, based on cDNA. The structure of the cDNA of the MHC class II DRB gene is based on [50]. According to each species, boxes indicate the amplified region using each couple of primers. The shaded region represents the region of interest, namely exon 2. Sequences and references of all primers used are given in Table 1.

4.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Représentant près d'un quart des espèces de mammifères connues, à ce jour, les chauves-souris suscitent, depuis ces dernières décennies, l'intérêt scientifique. Elles sont reconnues comme étant des réservoirs *privilegiés* de microorganismes bactériens, fongiques, parasitaires, protozoaires, viraux, etc., dont certains sont capables de franchir les barrières d'espèces et d'infecter l'homme (Veikkolainen et al. 2014; Brook et Dobson 2015; Han et al. 2015b; Olival et al. 2015; Allocati et al. 2016). L'habitat, les caractères bioécologiques et le système immunitaire de ces animaux semblent jouer un rôle déterminant dans leur capacité à maintenir les microorganismes à des seuils non létaux (Omatsu et al. 2007). La capacité de vol actif des chauves-souris semble également jouer un rôle dans leur protection antimicrobienne par une augmentation de leur température corporelle lors du vol. Cette caractéristique permettrait, entre autres, d'inhiber la réplication de certains virus (O'Shea et al. 2014). L'identification de certains virus plus anciens chez les chauves-souris que chez les autres mammifères laisse supposer une longue coévolution avec les microorganismes qu'elles hébergent (Schneeberger et Voigt 2016), et probablement une adaptation de leur système immunitaire. Les chiroptères auraient ainsi développé une réponse immunitaire rapide et efficace induite (i) par les communautés de microorganismes ayant coévoluées avec elles et (ii) par les relations de compétition établies entre les différentes communautés de microorganismes qu'elles hébergent (Schneeberger et Voigt 2016). Ainsi, par leur richesse spécifique, leur diversité écologique et leurs capacités d'adaptation, les chauves-souris constituent un modèle d'étude remarquable des interactions virus-hôtes.

La description des chiroptères, en tant que réservoirs de zoonoses émergentes, associée aux modifications croissantes des écosystèmes naturels et à l'augmentation des contacts entre l'homme et la faune sauvage ont amené la communauté scientifique à s'intéresser (i) à la diversité virale des populations de chauves-souris, notamment dans les zones d'importante richesse d'espèces ; (ii) aux facteurs induisant la diversité des microorganismes, et tout particulièrement viraux ; (iii) aux interactions dominantes dans les populations de microorganismes hébergées par les chauves-souris ; et (iv) aux mécanismes immuns qui permettraient aux chauves-souris d'évoluer, semble-t-il, sans symptômes apparents ou caractéristiques de pathologies chez d'autres animaux. Ces éléments sont

essentiels à la compréhension et la prédiction des émergences d'origine zoonotique, mais également à la mise en place de programmes de surveillance adéquats.

L'objectif de ma thèse était de documenter les diversités virales et immunes de trois espèces de chauves-souris communes de Guyane, qui sont plus ou moins fréquemment en contact avec les populations humaines. En étudiant différentes populations de chauves-souris dans les milieux urbains et forestiers du territoire, nous avons cherché à mieux comprendre les déterminants responsables de la diversité et de la distribution des virus qu'elles hébergent (Chapitre 2.1). En nous intéressant plus particulièrement au virus de la rage, nous avons pu mettre en évidence les facteurs prédictifs de l'infection (Chapitre 2.2). Enfin, la caractérisation de la diversité des gènes *DRB* suggérerait l'importance de l'environnement immédiat et des pressions en pathogènes associées sur l'évolution du CMH et sur les processus d'adaptation locale (Chapitre 3.1). Dans ce dernier chapitre, les conclusions principales de cette thèse sont discutées et comparées aux travaux menés en Eurasie et Amérique du Nord. Les relations entre la diversité virale et la diversité de *DRB* chez les chauves-souris sont également discutées afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les processus d'adaptation locale, ceci afin d'améliorer notre compréhension des interactions virus-hôtes.

4.1. Les déterminants de diversité et distribution virale

Les chauves-souris sont capables de disséminer une variété de virus infectant un large spectre d'hôtes « naturels », telles que les bactéries, les plantes, les invertébrés et les vertébrés (Donaldson et al. 2010; Li et al. 2010; Ge et al. 2012; He et al. 2013; Dacheux et al. 2014). Les travaux menés sur des échantillons de fèces et de salive collectés dans les populations de chauves-souris vampires et les molosses en Guyane montrent une importante diversité de virus dépendante de plusieurs paramètres :

(i) Le niveau de diversité variait en fonction de l'espèce-hôte : la diversité virale observée chez *M. molossus* était deux fois plus importantes en nombre et en diversité d'hôtes « naturels » que celle observée chez *D. rotundus*. Une importante proportion de familles virales identifiées (ainsi que de

genres et d'espèces virales) était propre à chacune des espèces, quelle que soit la provenance de l'échantillon analysé. Ces résultats suggèrent qu'il existerait un premier filtre de diversité déterminé par un caractère phylogénétique de l'hôte et de son rang taxonomique (ici d'espèces). La spécificité des virus, directement associée à la spécificité des hôtes, a également été rapportée dans de nombreuses études et suggère un maintien au niveau intraspécifique de ces virus probablement dû à de longues périodes de coévolution (Rodhain 2015; Schneeberger et Voigt 2016). De même, les chauves-souris dont les relations phylogénétiques montrent une proximité évolutive (au niveau du genre ou de la famille) présentaient globalement les mêmes familles virales. Ainsi, les familles virales *Bunyaviridae* (Calisher et al. 2006), *Circoviridae* (Calisher 2015; Lima et al. 2015), *Polyomaviridae* (Fagrouch et al. 2012; Tao et al. 2013; Lima et al. 2015) ont également été rapportées dans plusieurs genres de la famille des Molossidae (ex. *Molossus*, *Chaerephon* et *Tadarida*). De même, les familles *Herpesviridae* (Razafindratsimandresy et al. 2009), *Parvoviridae* (Canuti et al. 2011) et *Polyomaviridae* (Fagrouch et al. 2012) ont été rapportées chez *Artibeus*, *Carollia*, *Lonchophylla*, *Sturnira*, genres appartenant à la famille des Phyllostomidae. Ces différents résultats laisse penser à un caractère ancestral de certaines familles virales, aussi bien au niveau de l'espèce qu'au niveau de la famille et soutiendraient la longue histoire évolutive des virus et de leurs hôtes.

(ii) Les mêmes familles virales étaient retrouvées chez les chiroptères ayant le même type d'interactions trophiques : pour exemple, les familles virales *Discistroviridae*, *Iflaviviridae*, *Luteoviridae*, *Partiviridae*, *Secoviridae*, *Totiviridae*, etc. étaient associées à un régime alimentaire insectivore (Donaldson et al. 2010; Li et al. 2010; Wu et al. 2015). Nous avons également constaté que le type de proies chassées par les chauves-souris détermine la diversité de familles virales associées à un hôte particulier. Les chauves-souris insectivores présentaient une grande diversité de virus de plantes, insectes et vertébrés dans des ratios variant selon l'environnement. De la même façon, les virus de vertébrés représentaient l'essentiel de la diversité virale chez les chauves-souris hémato-phages et la diversité de virus retrouvés reflétait les stratégies alimentaires mises en place par les populations de *D. rotundus* dans les grottes Mathilde et Fourgassié. Ainsi, la proportion de virus ayant pour origine les ongulés (*Bovine papular stomatitis*, *Bovine parvovirus*, *Ungulate copiarvovirus*)

était plus importante dans les échantillons collectés dans la grotte Mathilde par rapport à celle de Fourgassié où étaient retrouvés, de façon majoritaire, les virus d'origine porcine (*Porcine parvovirus*), aviaire (*Goose parvovirus*, *Avian parvovirus*), rongeur (*Rodent parvovirus*), etc.

(iv) La diversité des familles virales identifiées est également associée aux environnements dans lesquels les chauves-souris évoluent. En effet, l'environnement influe sur les capacités d'adaptation et de survie des microorganismes, détermine la disponibilité des ressources alimentaires (et subséquemment la diversité d'hôtes pour les microorganismes), peut favoriser les interactions avec les prédateurs. De même, il influe sur les rythmes circadiens, la chasse, les interactions inter- et intraspécifiques et les comportements de reproduction des chauves-souris (Wickramasinghe et al. 2003; Zellweger et al. 2016). Les comparaisons de diversité en milieux urbains et forestiers montrent une nette diminution de la diversité virale dans les milieux urbains. Les perturbations environnementales rencontrées dans les environnements de lisière ou urbain induisent une diminution des habitats pour la faune et à terme une diminution de la richesse d'espèce (Zellweger et al. 2016). Des études montrent que seules les espèces de chauves-souris présentant une plasticité écologique importante, dont *M. molossus* fait partie, sont capables de persister dans les environnements les plus perturbés (Jung et Threlfall 2016). Ces chauves-souris acquièrent alors des comportements autres que ceux observés chez leurs congénères évoluant dans des environnements moins perturbés ou vierges (Luck et al. 2013; McConville et al. 2014). La diversité de genres et espèces virales hébergée par ces espèces est donc caractéristique du milieu et est orientée par la diversité virale hébergée par les espèces d'insectes dominants dans le milieu. *A contrario*, la diversité de genres et espèces virales observée en forêt sera beaucoup plus importante. Pour exemple dans la famille *Parvoviridae*, nous avons identifié, dans la sous-famille *Densovirinae*, quatre genres (*Ambidensovirus*, *Ietavirus*, *Brevidensovirus*, *Hepandensovirus*) de virus en milieu forestier contre deux (*Ietavirus*, *Brevidensovirus*) en milieu urbain. Ces résultats corroborent les hypothèses émises par Gay et collaborateurs qui mettent en évidence, chez les chauves-souris d'Asie, une richesse en endoparasites fortement dépendante (corrélation négative) de la fragmentation des habitats (Gay et al. 2014). À une échelle plus fine, les microhabitats influent également sur la diversité virale. Ces microhabitats (ex.

grottes, troncs, toits) procurent des conditions spécifiques à l'établissement d'écosystèmes particuliers. Nous avons pu, au cours de ce travail, observer des divergences dans la diversité de familles virales chez les deux populations de vampires qui présentent un tronc commun de diversité virale (ancestral/espèce) et évoluent, toutes deux, dans un environnement forestier (pressions associées similaires). Pour exemple, l'exclusivité des familles *Bunyaviridae* et *Astroviridae* (non rapporté aux stratégies alimentaires différentes) présente chez les vampires de la grotte Fourgassié montre un effet du microhabitat. L'effet des microhabitats sur les patrons de diversité des communautés bactériennes a également pu être identifié (Buesing et al. 2009). Les microhabitats auraient un effet structurant sur les communautés microbiennes et diminueraient la dispersion (favorisant l'homogénéisation) entre les communautés. Dans cette étude, les deux grottes étudiées contiennent des communautés de chauves-souris différentes en nombre et en espèces. Ainsi, les résultats obtenus pourraient refléter l'action concomitante des interactions inter et intraspécifiques établies entre les communautés de chauves-souris partageant le même microhabitat et potentiellement des caractéristiques abiotiques propres à chacun (ex. degré d'humidité, hygrométrie, végétation). Ces résultats suggèrent que les variations intrinsèques de l'environnement immédiat pourraient contribuer à la diversité virale. Néanmoins, le poids de ce facteur reste encore à déterminer.

4.2. Les déterminants de la transmission virale

Une fois les déterminants de diversité identifiés, nous avons dans un second temps comparé les modes et capacités de transmission virale en fonction des types d'échantillons et des espèces. Les résultats montrent une diversité virale trois fois plus importante dans les échantillons de fèces, suggérant un mode de transmission des virus plus efficace par voie fécale. De même, la diversité de familles virales est plus importante chez les chauves-souris insectivores, ce qui suggère une capacité de dissémination de virus capables d'infecter un spectre d'hôtes beaucoup plus important. Alors que pour les chauves-souris vampires, les capacités de transmission semblent limitées par la singularité de leur régime alimentaire, ce qui tend à diminuer la diversité virale chez cette espèce.

Lorsque l'on compare les séquences virales retrouvées dans les échantillons de salive et de fèces, on constate une proportion importante de séquences similaires (variation de quelques nucléotides induisant des mutations non-sens ou silencieuses) ou identiques entre les différents types d'échantillons pour les virus des familles *Myxodnaviridae*, *Papillomaviridae*, *Polyomaviridae*. Ces résultats laissent supposer que les virus détectés dans les fèces proviendraient alors de l'excrétion directe des virus après ingestion ou de l'excrétion des virus après qu'ils se soient multipliés et aient franchi la barrière intestinale. Ainsi les virus sont probablement (i) transmis de façon active et privilégiée dans l'environnement *via* les fèces des chauves-souris, ce qui leur permet d'augmenter les chances de rencontrer un nouvel hôte (Combes 2003) ; et (ii) maintenus dans les communautés de chauves-souris en fonction des échanges intra et interspécifiques, *via* les interactions sociales de toilettage, *via* la trophallaxie (dans le cas de *D. rotundus*) ou encore *via* des comportements de défense envers les autres espèces vivant en syntopie.

L'étude sur le virus rabique présente un premier modèle de la compréhension des interactions virus-hôte-environnement. Elle montre qu'à l'instar des communautés de chauves-souris d'Amérique Latine, les chauves-souris non hématophages contribuent au maintien du virus dans les communautés de chauves-souris (Almeida et al. 2011; Escobar et al. 2015; de Thoisy et al. 2016). Les capacités de tolérance à la perturbation et les facteurs bioécologiques tels que le régime alimentaire et le type de gîte sont déterminants dans la circulation du virus. De même, l'habitat forestier constitue un facteur prédictif à la prévalence, et souligne la nécessité de mettre en place une surveillance des modifications des milieux naturels afin de prévenir d'une potentielle émergence du virus rabique dans les populations humaines, à l'instar d'autres pays d'Amérique Latine (Scheffer et al. 2007; Gilbert et al. 2012; Escobar et al. 2015).

4.3. Impact de la structure spatiale des populations et socialité

La présence, l'abondance et la diversité des pathogènes dans une espèce hôte sont également déterminées par la fréquence et l'intensité des comportements sociaux et les stratégies de reproduction

et de naissance. Ces éléments sont également pondérés par la structure génétique des populations et par la syntopie avec d'autres espèces hôtes (Pedersen et Davies 2010). L'ensemble de ces paramètres est influencé par la densité de population d'hôtes, la taille des groupes sociaux, la migration et l'introgression des populations (Duboscp et Heeb 2015). En effet, la probabilité d'être infecté par un microorganisme et la taille des populations serait positivement corrélées (Côté et Poulinb 1995; Rifkin et al. 2012; Patterson et Ruckstuhl 2013). De même, cette corrélation est encore plus importante lorsque les capacités de dispersion des animaux sont importantes, tel qu'observé chez les oiseaux (Rifkin et al. 2012). À l'inverse, lorsque les pathogènes sont à transmission vectorielle, la corrélation est négative (Côté et Poulinb 1995). On peut ainsi supposer que ces mêmes corrélations existent pour les chauves-souris qui présentent des capacités de dispersion plus importante que les autres mammifères et qui vivent le plus souvent en colonie mono ou multispécifique allant jusqu'à plusieurs milliers d'individus.

Dans notre étude, l'analyse du marqueur neutre mitochondrial révèle que les populations de *M. molossus* sont panmictiques. Peel et collaborateurs ont montré, dans les populations d'*Eidolon helvum*, en Afrique, que le fait d'être panmictique faciliterait la transmission virale du *Lagos bat virus* (LBV, *Rhabdoviridae*) et des *Henipavirus* (*Paramyxoviridae*) et l'acquisition d'anticorps contre ces infections dans les colonies de chauves-souris, même éloignées géographiquement (Peel et al. 2013). Ainsi, le partage d'espèces virales observé dans les différentes populations de *M. molossus* et l'importante diversité détectée pourraient également être associés, en plus de la phylogénie de l'hôte et des caractères bioécologiques, au brassage génétique aléatoire des populations.

Pour les populations desmodines, l'analyse du marqueur neutre mitochondrial montre une structuration génétique entre les populations d'Athanase et de la grotte Mathilde contre celle de la grotte Fourgassié. Turmelle et Olival ont montré une corrélation positive entre la structuration spatiale des populations de chauves-souris et la richesse virale (Turmelle et Olival 2009). Cependant, les résultats de diversité obtenus pour *D. rotundus* ne montrent pas de différences dans la richesse virale entre les deux populations. Ce résultat pourrait être expliqué par une faible taille efficace de population associée à une richesse virale moindre. La taille efficace des populations a également été

décrit par Turmelle et Olival comme pouvant être déterminante dans la transmission et la richesse virale chez les chauves-souris (Turmelle et Olival 2009).

Dans notre étude sur le modèle d'interactions RABV-hôtes, nous avons mis en évidence qu'une structure de colonie de types monospécifique (plutôt que multispécifique) favorisait le fait d'être séropositif à RABV. Ces résultats suggèrent que le fait d'évoluer en syntopie ne suffit pas à la transmission virale. Il est nécessaire de prendre en considération la capacité intrinsèque du virus à pouvoir changer d'hôte, s'adapter et y effectuer son cycle de vie. Pour exemple, Cui et collaborateurs rapportent que les séquences de coronavirus (CoVs) obtenus chez les *Vespertilionidae*, formaient des clusters phylogénétiques, même lorsque les séquences de CoVs provenaient de chauves-souris, de la même espèce, capturées à plus de 1 000 km de distance (Cui et al. 2007). En revanche, les auteurs n'ont pas pu mettre en évidence de changement d'hôtes (à l'échelle spécifique) pour les CoVs chez les chauves-souris évoluant en sympatrie. De la même façon, Kuzmin et collaborateurs montrent que, dans un même gîte, les chauves-souris d'espèces différentes présentent des anticorps pour des lyssavirus différents suggérant que des cycles de transmission dans les mêmes habitats sont maintenus chez les chauves-souris sans transmission interespèces (Kuzmin et al. 2011). Ces résultats pourraient renforcer notre hypothèse selon laquelle le caractère monospécifique des colonies est un facteur prédictif de la circulation de RABV dans les populations de chauves-souris.

L'association entre les pathogènes et la socialité des hôtes contribue aux processus de coévolution hôtes-pathogènes et à l'adaptabilité des hôtes. Toutefois, outre leurs effets sur la diversité des espèces de pathogènes et d'hôtes, il a été démontré qu'il existe un lien étroit entre les stratégies d'évitement ou de résistance des pathogènes et le développement des stratégies de défenses des hôtes, que ce soit au niveau immunitaire ou au niveau comportemental (Altizer et al. 2003). Une espèce très sociale verra ainsi augmenter en concomitance son risque d'acquisition et de transmission des pathogènes et le développement des mécanismes de défenses ou de tolérance à l'infection (Godfrey 2013).

4.4. Potentiel d'adaptation locale chez les chauves-souris

Les mécanismes immuns des chauves-souris suggèrent une orientation de la réponse vers un contrôle et une élimination rapide des virus et soulignent la capacité des chauves-souris à ne pas développer de symptômes cliniques suite à l'infection (Baker et Zhou 2015). L'étude menée sur la diversité du CMH des chauves-souris nous a permis de contribuer à l'identification des mécanismes impliqués dans le maintien du polymorphisme de ses gènes.

Nous avons pu mettre en évidence des patrons de diversité associés au caractère spécifique et au caractère écologique (régime alimentaire), à l'habitat des hôtes, mais aussi de l'histoire neutre des individus. Au niveau de l'espèce, nous avons observé des similitudes dans la distribution allélique au sein des individus. Chez les phyllosomidés, les chauves-souris vampires étaient majoritairement hétérozygotes et certains individus présentaient plus de deux allèles. Les mollossidés étaient pour la plupart homozygotes. Le nombre de *loci* fonctionnels rapporté dans notre étude était similaire à ceux déjà décrits chez d'autres phyllostomidés et chez d'autres espèces phylogénétiquement plus éloignées (Schad et al. 2012b; Real-Monroy et al. 2014). La multiplicité/duplication des *loci* est caractéristique des gènes du CMH. Cette particularité lui confère une capacité immunitaire plus importante et permet l'acquisition de mutations sans diminuer ses capacités de reconnaissance (Murphy et al. 2012b). La duplication des *loci* permet ainsi d'assurer l'intégrité immunitaire et contribue à l'acquisition de nouveaux traits immunologiques utiles dans la course aux armements entre hôtes et microorganismes (Charbonnel et al. 2006). Le niveau de polymorphisme observé dans les trois espèces de chauves-souris étudiées était similaire aux autres mammifères et oiseaux et souligne l'homologie de fonction de ces gènes (Sommer 2005).

Les signatures de sélection ont mis en évidence un maintien du polymorphisme allélique élevé dans les populations *via* les mécanismes de sélection balancée, illustrés par des taux de substitutions non synonymes, dans la région de liaison à l'antigène, supérieurs aux taux de substitutions synonymes. La sélection positive contribue donc au maintien optimal des capacités de reconnaissance de ces

molécules. Par ailleurs, nous avons également mis en évidence une sélection négative agissant sur le gène *DRB* (Annexes 1 et 2). Les codons sélectionnés négativement (NSS) étaient (i) soit des sites connus pour être impliqués dans la liaison à l'antigène chez l'homme (Brown et al. 1993), (ii) soit des sites très proches des sites de liaison à l'antigène identifiés chez l'homme, (iii) ou des sites proches des sites sélectionnés positivement identifiés dans l'étude (PSS). À l'instar des PSS, nous avons observé des pressions de sélection caractéristiques des espèces et de leurs habitats. Chaque NSS était caractéristique de l'espèce. Contrairement aux PSS identifiés dans l'étude CMH, les résultats observés à l'échelle environnementale montrent une absence de NSS communs entre les environnements chez *C. perspicillata*, suggérant un contrôle des mutations délétères dépendant des pressions intrinsèques de l'environnement et de fait une adaptation locale aux pathogènes associés plutôt qu'aux caractères spécifiques de l'hôte.

Par contraste, la similitude prépondérante des pressions de sélections négatives chez *D. rotundus* souligne à la fois l'impact des caractères biologiques et des réponses à l'environnement. Ces résultats sont également appuyés par les différences de diversités virales observées dans les deux populations de chauves-souris vampires étudiées. En effet, la mise en évidence d'un effet du micro-habitat dans l'orientation de la diversité virale, les signatures de sélection directement liées aux contraintes environnementales et la prépondérance d'individus hétérozygotes (conférant un avantage sélectif) corroborent l'hypothèse de *shift* des gènes de l'immunité dans des environnements variables comme observés chez d'autres vertébrés (Eizaguirre et Lenz 2010; Lenz et al. 2013; Froeschke et Sommer 2014). Le mode d'évolution trans-espèces des allèles au sein des phyllostomidés pourrait être associé à la coévolution de certaines familles virales communes aux membres de cette famille de chiroptères. Une comparaison des diversités virales entre *C. perspicillata* et *D. rotundus* permettrait de justifier le maintien de ces allèles chez les phyllostomidés. En conclusion, les études menées indiquent qu'il existe, en réponse à l'adaptation locale, des mécanismes permettant en parallèle d'augmenter ou d'adapter la faculté de reconnaissance des microorganismes selon les espèces et les environnements, mais également d'assurer l'intégrité moléculaire, primordiale à la reconnaissance des pathogènes.

4.5. Perspectives et considérations futures

Cette thèse a permis l'acquisition de données fondamentales sur (i) la diversité virale et immunitaire en fonction des milieux urbains et forestiers, (ii) les facteurs prédictifs de l'infection par le virus rabique dans les populations de chauves-souris et (iii) la capacité adaptative des chauves-souris à l'infection. Nous avons également pu identifier un certain nombre de nouveaux virus de mammifères, de manière complète ou partielle. Ces données constituent un premier pas vers la compréhension de la dynamique virale et des interactions complexes entre les communautés de chauves-souris et les communautés virales. L'un des principaux résultats de ce travail est l'importance du rôle de l'espèce hôte et de son environnement (qu'il soit écologique ou pathogénique) dans la mise en place des diversités virales et des réponses immunitaires adaptatives. Toutefois l'évaluation de l'impact de chacun de ces facteurs sur les virus reste à déterminer et est cruciale dans la mise en place de programme de suivi.

Ce travail a également été le premier à étudier la diversité virale de deux espèces de chauves-souris d'Amazonie. Toutefois, l'impact de l'environnement sur la circulation des familles virales reste encore à déterminer. L'étude du virome d'autres espèces de chauves-souris évoluant également en sympatrie et syntopie dans les environnements forestiers et urbains de Guyane permettrait de comparer les diversités virales d'espèces partageant les mêmes niches écologiques et potentiellement soumises aux mêmes contraintes environnementales afin (i) de mieux évaluer l'impact des caractères spécifiques et écologiques sur la diversité virale (ex. est-ce que deux espèces de chauves-souris phylogénétiquement éloignées, mais de même régime alimentaire présentent les mêmes diversités virales dans des contraintes environnementales identiques ?) et (ii) de pouvoir déterminer le poids de l'environnement par rapport aux caractères d'espèces dans le maintien et la circulation de familles virales à l'échelle des communautés de chauves-souris. Il serait également intéressant de pouvoir caractériser (par des approches classiques) différents virus de mammifères identifiés au cours de cette thèse chez d'autres espèces de chauves-souris afin de pouvoir connaître la diversité de virus circulants dans les différentes communautés. Cette étude permettra par des analyses phylogénétiques comparatives de déterminer s'il

existe une coévolution des virus avec leurs hôtes et ainsi mettre en évidence les caractères phylogénétiques impliqués dans la distribution virale en Guyane.

Les rongeurs présentent également une diversité de caractères bioécologiques qui leur permettent d'héberger un nombre important de virus (Han et al. 2015a). Luis et collaborateurs rapportent que les chauves-souris hébergent plus de virus zoonotiques que les rongeurs, mais, du fait de la plus grande diversité spécifique chez ces derniers, le nombre total de virus décrits est plus faible chez les chauves-souris, faisant des rongeurs une menace plus importante dans l'émergence virale (Luis et al. 2013). En Guyane, les chauves-souris sont plus nombreuses en espèces que les rongeurs. Une autre perspective serait de comparer (par des approches métagénomiques) les diversités virales des chauves-souris à celles des rongeurs, afin de pouvoir déterminer le potentiel de transmission zoonotique de ces animaux sur le territoire.

La caractérisation de la diversité virale à différentes échelles d'observation (fèces et salive) a permis de mettre en évidence les possibles cycles de transmission et de maintenance des virus dans les communautés de chauves-souris. Une prochaine étape serait de pouvoir effectuer une étude comparative entre les virus circulants dans les individus (sérums) et pouvant ainsi être transmis par certains vecteurs arthropodes (tels que les tiques et les moustiques) et les virus excrétés (fèces, salive) dans l'environnement. Ce volet est actuellement développé au laboratoire et les premiers résultats montrent une diversité virale moindre par rapport aux échantillons de fèces et salive. Les familles virales identifiées sont, pour la plupart, les mêmes. Toutefois, la caractérisation des espèces virales reste à effectuer. Les chauves-souris vampires des grottes présentent la plus faible des diversités (2-3 familles). Par opposition, dix familles virales, dont trois communes, sont identifiées dans les chauves-souris dans un autre environnement forestier. Ces résultats confirment l'impact de l'environnement dans le filtrage de la diversité virale. Les chauves-souris insectivores capturées dans les forêts présentent la plus grande diversité de familles virales, confirmant une circulation virale plus importante dans les milieux forestiers. Une seconde étape, nécessaire à la compréhension des interactions, serait de mettre en place un modèle d'infection cellulaire dans des lignées immortalisées établies à partir de cellules de chauves-souris. Ce modèle permettra de suivre la dynamique d'infection

et ainsi de pouvoir identifier les mécanismes cellulaires (à l'aide de l'expression des effecteurs antiviraux) qui permettent le contrôle des virus dans les organismes.

Outre les mécanismes liés aux pressions environnementales, les mécanismes impliquant la reproduction sexuée induisent du polymorphisme en favorisant l'introgession dans les populations présentant des CMH différents, par une attraction olfactive augmentée (Sommer 2005; Milinski 2006; Wroblewski et al. 2015). À ce jour, le degré d'implication de ce phénomène n'est pas totalement évalué chez les chauves-souris. Une étude menée chez *Noctilio albiventris* met en évidence un taux d'hétérozygotie plus élevé dans les populations mâles de cette espèce et suggère que les interactions sociales d'accouplement induisent probablement une orientation de la diversité de ces gènes (Schad et al. 2011). Par ailleurs, une association entre la variabilité du CMH, les odeurs corporelles et le succès de coévolution des ectoparasites et leur charge parasitaire dans les hôtes a été démontrée (Schad et al. 2012a). Ainsi, il pourrait être intéressant d'étudier le polymorphisme en fonction du genre (mâle/femelle) et parallèlement la capacité de dispersion virale de ces populations afin de connaître les déterminants de la variabilité de ces gènes.

Pour conclure, le CMH de classe II effectue une reconnaissance croisée des microorganismes ; ainsi le polymorphisme identifié ne peut être attribué à la diversité virale seule (Roche et Furuta 2015). Bien que les outils de caractérisation pour les chauves-souris doivent encore être développés, une étude comparative entre le CMH de classe I, dédié à la présentation des microorganismes intracellulaires, et le CMH de classe II permettrait de mieux comprendre les interactions aboutissant au contrôle ou à l'élimination des microorganismes viraux et de documenter la variation des pressions de sélection provenant des microorganismes en milieu naturel dans des conditions de variabilité environnementale. Une comparaison spatio-temporelle de l'évolution de la diversité des marqueurs immunitaires CMH I et II des individus présentant des séroconversions pour l'infection rabique effectuée en parallèle avec une comparaison entre les effecteurs de l'immunité innée et acquise serait requise afin de pouvoir reconstituer la cascade d'activation en réponse à l'infection, d'identifier les événements de sélection et les variations spécifiques, et dépendantes de l'environnement, entre les effecteurs de ces immunités.

5.

BIBLIOGRAPHIE

- Agnarsson I, Zambrana-Torrel CM, Flores-Saldana NP, May-Collado LJ. A time-calibrated species-level phylogeny of bats (Chiroptera, Mammalia). *PLoS Curr.* 4 févr 2011;3:RRN1212.
- Aguilar-Setien A, Loza-Rubio E, Salas-Rojas M, Brisseau N, Cliquet F, Pastoret P-P, et al. Salivary excretion of rabies virus by healthy vampire bats. *Epidemiol Infect.* juin 2005;133(3):517-22.
- Allen LC, Turmelle AS, Mendonça MT, Navara KJ, Kunz TH, McCracken GF. Roosting ecology and variation in adaptive and innate immune system function in the Brazilian free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis*). *J Comp Physiol B.* avr 2009;179(3):315-23.
- Allocati N, Petrucci AG, Di Giovanni P, Masulli M, Di Ilio C, De Laurenzi V. Bat–man disease transmission: zoonotic pathogens from wildlife reservoirs to human populations. *Cell Death Discov.* 27 juin 2016;2:16048.
- Almeida MF de, Martorelli LFA, Sodr  MM, Kataoka APAG, Rosa AR da, Oliveira ML de, et al. Rabies diagnosis and serology in bats from the State of São Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* avr 2011;44(2):140-5.
- Altizer S, Nunn CL, Thrall PH, Gittleman JL, Antonovics J, Cunningham AA, et al. Social Organization and Parasite Risk in Mammals: Integrating Theory and Empirical Studies. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* 2003;34:517-47.
- Argibay HD, Orozco MM, Cardinal MV, Rinas MA, Arnaiz M, Mena Segura C, et al. First finding of *Trypanosoma cruzi* II in vampire bats from a district free of domestic vector-borne transmission in Northeastern Argentina. *Parasitology.* sept 2016;143(11):1358-68.
- Baker KS, Leggett RM, Bexfield NH, Alston M, Daly G, Todd S, et al. Metagenomic study of the viruses of African straw-coloured fruit bats: Detection of a chiropteran poxvirus and isolation of a novel adenovirus. *Virology.* juill 2013a;441(2):95-106.
- Baker ML, Schountz T, Wang L-F. Antiviral Immune Responses of Bats: A Review: Antiviral Immune Responses of Bats. *Zoonoses Public Health.* f vr 2013b;60(1):104-16.
- Baker ML, Zhou P. Bat immunology. In: *Bats and Viruses: From Pathogen Discovery to Host Genomics.* John Wiley & Sons; 2015.
- Banyard AC, Hayman D, Johnson N, McElhinney L, Fooks AR. Bats and Lyssaviruses. In: *Advances in Virus Research* [Internet]. Elsevier; 2011 [cité 20 mai 2015]. p. 239-89. Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123870407000123>
- van Beneden P-J. *Animal parasites and messmates.* By P. J. van Benden ... With eighty-three illustrations. New York: D. Appleton and Company; 1876. (The international scientific series. [American ed.] vol. xix).
- Bergereau E. Rôle des LT-CD8+ dans l'auto-immunité du SNC : influence des autres effecteurs de l'immunité adaptative [Internet] [Thèse de doctorat]. Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier; 2010 [cité 21 mai 2015]. Disponible sur: <http://thesesups.ups-tlse.fr/1108/>
- Bessa T F, Spichler A, Chapola  GB, Husch AC, Almeida MF de, Sodré MM, et al. The Contribution of Bats to Leptospirosis Transmission in S o Paulo City, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1 févr 2010;82(2):315-7.

- Blehert DS. Fungal disease and the developing story of bat white-nose syndrome. *PLoS Pathog.* 2012;8(7):e1002779.
- Blehert DS, Hicks AC, Behr M, Meteyer CU, Berlowski-Zier BM, Buckles EL, et al. Bat White-Nose Syndrome: An Emerging Fungal Pathogen? *Science.* 9 janv 2009;323(5911):227-227.
- Brook CE, Dobson AP. Bats as 'special' reservoirs for emerging zoonotic pathogens. *Trends Microbiol.* mars 2015;23(3):172-80.
- Brosset A, Charles-Dominique P, Cockle A, Cosson J-F, Masson D. Bat communities and deforestation in French Guiana. *Can J Zool.* 1 nov 1996;74(11):1974-82.
- Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, et al. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature.* 1 juill 1993;364(6432):33-9.
- Buesing N, Filippini M, BÃ¼rgmann H, Gessner MO. Microbial communities in contrasting freshwater marsh microhabitats: Contrasting microbial communities in freshwater. *FEMS Microbiol Ecol.* juill 2009;69(1):84-97.
- Butler J, Wertz N, Baker ML. The immunoglobulin genes of bats. *Comp Immunoglobulin Genet.* 2014;53.
- Butler JE, Wertz N, Zhao Y, Zhang S, Bao Y, Bratsch S, et al. The two suborders of chiropterans have the canonical heavy-chain immunoglobulin (Ig) gene repertoire of eutherian mammals. *Dev Comp Immunol.* mars 2011;35(3):273-84.
- Calisher CH. Viruses in bats: a historic review. In: Wang L-F, Cowled C, éditeurs. *Bats and Viruses: A New Frontier of Emerging Infectious Diseases.* 2015. p. 23.
- Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T. Bats: Important Reservoir Hosts of Emerging Viruses. *Clin Microbiol Rev.* 1 juill 2006;19(3):531-45.
- Calisher CH, Ellison JA. The other rabies viruses: The emergence and importance of lyssaviruses from bats and other vertebrates. *Travel Med Infect Dis.* mars 2012;10(2):69-79.
- Canuti M, Eis-Huebinger AM, Deijs M, de Vries M, Drexler JF, Oppong SK, et al. Two Novel Parvoviruses in Frugivorous New and Old World Bats. *Vartanian J-P, éditeur. PLoS ONE.* 27 déc 2011;6(12):e29140.
- Carini A. Sur une grande epizootie de rage. *Ann Inst Pasteur.* 1911;25:843-6.
- Carrillo-Araujo M, Taş N, Alcántara-Hernández RJ, Gaona O, Schondube JE, Medellín RA, et al. Phyllostomid bat microbiome composition is associated to host phylogeny and feeding strategies. *Evol Genomic Microbiol.* 2015;6:447.
- Castro-Prieto A, Wachter B, Sommer S. Cheetah Paradigm Revisited: MHC Diversity in the World's Largest Free-Ranging Population. *Mol Biol Evol.* 1 avr 2011;28(4):1455-68.
- Catzefflis F. Liste des Mammifères de Guyane française (octobre 2015). 2015 [cité 25 juill 2016]; Disponible sur: http://www.kwata.net/medias/images/upload/MAMM-GUYANE_Catzefflis-oct2015.pdf

- Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* févr 2010;125(2):S3-23.
- Charbonnel N, Bellocq JG de, Morand S. Immunogenetics of micromammal-macroparasite interactions. In: D SMP, D BRKP, D RPP, éditeurs. *Micromammals and Macroparasites* [Internet]. Springer Japan; 2006 [cité 27 sept 2016]. p. 401-42. Disponible sur: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-4-431-36025-4_20
- Chase J, Small MY, Weiss EA, Sharma D, Sharma S. Crepuscular Activity of *Molossus molossus*. *J Mammal.* 1991;72(2):414-8.
- Cloutier D, Thomas DW. *Carollia perspicillata*. *Mamm Species Arch.* 10 déc 1992;417:1-9.
- Combes C. *L'Art d'être parasite : Les Associations du vivant*. Paris: Flammarion; 2003.
- Cosson J-F, Pascal M. Stratégie de reproduction de *Carollia perspicillata* (L., 1758)(Chiroptera, Phyllostomidae) en Guyane Française. 1994 [cité 7 sept 2016]; Disponible sur: <http://documents.irevues.inist.fr/handle/2042/54756>
- da Costa AP, Nunes PH, Leite BHS, Ferreira JIG da S, Tonhosolo R, da Rosa AR, et al. Diversity of bats trypanosomes in hydroelectric area of Belo Monte in Brazilian Amazonia. *Acta Trop.* 12 sept 2016;164:185-93.
- Costa LJC, Andrade FAG, Uieda W, Martorelli LFA, Kataoka APAG, Fernandes MEB. Serological investigation of rabies virus neutralizing antibodies in bats captured in the eastern Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* nov 2013;107(11):684-9.
- Côté IM, Poulin R. Parasitism and group size in social animals: a meta-analysis. *Behav Ecol.* 21 déc 1995;6(2):159-65.
- Cowled C, Baker M, Tachedjian M, Zhou P, Bulach D, Wang L-F. Molecular characterisation of Toll-like receptors in the black flying fox *Pteropus alecto*. *Dev Comp Immunol.* janv 2011;35(1):7-18.
- Cox TE, Smythe LD, Leung LK-P. Flying foxes as carriers of pathogenic leptospira species. *J Wildl Dis.* 1 oct 2005;41(4):753-7.
- Cui J, Han N, Streicker D, Li G, Tang X, Shi Z, et al. Evolutionary Relationships between Bat Coronaviruses and Their Hosts. *Emerg Infect Dis.* oct 2007;13(10):1526-32.
- Dacheux L, Cervantes-Gonzalez M, Guigon G, Thiberge J-M, Vandenbogaert M, Maufrais C, et al. A Preliminary Study of Viral Metagenomics of French Bat Species in Contact with Humans: Identification of New Mammalian Viruses. Tse H, éditeur. *PLoS ONE.* 29 janv 2014;9(1):e87194.
- Dechmann DK, Kranstauber B, Gibbs D, Wikelski M. Group hunting—a reason for sociality in molossid bats? *PLoS ONE.* 2010;5(2):e9012.
- Delaval M. Impacts des perturbations d'origine anthropique sur les peuplements de chauves-souris en Guyane française [Internet]. Paris 6; 2004 [cité 23 mai 2015]. Disponible sur: <http://www.theses.fr/2004PA066386>

- Dengjel J, Schoor O, Fischer R, Reich M, Kraus M, Müller M, et al. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102(22):7922–7927.
- Dietrich M, Mühldorfer K, Tortosa P, Markotter W. *Leptospira* and Bats: Story of an Emerging Friendship. *PLOS Pathog.* 12 nov 2015;11(11):e1005176.
- Donaldson EF, Haskew AN, Gates JE, Huynh J, Moore CJ, Frieman MB. Metagenomic Analysis of the Viromes of Three North American Bat Species: Viral Diversity among Different Bat Species That Share a Common Habitat. *J Virol.* 15 déc 2010;84(24):13004-18.
- Du Pasquier L. Evolution du système immunitaire: acquisition de la diversité des anticorps. 1991 [cité 23 mai 2015]; Disponible sur: <http://www.ipubli.inserm.fr/handle/10608/4432>
- Duboscq J, Heeb P. Pathogènes, parasites et réseaux dans les sociétés animales. In: *Analyse des réseaux sociaux appliquée à l'éthologie et l'écologie* [Internet]. Paris: Éditions Matériologiques; 2015. (Modélisations, simulations, systèmes complexes). Disponible sur: <http://www.materiologiques.com/Analyse-des-reseaux-sociaux>
- Ebert D, Hamilton WD. Sex against virulence: the coevolution of parasitic diseases. *Trends Ecol Evol.* févr 1996;11(2):79-82.
- Eizaguirre C, Lenz TL. Major histocompatibility complex polymorphism: dynamics and consequences of parasite-mediated local adaptation in fishes. *J Fish Biol.* déc 2010;77(9):2023-47.
- Emmons CW. Association of bats with histoplasmosis. *Public Health Rep.* 1958;73(7):590.
- Escobar L E, Peterson AT, Favi M, Yung V, Medina-Vogel G. BAT-BORNE RABIES IN LATIN AMERICA. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* févr 2015;57(1):63-72.
- Fagrouch Z, Sarwari R, Lavergne A, Delaval M, de Thoisy B, Lacoste V, et al. Novel polyomaviruses in South American bats and their relationship to other members of the family Polyomaviridae. *J Gen Virol.* 1 déc 2012;93(Pt_12):2652-7.
- Fenton MB, Simmons NB. *Bats: A World of Science and Mystery* [Internet]. University of Chicago Press; 2015a [cité 20 mai 2015]. Disponible sur: <http://bibliovault.org/BV.landing.ep1?ISBN=9780226065120>
- Fenton MB, Simmons NB. It's a bat! In: *Bats: A World of Science and Mystery* [Internet]. University of Chicago Press; 2015b [cité 20 mai 2015]. Disponible sur: <http://bibliovault.org/BV.landing.ep1?ISBN=9780226065120>
- Fenton MB, Simmons NB. Life histories of bats. In: *Bats: A World of Science and Mystery* [Internet]. University of Chicago Press; 2015c [cité 20 mai 2015]. Disponible sur: <http://bibliovault.org/BV.landing.ep1?ISBN=9780226065120>
- Fernandez AZ, Tablante A, Bartoli F, Beguin S, Hemker HC, Apitz-Castro R. Expression of biological activity of draculin, the anticoagulant factor from vampire bat saliva, is strictly dependent on the appropriate glycosylation of the native molecule. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 23 oct 1998;1425(2):291-9.
- Fleming TH. *The Short-Tailed Fruit Bat: A Study in Plant-Animal Interactions.* University of Chicago Press; 1988.

- Fleming TH, Eby P. Ecology of bat migration. In: Kunz TH, Fenton MB, éditeurs. *Bat Ecology*. University of Chicago Press; 2003.
- Frankham R. Genetics and extinction. *Biol Conserv.* nov 2005;126(2):131-40.
- Frankham R, Briscoe DA, Ballou JD. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press; 2002.
- Froeschke G, Sommer S. Role of selection versus neutral processes determining genetic variation in a small mammal along a climatic gradient in southern Africa. *Evol Ecol.* nov 2014;28(6):1169-90.
- García-García JL, Santos-Moreno A, Kraker-Castañeda C. Ecological traits of phyllostomid bats associated with sensitivity to tropical forest fragmentation in Los Chimalapas, Mexico. *Trop Conserv Sci.* 2014;7(3):457-474.
- Gary S, Thorpe MS. *Ecosystems*. In: *Barron's AP Environmental Science*. Barron's Educational Series; 2009.
- Gay N, Olival KJ, Bumrungsri S, Siriaronrat B, Bourgarel M, Morand S. Parasite and viral species richness of Southeast Asian bats: Fragmentation of area distribution matters. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* août 2014;3(2):161-70.
- Ge X, Li Y, Yang X, Zhang H, Zhou P, Zhang Y, et al. Metagenomic Analysis of Viruses from Bat Fecal Samples Reveals Many Novel Viruses in Insectivorous Bats in China. *J Virol.* 15 avr 2012;86(8):4620-30.
- Genovart M, Negre N, Tavecchia G, Bistuer A, Parpal L, Oro D. The Young, the Weak and the Sick: Evidence of Natural Selection by Predation. *PLoS ONE.* 19 mars 2010;5(3):e9774.
- Gilbert AT, Petersen BW, Recuenco S, Niezgodá M, Gómez J, Laguna-Torres VA, et al. Evidence of Rabies Virus Exposure among Humans in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 1 août 2012;87(2):206-15.
- Godfrey SS. Networks and the ecology of parasite transmission: A framework for wildlife parasitology. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* déc 2013;2:235-45.
- Greenhall AM, Joermann G, Schimdt U, Seidel MR. *Desmodus rotundus*. *Mamm Species.* 8 avr 1983;202:1-6.
- Hairston NG, Ellner SP, Geber MA, Yoshida T, Fox JA. Rapid evolution and the convergence of ecological and evolutionary time. *Ecol Lett.* 1 oct 2005;8(10):1114-27.
- Han BA, Schmidt JP, Bowden SE, Drake JM. Rodent reservoirs of future zoonotic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2 juin 2015a;112(22):7039-44.
- Han H-J, Wen H, Zhou C-M, Chen F-F, Luo L-M, Liu J, et al. Bats as reservoirs of severe emerging infectious diseases. *Virus Res.* 2 juill 2015b;205:1-6.
- Hartl DL, Clark AG. *Principles of Population Genetics*, Fourth Edition. 4th edition. Sunderland, Mass: Sinauer Associates, Inc.; 2007.

- Hayman DTS, Pulliam JRC, Marshall JC, Cryan PM, Webb CT. Environment, host, and fungal traits predict continental-scale white-nose syndrome in bats. *Sci Adv.* 1 janv 2016;2(1):e1500831.
- He B, Li Z, Yang F, Zheng J, Feng Y, Guo H, et al. Virome Profiling of Bats from Myanmar by Metagenomic Analysis of Tissue Samples Reveals More Novel Mammalian Viruses. Tse H, éditeur. *PLoS ONE.* 22 avr 2013;8(4):e61950.
- Hooper DU, Adair EC, Cardinale BJ, Byrnes JEK, Hungate BA, Matulich KL, et al. A global synthesis reveals biodiversity loss as a major driver of ecosystem change. *Nature [Internet].* 2 mai 2012 [cité 20 mai 2015]; Disponible sur: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature11118>
- Hughes AL, Yeager M. Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. *Annu Rev Genet.* 1998;32:415-35.
- Iha K, Omatsu T, Watanabe S, Ueda N, Taniguchi S, Fujii H, et al. Molecular Cloning and Expression Analysis of Bat Toll-Like Receptors 3, 7 and 9. *J Vet Med Sci.* 2010;72(2):217-20.
- Janeway CA, Murphy K, Travers P, Walport M. La présentation des antigènes aux lymphocytes T. In: *Immunobiologie.* De Boeck Supérieur; 2009.
- Jiang L, Joshi H, Patel SN. Predation Alters Relationships between Biodiversity and Temporal Stability. *Am Nat.* 1 mars 2009;173(3):389-99.
- Johnson N, Aréchiga-Ceballos N, Aguilar-Setien A. Vampire Bat Rabies: Ecology, Epidemiology and Control. *Viruses.* 29 avr 2014;6(5):1911-28.
- Jones G, Teeling EC. The evolution of echolocation in bats. *Trends Ecol Evol.* mars 2006;21(3):149-56.
- Jung K, Threlfall CG. Urbanisation and Its Effects on Bats—A Global Meta-Analysis. In: Voigt CC, Kingston T, éditeurs. *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World [Internet].* Cham: Springer International Publishing; 2016 [cité 11 mars 2016]. p. 13-33. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-25220-9_2
- Kaay HJVD. Description of a New Plasmodium, *Plasmodium Voltaicum* Sp.Nov., Found in a Fruit-Bat, *Rousettus Smithi*, in Ghana. *Ann Trop Med Parasitol.* 1 sept 1964;58(3):261-4.
- Kalko EKV, Handley JR. CO, Handley D. CHAPTER 16 - Organization, Diversity, and Long-Term Dynamics of a Neotropical Bat Community. In: *Long-Term Studies of Vertebrate Communities [Internet].* San Diego: Academic Press; 1996 [cité 6 sept 2016]. p. 503-53. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780121780753500179>
- Kaltz O, Shykoff JA. Local adaptation in host–parasite systems. *Heredity.* 1 oct 1998;81(4):361-70.
- Keesing F, Belden LK, Daszak P, Dobson A, Harvell CD, Holt RD, et al. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature.* 2 déc 2010;468(7324):647-52.
- Keogh-Brown MR, Smith RD. The economic impact of SARS: How does the reality match the predictions? *Health Policy.* oct 2008;88(1):110-20.
- King AA, Turner GS. Rabies: A Review. *J Comp Pathol.* janv 1993;108(1):1-39.

- Klein J. Natural History of the Major Histocompatibility Complex. Wiley; 1986a.
- Klein J. Seeds of time: Fifty years ago Peter A. Gorer discovered the H-2 complex. *Immunogenetics*. 1 déc 1986b;24(6):331-8.
- Klein J. Origin of major histocompatibility complex polymorphism: The trans-species hypothesis. *Hum Immunol*. juillet 1987;19(3):155-62.
- Klein J, Sato A. The HLA System. *N Engl J Med*. 7 sept 2000;343(10):702-9.
- Klein J, Sato A, Nikolaidis N. MHC, TSP, and the Origin of Species: From Immunogenetics to Evolutionary Genetics. *Annu Rev Genet*. déc 2007;41(1):281-304.
- Kunz TH. Roosting Ecology of Bats. In: Kunz TH, éditeur. *Ecology of Bats* [Internet]. Springer US; 1982 [cité 21 avr 2016]. p. 1-55. Disponible sur: http://link.springer.com/bu-services.martinique.univ-ag.fr:5000/chapter/10.1007/978-1-4613-3421-7_1
- Kunz TH, Braun de Torrez E, Bauer D, Lobova T, Fleming TH. Ecosystem services provided by bats: Ecosystem services provided by bats. *Ann N Y Acad Sci*. mars 2011;1223(1):1-38.
- Kunz TH, Fenton MB. *Bat Ecology*. University of Chicago Press; 2006.
- Kupfermann H, Satta Y, Takahata N, Tichy H, Klein J. Evolution of Mhc–DRB introns: implications for the origin of primates. *J Mol Evol*. 1999;48(6):663–674.
- Kuzmin IV, Bozick B, Guagliardo SA, Kunkel R, Shak JR, Tong S, et al. Bats, emerging infectious diseases, and the rabies paradigm revisited. *Emerg Health Threats J* [Internet]. 20 juin 2011 [cité 15 juin 2015];4. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3168224/>
- Kuzmin IV, Novella IS, Dietzgen RG, Padhi A, Rupprecht CE. The rhabdoviruses: Biodiversity, phylogenetics, and evolution☆. *Infect Genet Evol*. juill 2009;9(4):541-53.
- Kuzmin IV, Rupprecht CE. Bat Lyssaviruses. In: Wang L-F, Cowled C, éditeurs. *Bats and Viruses: A New Frontier of Emerging Infectious Diseases*. 2015. p. 47–97.
- Lavergne A, Darcissac E, Bourhy H, Tirera S, Thoisy B de, Lacoste V. Complete Genome Sequence of a Vampire Bat Rabies Virus from French Guiana. *Genome Announc*. 28 avr 2016;4(2):e00188-16.
- Lenz TL, Eizaguirre C, Rotter B, Kalbe M, Milinski M. Exploring local immunological adaptation of two stickleback ecotypes by experimental infection and transcriptome-wide digital gene expression analysis. *Mol Ecol*. févr 2013;22(3):774-86.
- Li L, Victoria JG, Wang C, Jones M, Fellers GM, Kunz TH, et al. Bat Guano Virome: Predominance of Dietary Viruses from Insects and Plants plus Novel Mammalian Viruses. *J Virol*. 15 juill 2010;84(14):6955-65.
- Lima FE de S, Cibulski SP, Witt AA, Franco AC, Roehle PM. Genomic characterization of two novel polyomaviruses in Brazilian insectivorous bats. *Arch Virol*. 12 mai 2015;160(7):1831-6.
- Luck GW, Smallbone L, Threlfall C, Law B. Patterns in bat functional guilds across multiple urban centres in south-eastern Australia. *Landsc Ecol*. 3 janv 2013;28(3):455-69.

- Luis AD, Hayman DTS, O'Shea TJ, Cryan PM, Gilbert AT, Pulliam JRC, et al. A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? *Proc R Soc B Biol Sci.* 1 févr 2013;280(1756):20122753-20122753.
- Maganga GD. Identification et caractérisation des virus à ARN potentiellement pathogènes pour l'homme chez les populations de chauves-souris d'Afrique Centrale [Internet] [Thèse de doctorat]. Université de Montpellier 2; 2012 [cité 5 juin 2015]. Disponible sur: <http://www.theses.fr/2012MON20072>
- Male D. Immunologie: Aide-mémoire illustré. De Boeck Supérieur; 2005.
- Male DK, Brostoff J. Immunologie. Elsevier Masson; 2007.
- Mayer F, Brunner A. Non-neutral evolution of the major histocompatibility complex class II gene DRB1 in the sac-winged bat *Saccopteryx bilineata*. *Heredity.* 2007;99(3):257–264.
- McConville A, Law B, Penman T, Mahony M. Contrasting habitat use of morphologically similar bat species with differing conservation status in south-eastern Australia. *Austral Ecol.* 1 févr 2014;39(1):83-94.
- McCracken GF, Lumsden LF, Kunz TH. Roosting Ecology and Population Biology. In: Zubaid A, McCracken GF, Kunz TH, éditeurs. *Functional and evolutionary ecology of bats.* Oxford; New York: Oxford University Press; 2006.
- Meynard J-B, Flamand C, Dupuy C, Mahamat A, Eltges F, Queuche F, et al. First Human Rabies Case in French Guiana, 2008: Epidemiological Investigation and Control. Childs JE, éditeur. *PLoS Negl Trop Dis.* 21 févr 2012;6(2):e1537.
- Milinski M. The Major Histocompatibility Complex, Sexual Selection, and Mate Choice. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* 2006;37(1):159-86.
- Miller GT, Spoolman S. Biodiversity and Evolution. In: *Essentials of ecology.* 5th ed. Australia: United States : Brooks/Cole Cengage Learning; 2009.
- Moratelli R, Calisher CH. Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* févr 2015;110(1):1-22.
- Mühldorfer K. Bats and Bacterial Pathogens: A Review: Bats and Bacterial Pathogens. *Zoonoses Public Health.* févr 2013;60(1):93-103.
- Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C. Antigen Presentation to T Lymphocytes. In: *Janeway's immunobiology.* 8th ed. New York: Garland Science; 2012a.
- Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C. *Janeway's immunobiology.* 8th ed. New York: Garland Science; 2012b.
- Ng JHJ, Tachedjian M, Deakin J, Wynne JW, Cui J, Haring V, et al. Evolution and comparative analysis of the bat MHC-I region. *Sci Rep.* 15 févr 2016;6:21256.
- Nuchtern JG, Biddison WE, Klausner RD. Class II MHC molecules can use the endogenous pathway of antigen presentation. *Nature.* 4 janv 1990;343(6253):74-6.

- Office National des Forêts, Groupe Chiroptères de Guyane. Les Chauves-souris de Guyane et d'Amapá.pdf [Internet]. Parc Naturel Régional de Guyane; 2013. Disponible sur: <http://www.guyane.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/LivretChiroptere.pdf>
- O'Leary MA, Bloch JI, Flynn JJ, Gaudin TJ, Giallombardo A, Giannini NP, et al. The placental mammal ancestor and the post-K-Pg radiation of placentals. *Science*. 2013;339(6120):662–667.
- Olival KJ, Epstein JH, Wang L-F, Field HE, Daszak P. Are bats exceptional viral reservoirs? In: *New Directions in Conservation Medicine: Applied Cases of Ecological Health*. Oxford University Press, USA; 2012.
- Olival KJ, Weekley CC, Daszak P. Are bats really « special » as viral reservoirs? What we know and need to know. In: Wang L-F, Cowled C, éditeurs. *Bats and Viruses: A New Frontier of Emerging Infectious Diseases*. New Jersey: Wiley; 2015.
- Omatsu T, Watanabe S, Akashi H, Yoshikawa Y. Biological characters of bats in relation to natural reservoir of emerging viruses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. sept 2007;30(5-6):357-74.
- Oosterhout C, Joyce DA, Cummings SM, Blais J, Barson NJ, Ramnarine IW, et al. Balancing selection, random genetic drift, and genetic variation at the major histocompatibility complex in two wild populations of guppies (*Poecilia reticulata*). *Evolution*. 2006;60(12):2562–2574.
- O'Shea TJ, Cryan PM, Cunningham AA, Fooks AR, Hayman DTS, Luis AD, et al. Bat Flight and Zoonotic Viruses. *Emerg Infect Dis*. mai 2014;20(5):741-5.
- Ostfeld RS. Biodiversity loss and the rise of zoonotic pathogens. *Clin Microbiol Infect*. janv 2009;15:40-3.
- Owen J, Punt J, Stranford S. *Immunologie - 7e édition: Le cours de Janis Kuby avec questions de révision*. Dunod; 2014.
- Palmer JM, Berkman LK, Marquardt PE, Donner DM, Jusino MA, Lindner DL. Preliminary characterization of little brown bats (*Myotis lucifugus*) immune MHC II DRB alleles using next-generation sequencing. *PeerJ Prepr*. 2016;4:e1662v1.
- Paludan C. Endogenous MHC Class II Processing of a Viral Nuclear Antigen After Autophagy. *Science*. 28 janv 2005;307(5709):593-6.
- Papenfuss AT, Baker ML, Feng Z-P, Tachedjian M, Crameri G, Cowled C, et al. The immune gene repertoire of an important viral reservoir, the Australian black flying fox. *BMC Genomics*. 2012;13(1):261.
- Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *The Lancet*. juin 2001;357(9270):1777-89.
- Patterson JEH, Ruckstuhl KE. Parasite infection and host group size: a meta-analytical review. *Parasitology*. juin 2013;140(7):803-13.
- Pavan AC, Martins F, Santos FR, Ditchfield A, Redondo RA. Patterns of diversification in two species of short-tailed bats (*Carollia* Gray, 1838): the effects of historical fragmentation of Brazilian rainforests. *Biol J Linn Soc*. 2011;102(3):527–539.

- Pedersen AB, Davies TJ. Cross-Species Pathogen Transmission and Disease Emergence in Primates. *EcoHealth*. 16 mars 2010;6(4):496-508.
- Peel AJ, Sargan DR, Baker KS, Hayman DTS, Barr JA, Crameri G, et al. Continent-wide panmixia of an African fruit bat facilitates transmission of potentially zoonotic viruses. *Nat Commun* [Internet]. 19 nov 2013 [cité 20 mai 2015];4. Disponible sur: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms3770>
- Penn DJ, Ilmonen P. Major Histocompatibility Complex (MHC). In: John Wiley & Sons, Ltd, éditeur. *Encyclopedia of Life Sciences* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2005 [cité 20 mai 2015]. Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1038/npg.els.0003986>
- Perony N, Sueur C, Kerth G. La socialité complexe des chauves-souris. In: *Analyse des réseaux sociaux appliquée à l'éthologie et l'écologie* [Internet]. Paris: Éditions Matériologiques; 2015. (Modélisations, simulations, systèmes complexes). Disponible sur: <http://www.materiologiques.com/Analyse-des-reseaux-sociaux>
- Phillips CD, Phelan G, Dowd SE, McDONOUGH MM, Ferguson AW, Delton Hanson J, et al. Microbiome analysis among bats describes influences of host phylogeny, life history, physiology and geography. *Mol Ecol*. 1 juin 2012;21(11):2617-27.
- Plowright RK, Eby P, Hudson PJ, Smith IL, Westcott D, Bryden WL, et al. Ecological dynamics of emerging bat virus spillover. *Proc R Soc B Biol Sci*. 12 nov 2014;282(1798):20142124-20142124.
- Poreau B. *Biologie et complexité: histoire et modèles du commensalisme* [Internet] [Thèse de doctorat]. Université Claude Bernard-Lyon I; 2014 [cité 5 juin 2015]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01063917/>
- Potts WK, Wakeland EK. Evolution of diversity at the major histocompatibility complex. *Trends Ecol Evol*. juin 1990;5(6):181-7.
- Razafindratsimandresy R, Jeanmaire EM, Counor D, Vasconcelos PF, Sall AA, Reynes J-M. Partial molecular characterization of alphaherpesviruses isolated from tropical bats. *J Gen Virol*. 1 janv 2009;90(1):44-7.
- Real-Monroy MD, Martínez-Méndez N, Ortega J. MHC-DRB Exon 2 Diversity of the Jamaican Fruit-Eating Bat (*Artibeus jamaicensis*) from Mexico. *Acta Chiropterologica*. 1 déc 2014;16(2):301-14.
- dos Reis M, Donoghue PC, Yang Z. Neither phylogenomic nor palaeontological data support a Palaeogene origin of placental mammals. *Biol Lett*. 2014;10(1):20131003.
- Revillard J-P. *Immunologie*. 4ème édition. De Boeck Supérieur; 2001.
- Richman AD, Herrera M. LG, Ortega-García S, Flores-Martínez JJ, Arroyo-Cabrales J, Morales-Malacara JB. Class II DRB polymorphism and sequence diversity in two vesper bats in the genus *Myotis*: DRB polymorphism in *Myotis*. *Int J Immunogenet*. oct 2010;37(5):401-5.
- Riel JV, D, Hiernaux-L' J, Hoëst. Description of a plasmodium found in a bat, *Roussettus leachi*. *Parasitology*. déc 1951;41(3-4):270-3.

- Rifkin JL, Nunn CL, Garamszegi LZ. Do animals living in larger groups experience greater parasitism? A meta-analysis. *Am Nat.* juill 2012;180(1):70-82.
- Riley E, Olerup O. HLA polymorphisms and evolution. *Immunol Today.* sept 1992;13(9):333-5.
- Robinson J, Malik A, Parham P, Bodmer JG, Marsh SGE. IMGT/HLA database—a sequence database for the human major histocompatibility complex. *Tissue Antigens.* 2000;55(3):280–287.
- Roche PA, Furuta K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol.* avr 2015;15(4):203-16.
- Rodhain F. Chauves-souris et virus : des relations complexes. *Bull Société Pathol Exot.* 10 oct 2015;108(4):272-89.
- Ronfort J, Jenczewski E, Muller M. Les flux de gènes et leur impact sur la structure de la diversité génétique. Le cas des prairies. *Fourrages.* 2005;182:275-86.
- Rosa AR da, Kataoka AP de AG, Favoretto SR, Sodré MM, Trezza Netto J, Campos AC de A, et al. First report of rabies infection in bats, *Molossus molossus*, *Molossops neglectus* and *Myotis riparius* in the city of S o Paulo, State of S o Paulo, southeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* avr 2011;44(2):146-9.
- Ruwende C, Khoo SC, Snow RW, Yates SN, Kwiatkowski D, Gupta S, et al. Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature.* 20 juill 1995;376(6537):246-9.
- Sant AJ. Endogenous antigen presentation by MHC class II molecules. *Immunol Res.* 1994;13(4):253-67.
- Schad J, Dechmann DK, Voigt CC, Sommer S. MHC class II DRB diversity, selection pattern and population structure in a neotropical bat species, *Noctilio albiventris*. *Heredity.* 2011;107(2):115–126.
- Schad J, Dechmann DKN, Voigt CC, Sommer S. Evidence for the ‘Good Genes’ Model: Association of MHC Class II DRB Alleles with Ectoparasitism and Reproductive State in the Neotropical Lesser Bulldog Bat, *Noctilio albiventris*. Vijaykrishna D,  diteur. *PLoS ONE.* 16 mai 2012a;7(5):e37101.
- Schad J, Voigt CC, Greiner S, Dechmann DKN, Sommer S. Independent evolution of functional MHC class II DRB genes in New World bat species. *Immunogenetics.* juill 2012b;64(7):535-47.
- Schaer J, Perkins SL, Decher J, Leendertz FH, Fahr J, Weber N, et al. High diversity of West African bat malaria parasites and a tight link with rodent *Plasmodium* taxa. *Proc Natl Acad Sci.* 22 oct 2013;110(43):17415-9.
- Schatz DG. V(D)J recombination. *Immunol Rev.* 1 ao t 2004;200(1):5-11.
- Scheffer KC, Carrieri ML, Albas A, Santos HCP dos, Kotait I, Ito FH. Rabies virus in naturally infected bats in the State of São Paulo, Southeastern Brazil. *Rev Saude Pública.* 2007;41(3):389–395.
- Schneeberger K, Voigt CC. Zoonotic Viruses and Conservation of Bats. In: Voigt CC, Kingston T,  diteurs. *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World* [Internet].

- Cham: Springer International Publishing; 2016 [cité 11 mars 2016]. p. 263-92. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-25220-9_10
- Silva LAM da, Machado JLM, Melo M de L, Alencar VI de B, Melo RS de, Andrade LP de, et al. Rabies virus in *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae) in the State of Pernambuco, Northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. août 2011;44(4):526-7.
- Smythe LD, Field HE, Barnett LJ, Smith CS, Dohnt MF, Symonds ML, et al. Leptospiral Antibodies in Flying Foxes in Australia. *J Wildl Dis*. 1 janv 2002;38(1):182-6.
- Sommer S. The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Front Zool*. 20 oct 2005;2(1):16.
- Stoner-Duncan B, Streicker DG, Tedeschi CM. Vampire Bats and Rabies: Toward an Ecological Solution to a Public Health Problem. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 19 juin 2014 [cité 4 août 2015];8(6). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4063729/>
- Streicker DG, Turmelle AS, Vonhof MJ, Kuzmin IV, McCracken GF, Rupprecht CE. Host Phylogeny Constrains Cross-Species Emergence and Establishment of Rabies Virus in Bats. *Science*. 6 août 2010;329(5992):676-9.
- Strong JE, Wong G, Jones SE, Grolla A, Theriault S, Kobinger GP, et al. Stimulation of Ebola virus production from persistent infection through activation of the Ras/MAPK pathway. *Proc Natl Acad Sci*. 18 nov 2008;105(46):17982-7.
- Stuart YE, Campbell TS, Hohenlohe PA, Reynolds RG, Revell LJ, Losos JB. Rapid evolution of a native species following invasion by a congener. *Science*. 24 oct 2014;346(6208):463-6.
- Tao Y, Shi M, Conrardy C, Kuzmin IV, Recuenco S, Agwanda B, et al. Discovery of diverse polyomaviruses in bats and the evolutionary history of the Polyomaviridae. *J Gen Virol*. 1 avr 2013;94(Pt_4):738-48.
- Teeling EC. A Molecular Phylogeny for Bats Illuminates Biogeography and the Fossil Record. *Science*. 28 janv 2005;307(5709):580-4.
- Těšický M, Vinkler M. Trans-Species Polymorphism in Immune Genes: General Pattern or MHC-Restricted Phenomenon? *J Immunol Res*. 2015;2015:1-10.
- de Thoisy B, Bourhy H, Delaval M, Pontier D, Dacheux L, Darcissac E, et al. Bioecological Drivers of Rabies Virus Circulation in a Neotropical Bat Community. *Kasper M, éditeur. PLoS Negl Trop Dis*. 25 janv 2016;10(1):e0004378.
- Thompson AE. The immune system. *JAMA*. 28 avr 2015;313(16):1686-1686.
- Thompson JN. Rapid evolution as an ecological process. *Trends Ecol Evol*. 1998;13(8):329-332.
- Toussaint J-F, Swynghedauw B, Boeuf G, Collectif, Barbault R. Figures et schémas complémentaires. In: *L'homme peut-il s'adapter à lui-même ? : Marges d'adaptation de l'espèce humaine face aux changements environnementaux*. Versailles: Quae éditions; 2012.
- Turmelle AS, Olival KJ. Correlates of Viral Richness in Bats (Order Chiroptera). *EcoHealth*. déc 2009;6(4):522-39.

- Vashi NA, Reddy P, Wayne DB, Sabin B. Bat-Associated Leptospirosis. *J Gen Intern Med.* 9 déc 2009;25(2):162-4.
- Vasseur E. Contraintes sélectives et adaptation chez l'homme : histoire évolutive des senseurs microbiens [Internet] [phd]. Université Toulouse III - Paul Sabatier; 2011 [cité 20 mai 2015]. Disponible sur: <http://thesesups.ups-tlse.fr/1522/>
- Veikkolainen V, Vesterinen EJ, Lilley TM, Pulliainen AT. Bats as Reservoir Hosts of Human Bacterial Pathogen, *Bartonella mayotimonensis*. *Emerg Infect Dis.* juin 2014;20(6):960-7.
- Wang L-F, Shi Z, Zhang S, Field H, Daszak P, Eaton BT. Review of Bats and SARS. *Emerg Infect Dis.* déc 2006;12(12):1834-40.
- Wang L-F, Walker PJ, Poon LLM. Mass extinctions, biodiversity and mitochondrial function: are bats 'special' as reservoirs for emerging viruses? *Curr Opin Virol.* déc 2011;1(6):649-57.
- Wibbelt G, Kurth A, Hellmann D, Weishaar M, Barlow A, Veith M, et al. White-Nose Syndrome Fungus (*Geomyces destructans*) in Bats, Europe. *Emerg Infect Dis.* août 2010;16(8):1237-43.
- Wickramasinghe LP, Harris S, Jones G, Vaughan N. Bat activity and species richness on organic and conventional farms: impact of agricultural intensification. *J Appl Ecol.* 2003;40(6):984–993.
- Wilkinson GS. Reciprocal food sharing in the vampire bat. *Nature.* 8 mars 1984;308(5955):181-4.
- Wilkinson GS. The social organization of the common vampire bat. *Behav Ecol Sociobiol.* 1 juill 1985;17(2):123-34.
- Wilkinson GS, South JM. Life history, ecology and longevity in bats. *Aging Cell.* déc 2002;1(2):124-31.
- Wilson EO, Sciences C on L, Studies D on E and L, Institution NA of S. Biodiversity. National Academies Press; 1988.
- Wroblewski EE, Norman PJ, Guethlein LA, Rudicell RS, Ramirez MA, Li Y, et al. Signature Patterns of MHC Diversity in Three Gombe Communities of Wild Chimpanzees Reflect Fitness in Reproduction and Immune Defense against SIVcpz. *PLoS Biol.* 28 mai 2015;13(5):e1002144.
- Wu Z, Yang L, Ren X, He G, Zhang J, Yang J, et al. Deciphering the bat virome catalog to better understand the ecological diversity of bat viruses and the bat origin of emerging infectious diseases. *ISME J* [Internet]. 2015 [cité 22 avr 2016]; Disponible sur: <http://www.nature.com/ismej/journal/vaop/ncurrent/full/ismej2015138a.html>
- Yob JM, Field H, Rashdi AM, Morrissy C, van der Heide B, Rota P, et al. Nipah virus infection in bats (order Chiroptera) in peninsular Malaysia. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(3):439.
- Yuhki N, O'Brien SJ. Nature and origin of polymorphism in feline MHC class II DRA and DRB genes. *J Immunol.* 15 mars 1997;158(6):2822-33.
- Zeisset I, Beebee TJC. Drift Rather than Selection Dominates MHC Class II Allelic Diversity Patterns at the Biogeographical Range Scale in Natterjack Toads *Bufo calamita*. *Consuegra S, éditeur. PLoS ONE.* 17 juin 2014;9(6):e100176.

- Zellweger F, Baltensweiler A, Ginzler C, Roth T, Braunisch V, Bugmann H, et al. Environmental predictors of species richness in forest landscapes: abiotic factors versus vegetation structure. *J Biogeogr.* 1 févr 2016;n/a-n/a.
- Zhang G, Cowled C, Shi Z, Huang Z, Bishop-Lilly KA, Fang X, et al. Comparative Analysis of Bat Genomes Provides Insight into the Evolution of Flight and Immunity. *Science.* 25 janv 2013;339(6118):456-60.
- Zukal J, Bandouchova H, Brichta J, Cmokova A, Jaron KS, Kolarik M, et al. White-nose syndrome without borders: *Pseudogymnoascus destructans* infection tolerated in Europe and Palearctic Asia but not in North America. *Sci Rep.* 29 janv 2016;6:19829.

6.
ANNEXES

Annexe 1 : Identification des sites sélectionnés négativement (NSS) par des analyses de maximum de vraisemblance.

Espèces	Sites	<i>n</i>	SLAC	FEL	IFEL	REL	Total
<i>C. perspicillata</i>	All	19	<u>11</u>	<u>11</u> , <u>14</u> , 40, 46	7, <u>14</u> , 73	<u>14</u> , 40	2
	EH	11	<u>14</u>	<u>14</u> , <u>25</u> , 40	<u>14</u> , <u>25</u> , 46	<u>14</u> , <u>25</u> , 40, 45, 46	2
	PF	3	<u>11</u>	<u>11</u> , <u>46</u>	<u>11</u>	<u>11</u> , 29, <u>46</u> , 68	2
	UR	5	none	<u>7</u>	<u>7</u> , <u>81</u>	<u>81</u>	2
<i>D. rotundus</i>	All	35	<u>26</u> , <u>27</u> , <u>70</u>	<u>2</u> , 4, <u>27</u> , 53, <u>70</u> , <u>75</u>	<u>2</u> , 4, <u>27</u> , <u>70</u> , <u>75</u>	4, <u>26</u> , <u>27</u> , <u>70</u> , <u>75</u> , 83	6
	CF	4	<u>2</u> , <u>26</u> , <u>68</u>	<u>2</u> , <u>26</u> , <u>27</u> , <u>68</u> , <u>73</u>	<u>2</u> , <u>27</u> , <u>68</u> , <u>73</u>	<u>68</u>	5
	CM	8	<u>27</u> , <u>68</u>	4, <u>27</u> , 51, <u>68</u> , <u>73</u>	4, <u>27</u> , <u>68</u> , <u>73</u>	2, 4, 10, 11, 12, 13, 14, 16, <u>27</u> , 28, 35, 36, 37, 38, 46, 57, 61, <u>68</u> , 71, 74, 76, 77, 81, 84, 87	4
	SA	23	<u>26</u> , <u>68</u>	<u>2</u> , 4, <u>27</u> , <u>68</u> , <u>73</u>	<u>2</u> , 4, <u>68</u> , <u>73</u>	<u>2</u> , 4, <u>26</u> , <u>27</u> , <u>68</u> , 81	6
<i>M. molossus</i>	All	28	20	<u>20</u> , <u>36</u> , <u>43</u> , <u>68</u> , <u>73</u>	<u>20</u> , <u>36</u> , <u>43</u> , <u>61</u> , <u>73</u>	<u>20</u> , <u>36</u> , <u>43</u>	4
	CC	5	none	<u>43</u> , 61, <u>68</u>	<u>43</u>	20, <u>68</u>	2
	PA	8	28, 53	<u>20</u> , 26, <u>36</u> , 43, 58, <u>61</u> , <u>73</u>	<u>36</u> , <u>61</u> , <u>73</u>	<u>20</u>	4
	SA	15	none	26, <u>43</u>	<u>43</u>	12, 84	1

Le nombre d'allèles (*n*) est indiqué à l'échelle de l'espèce et de l'environnement. Seuls les codons identifiés par au moins deux analyses de maximum de vraisemblance différentes ont été considérés comme valides (soulignés dans la table). Le nombre de total de codons validés est indiqué pour chaque espèce et chaque environnement. Les seuils de significativité pour l'identification des codons sélectionnés sont les suivants : *p*-values < 0.1 pour SLAC, FEL, IFEL ; Bayes Factor > 50 pour REL.

Annexe 2 : Identification des sites sélectionnés négativement (NSS) par des analyses de maximum de vraisemblance.

Carollia perspicillata

<i>β1-domain position</i>	9	11	14	26	28	30	37	-	-	47	57	55	58	60	70	74	78	85	90	
Alignment Position	1		10	20		30	37	-	-	40	50	55	58	60	70	74	78	80		
<i>NSS C. perspicillata</i>			*			*											*			
EH						*														
PF			*								*									
UR		*																		
Cape-DRB*05	S	F	V	L	Q	S	K	A	E	C	Q	F	S	N	R	T	Q	R	V	R
Cape-DRB*16	F	V	M	G		H		G	E	L	A	Y								
Cape-DRB*17	F	V	L	H		H		G		Q	L	D	Y	L						
Cape-DRB*18	F	M		T	S	H		G		Y	D	Y								
Cape-DRB*19	F	V	A	S		H	F	G		L	Q	Y								
Cape-DRB*20	L	V	H	H		H		G		L	D	Y	I	N						
Cape-DRB*21	L	V	H	H		H		G		L	D	Y	I	N						
Cape-DRB*22	F	M		T	S	H		G		D	Y	L								
Cape-DRB*23	P	L	V	H	P	H		G		Y	D	Y								
Cape-DRB*24	L	M	A	S		H	F	G		N										
Cape-DRB*25		M	T	T	S	H	F	G			Y	L								
Cape-DRB*26	P	L	E	H	N	H	T	G		L	D	Y	N							
Cape-DRB*27	L	V	H	H		H		G		L	D	F	I	N						
Cape-DRB*28	F	V		T	S	H		G		L	Y	Q	Y							
Cape-DRB*29	P	L	A	H	T	H	H	G		L	Q	Y								
Cape-DRB*30	F			F		H		G			K	W		Q						
Cape-DRB*31	P	L	V	H	P	H		G		Y	D	Y	L							
Cape-DRB*32	F			H		H		G		Y	N	G	Y	I						
Cape-DRB*33	P	I	L		F	H	Y	G		Y	H	Y	L	N						
Cape-DRB*34	F			H	G	H		G		Y	N	G	Y	I						
Cape-DRB*35	L	V	H	H	G	H		G		L	D	Y	I	N						
Cape-DRB*36	F	V	L	H		H		G		Q	L	D	Y	L						
Cape-DRB*37				I						Y				Q						
HLA-DRB1	R	F	L	E	Y	S	T	S	E	C	H	F	F	N	G	T	E	R	V	R
Arja-DRB*01										Q		L	H	D	I	C	G	I	L	
Cape-DRB*01	L		Q	F	K			S		L	W		Q							
Noal-DRB*01	H	Y	Q	T		Y	S			F			Y	R						

Les séquences *DRB* pour *Homo sapiens* (accession number: NG_29921), *C. perspicillata* (Cape-DRB*01, accession number: JQ388830), *N. albiventris* (Noal-DRB*01, accession number: HM347941) and *A. jamaicensis* (Arja-DRB*01, accession number: KJ010995) sont données en fin d'alignement pour comparaison. Les sites de liaison à l'antigène identifiés chez l'homme pour la molécule *HLA-DRB1* [65] sont grisés. Les points indiquent la présence de sites identiques à la première séquence (Cape-DRB*05). Les nombres en italique indiquent les positions des acides aminés dans la chaîne *beta* 1 de la molécule *HLA-DRB1*. Les astérisques indiquent la présence de sites sélectionnés négativement (NSS), selon les critères décrits dans la section *Methods* de l'étude CMH [68]. EH, Zone de lisière ; PF, Forêts primaires ; UR, Zones (péri)urbaines.

