



HAL
open science

Écologie et évolution de coronavirus dans des populations de chauves-souris des îles de l'ouest de l'océan indien

Léa Joffrin

► **To cite this version:**

Léa Joffrin. Écologie et évolution de coronavirus dans des populations de chauves-souris des îles de l'ouest de l'océan indien. *Ecologie, Environnement*. Université de la Réunion, 2019. Français. NNT : 2019LARE0039 . tel-02951814

HAL Id: tel-02951814

<https://theses.hal.science/tel-02951814v1>

Submitted on 29 Sep 2020

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.

Université de La Réunion

THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Doctorat Sciences du vivant
Spécialité : Écologie, santé, environnement

École doctorale (542) : Sciences Technologiques Santé

Écologie et évolution de coronavirus dans des populations de chauves-souris des îles de l'ouest de l'Océan Indien

Présentée et soutenue publiquement par

Léa Joffrin

Le 28 novembre 2019, devant le jury composé de :

Dr. Alexandre CARON	Chercheur, CIRAD, Montpellier	Rapporteur
Dr. Nathalie CHARBONNEL	Directrice de recherche, INRA, Montpellier	Rapporteur
Dr. Pascale BESSE	Professeur, Université de La Réunion	Examineur
Dr. Catherine CETRE-SOSSAH	Chercheuse, CIRAD, La Réunion	Examineur
Dr. Vikash TATAYAH	Directeur de la conservation, Mauritian Wildlife Foundation, Ile Maurice	Examineur
Dr. Patrick MAVINGUI	Directeur de recherche, CNRS, La Réunion	Directeur de thèse
Dr. Camille LEBARBENCHON	Maitre de conférences, Université de La Réunion	Co-directeur de thèse

Laboratoire de recherche :

UMR PIMIT Unité Mixte de Recherche, Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical
INSERM U1187, CNRS 9192, IRD 249, Université de La Réunion

Cette thèse a reçu le soutien financier de la Région Réunion et de l'Union Européenne -Fonds Européen de Développement Régional (FEDER) dans le cadre du Programme Opérationnel de Coopération Territoriale 2014-2020.

Remerciements

Je souhaite remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci au Dr. Nathalie Charbonnel et au Dr. Alexandre Caron d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse malgré leurs emplois du temps chargés. Merci au Dr. Pascale Besse d'avoir accepté d'être examinatrice et présidente de ce jury. Je remercie également le Dr. Catherine Cetre-Sossah et le Dr. Vikash Tatayah pour avoir accepté de faire partie du jury en temps qu'examineurs.

Je souhaite vivement remercier Patrick Mavingui pour avoir accepté de diriger ma thèse pendant ces 3 ans et de m'avoir chaleureusement accueilli au sein du laboratoire PIMIT pour ses années riches en émotions. Merci pour sa disponibilité, ses conseils et sa confiance.

Mes remerciements vont évidemment à Camille. Merci de m'avoir donné ma chance en Master 1, et d'avoir cru en moi lors du montage du projet de cette thèse. Je te dois ma passion des chauves-souris et l'intérêt pour les zoonoses qui je l'espère continueront encore de nombreuses années. Merci pour ta disponibilité, ta passion, ta curiosité scientifique, ta pédagogie, ton envie de transmettre et de former, ton éthique et ta rigueur, qui font de toi le chercheur que je respecte. Merci également pour ton empathie, ton humour, ta confiance, ton honnêteté et ton écoute qui sont pour moi les qualités humaines qui te caractérisent le plus et qui représentent la personne avec qui j'ai adoré travailler ces dernières années.

Merci au Dr. Nathalie Becker, au Dr. Benjamin Roche et au Dr. Steve Goodman qui ont accepté de constituer mon comité de suivi de thèse et qui ont su m'aiguiller avec sagesse au cours de ces 3 ans.

Merci à Steve Goodman pour tous les échanges que nous avons pu avoir au cours de ma thèse. Merci de m'avoir initiée aux missions de captures de chauves-souris et de nous avoir fait découvrir Madagascar. Les images resteront longtemps dans ma tête, et Ankarana aura une place particulière dans mon cœur, entre chauves-souris, lémuriers, tsingy et scorpions.

David, je te remercie pour ton aide depuis le Master 1. Ton retour pendant ma troisième année de thèse a été une chance pour moi, et sans toi mon codage sous R aurait été beaucoup, beaucoup, beaucoup plus long. Merci pour nos échanges et pour les idées qui ont émanées de ces conversations et qui m'ont permis d'y voir un peu plus clair à des moments de doutes.

Un grand merci à Erwan et Gildas, pour tous ces moments passés ensemble sur le terrain à La Réunion. Et pour toutes les missions que vous avez réalisées avant mon arrivée et grâce auxquelles j'ai pu réaliser une grande partie de ma thèse.

Muriel, je te remercie de l'opportunité que tu m'as donnée de pouvoir participer aux captures de ton projet de recherche, et de m'avoir formée à la capture et à la manipulation des Mormo. Je n'aurai jamais imaginé pouvoir dire un jour avoir tatoué des chauves-souris. Merci pour ta disponibilité et tes conseils. J'ai adoré pouvoir interagir avec toi sur le plan scientifique et sur le plan personnel. Les échanges que nous avons eus ont toujours été très enrichissants pour moi et j'espère un jour avoir la capacité de raisonner et d'accumuler les connaissances comme tu le fais. Je suis impressionnée par ce que tu fais et par la personne incroyable que tu es. Surtout ne changes rien.

Merci à tous les membres de PIMIT, et particulièrement à l'équipe DYSIIS.

Merci à La Région Réunion pour l'attribution de mon Allocation Régionale de Recherche qui m'a permis de subsister pendant ces 3 ans.

Maintenant que les remerciements solennels et professionnels ont été fait, passons aux remerciements plus personnels.

La thèse, c'est avant tout le soutien de ses compatriotes de bureau. Alors je souhaite remercier vivement et chaleureusement les sardines, ancienne édition et nouvelle édition ;). J'ai évidemment une pensée pour mes camarades qui ont terminé avant moi, nos chemins se sont croisés, ainsi que nos rires, nos petits mots laissés sur les claviers, nos moments de malices ; je pense ainsi à Miora, Elodie et Coco. Merci également aux nouvelles sardines, fraîchement débarquées dans l'aventure de la thèse et avec qui la tradition de la bonne ambiance du bureau perdure : à Axel, Sarah, Eva, Jonathan. J'espère que vous continuerez à vous soutenir, par les rires, la thérapie de comptoir ou par la nourriture.

Je tiens particulièrement à remercier Axel, mon voisin de bureau mais surtout mon ami, qui m'a supporté, moi, mes doutes, mes plaintes et mes petits moments de folie aussi parfois. Tu as toujours été là pour moi et pour me soutenir. Un soutien sans faille. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi. Merci.

Un grand merci à tous les membres de la Majda Dream Team du CYROI, avec qui les repas du midi et les pauses café ont souvent été inoubliables. À Florian pour les références Disney et les blind test, à Manon pour son sourire et sa bonne humeur, à Kevin pour sa joie de vivre, à Majda pour sa folie, à Johan pour sa gentillesse, à Fanny pour sa sagesse, à Mattéo pour son humour, à Seb pour son écoute.

FLS, mon cœur. Merci pour ton soutien et ton dévouement sans faille. Tu es un modèle d'honnêteté et de loyauté pour moi et je suis impressionnée par la personne que tu es. Surtout ne change pas et poursuis ton bonheur.

À toi Imade, toi qui m'as soutenue depuis le début. Toi qui a cru en moi et qui m'a permis de tenir. Merci pour ton écoute, ta patience, tes attentions, et pour ton temps, pour toutes les fois où je t'ai demandé ton avis et où tu as accepté de lire mes travaux pour me donner ton opinion sincère. Pour toutes les fois où j'ai pu m'appuyer sur toi, toutes les fois où tu as pris le relai pour les côtés de la vie, toutes les fois où tu m'as redonné confiance en moi. Merci d'être apparu dans ma vie et d'y être resté.

À ma famille qui je l'espère est fière de moi.

Résumé

Les zoonoses représentent 60% des maladies infectieuses émergentes, et 70% de ces zoonoses proviennent de la faune sauvage. Les chauves-souris sont les hôtes de nombreux agents infectieux, notamment de virus responsables de zoonoses chez l'Homme comme le virus Ebola, le virus Nipah ou le virus Hendra. Au cours des deux dernières décennies, de nouveaux virus issus des chauves-souris ont émergé dans les populations humaines et animales, avec des conséquences importantes pour la santé publique, vétérinaire, mais également pour l'économie. C'est notamment le cas des coronavirus (CoVs) tels que le syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS), le syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS) et le syndrome de diarrhée aiguë du porc (SADS), responsables de plusieurs milliers de décès humains ainsi que d'une mortalité élevée dans les élevages porcins. Bien que de nombreuses études aient identifié des CoVs de chauves-souris dans le monde, les connaissances actuelles sur la diversité et les risques associés à l'émergence de CoVs dans les écosystèmes insulaires tropicaux restent à évaluer avec précision.

L'objectif de cette thèse était d'étudier l'écologie et l'évolution de coronavirus dans des populations de chauves-souris. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au niveau d'exposition des hôtes aux CoVs, et à l'histoire évolutive de ces virus dans le contexte phylogéographique des îles de l'ouest de l'Océan Indien. Basée sur l'analyse de 1088 échantillons par biologie moléculaire, cette étude a mis en évidence, pour la première fois, la présence de CoV chez des chauves-souris insectivores à Mayotte, au Mozambique, à l'île de La Réunion, et à Madagascar. La prévalence globale de chauves-souris infectées par les CoVs était de $8,0\% \pm 1,2\%$ avec une variation significative entre l'Afrique continentale et les îles, mais aussi entre familles de chauves-souris. Nous avons identifié une grande diversité génétique de α -CoV et de β -CoV, dont certains sont phylogénétiquement proches de CoVs humains (e.g. HCoV-NL63, HCoV-229E, MERS-CoV). Enfin, ces CoVs sont structurés phylogénétiquement par famille de chauves-souris, supportant une longue histoire de coévolution entre chauves-souris et leurs CoVs dans l'Océan Indien occidental. Nous avons dans un second temps réalisé une étude longitudinale sur la dynamique d'infection de CoV dans une colonie de maternité de Petit Molosse (*Mormopterus francoismoutoui*), espèce endémique de La Réunion. Basé sur la détection du génome viral dans des prélèvements environnementaux (fèces et guano), nous avons exploré l'effet de la structure de la population sur la dynamique d'infection pendant deux années consécutives. Les résultats montrent une variation très marquée des prévalences d'infection chez les chauves-souris au cours de la saison, avec la présence de deux pics d'infection : lors de la colonisation de la grotte de maternité (associé à une augmentation de la densité des hôtes), et environ un mois après le début de la parturition (associé à la perte d'immunité chez les nouveaux-nés).

L'ensemble de ces travaux montre que l'évolution des CoVs des chauves-souris de l'ouest de l'Océan Indien est majoritairement due à de la coévolution entre les hôtes et leurs virus, bien que le contexte insulaire puisse également induire de la spéciation intra-île, au sein des familles de chauves-souris. La mise en évidence de facteurs écologiques et biologiques influant sur la dynamique d'infection à l'échelle d'une population souligne que les risques de transmission de CoVs à d'autres hôtes diffèrent en fonction des communautés de chauves-souris présentes sur chaque île, mais aussi de la structure des populations des hôtes et de sa variation temporelle.

Mots clefs : coronavirus, chauves-souris, coévolution, écologie insulaire, épidémiologie.

Abstract

Zoonoses account for 60% of emerging infectious diseases, among which 70% originate from wildlife. Bats host many infectious agents, including viruses responsible for zoonoses in humans such as Ebola, Nipah or Hendraus. For the last two decades, new bat viruses have emerged in human and animal populations, causing major threats for public and animal health. Coronaviruses (CoV) such as Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS), Middle East Respiratory Syndrome (MERS) and Acute Acute Diarrhea Syndrome (SADS) are responsible for thousands of deaths in humans and pigs. Although many studies have described bat CoVs around the world, current knowledge about the diversity and risks associated with emerging CoVs in island ecosystems remain to be precisely assessed.

In this work, we investigated the ecology and evolution of coronaviruses in bats by assessing the level of bat exposure to CoVs, and the evolutionary history in the phylogeographic context of the islands of the Western Indian Ocean. Based on the molecular screening of 1088 samples, we report, for the first time the presence of CoVs in insectivorous bats on Mayotte, on Madagascar, in Mozambique and on Reunion Island. The overall prevalence of bats positive for CoV was $8.0\% \pm 1.2\%$, with significant variation between continental Africa and islands, as well as between bat families. We found a large diversity of α -CoVs and β -CoVs, some being genetically related to those detected in human (*e.g.* HCoV-NL63, HCoV-229E, MERS-CoV). These CoVs were phylogenetically structured by bat family, supporting a long history of co-evolution between bats and their associated CoVs in the region. We then focused on the Reunion free tailed bat (*Mormopterus francoismoutoui*), an-endemic species on this island, and investigated temporal infection dynamics in a maternal colony, during two consecutive years. Results highlighted a major variation in the prevalence of infected bats during the maternity season, with patterns similar for both years and the presence of two peaks of infection. Indeed, one pic occurs during the colonization of the maternity colony (associated to an increase in host density), and another about a month after the beginning of parturition (potentially associated to a loss of maternal antibodies in newborns).

This work provides strong support for a long history of coevolution between bats and their CoVs in the Western Indian ocean, although within-island speciation for each bat families also occurs. Ecological and biological factors influencing the infection dynamics highlights a different level of CoV transmission risks to other hosts, including humans, associated to bat communities inhabiting each island, as well as to temporal variations in host population structure.

Keywords: coronavirus, bats, coevolution, island ecology, epidemiology.

Liste des publications scientifiques

Publication dans des journaux à comité de lecture international

Article 1: Joffrin L, Dietrich M, Mavingui P, Lebarbenchon C. Bat pathogens hit the road: But which one? PLoS Pathogens. 2018 ;14(8) : e1007134.

Article 2: Joffrin L, Goodman SM, Wilkinson DA, Ramasindrazana B, Lagadec E, Gomard Y, Minter G Le, Santos A Dos, Schoeman MC, Sookhareea R, Tortosa P, Julienne S, Gudo ES, Mavingui P, Lebarbenchon C. Bat coronavirus phylogeography in the western Indian Ocean. Soumis à Journal of Virology. Déposé dans BioRxiv (10.1101/742866).

Article 3: Joffrin L, Hoarau AOG, Lagadec E, Torrontegi O, Le Minter G, Dietrich M, Mavingui P, Lebarbenchon C. Longitudinal study of coronavirus infection dynamic in a bat maternity. En préparation.

Sommaire

Remerciements	
Résumé	
Abstract	
Liste des publications scientifiques	
Sommaire	
Liste des annexes	
Introduction	1
1. Maladies infectieuses émergentes	2
1.1. Incidence des maladies infectieuses	2
1.2. Coûts humains, économiques et sociétaux	5
1.3. Risques futurs	9
2. Les zoonoses	10
2.1. Définition.....	10
2.2. Zoonoses et émergence.....	10
2.3. Facteurs impliqués dans l'émergence.....	12
2.4. Surveillance des zoonoses	17
3. Écologie et évolution des agents infectieux	18
3.1. Coévolution.....	18
3.2. Facteurs associés à l'hôte et à l'environnement impliqués dans la dynamique d'infection.....	21
4. Objectifs des travaux de thèse.....	24
Chapitre I : Chauves-souris et zoonoses	25
I.1. Rôle des chauves-souris comme réservoir	26
I.1.1. Généralités	26
I.1.2. Caractéristiques des hôtes.....	27
I.1.3. Transmission des agents infectieux par les chiroptères.....	30
I.2. Coronavirus chez les chauves-souris	37
I.2.1. Origine zoonotique et diversité d'hôtes	37
I.2.2. Importance sanitaire des coronavirus	39
I.2.3. Structure et réplication des coronavirus	43
I.3. Conclusion	46

Chapitre II : Étude phylogéographique des coronavirus de chauves-souris du sud-ouest de l’Océan Indien	47
II.1. Répartition des zoonoses.....	48
II.1.1. Latitude et diversité en agents infectieux	48
II.1.2. L’ouest de l’Océan Indien : un point chaud de biodiversité.....	49
II.1.3. Diversité spécifique des chauves-souris.....	50
II.2. Évolution des agents infectieux associés aux chauves-souris.....	51
II.2.1. Diversité des d’agents infectieux associés aux mammifères.....	51
II.2.2. Histoires évolutives des agents infectieux dans la zone.....	52
II.3. Phylogéographie de coronavirus de populations de chauves-souris de l’ouest de l’Océan Indien.....	53
II.3.1. Article 2: Phylogeography of coronaviruses in bats in West Indian Ocean....	53
II.4. Conclusion	92
Chapitre III : Dynamiques d’infection chez les chauves-souris	93
III.1. Dynamiques d’infection chez les chauves-souris et risques de transmission, généralités	94
III.1.1. Rôle des déplacements des hôtes	94
III.1.2. Influence du sexe	95
III.1.3. Saisonnalité de la reproduction	96
III.1.4. Rôle des anticorps maternels	97
III.2. Dynamiques d’infection de coronavirus	98
III.2.1. Influence de l’âge.....	98
III.2.2. Influence de la saison de maternité	98
III.3. Dynamique d’infection de coronavirus dans une colonie de maternité à La Réunion	99
III.3.1. Modèle d’étude	99
III.3.2. Méthodologie	100
III.3.3. Article 3: Longitudinal study of coronavirus infection dynamics in a bat maternity colony	108
III.4. Conclusion	123
Discussion et perspectives	124
Évolution moléculaire des CoVs.....	125
Rôle des hôtes intermédiaires : cas du NL63-CoV	127
Identification des voies de transmission	129
Investigations en populations naturelles : aspects éthiques	130

Conservation et zoonoses	132
Références bibliographiques	135
Annexes	

Liste des figures

- Figure 1.** Exemples de maladies infectieuses émergentes et ré-émergentes entre 1940 et 2017 et répartition géographique (National Institute of Allergies and Infectious Diseases 2017). 4
- Figure 2.** Impact économique (en \$) de plusieurs maladies infectieuses émergentes entre 1994 et 2017 (Bouley et al. 2017). 5
- Figure 3.** Distribution géographique du « Health Quality and Access (HAQ), en 2015, d’après GBD 2015 Healthcare Access and Quality Collaborators 2017. 7
- Figure 4.** Principaux critères pris en compte par l’Organisation Mondiale de la Santé pour évaluer le risque d’une pandémie par un agent infectieux. 9
- Figure 5.** Illustration des étapes de l’émergence pour quatre agents infectieux zoonotiques (Wolfe, Dunavan, et Diamond 2007). 11
- Figure 6.** Événements évolutifs les plus courants dans les associations hôtes-agents infectieux (d’après Page et al. 1996). 19
- Figure 7.** Tanglegram représentant les associations entre hantavirus et leurs hôtes. Chaque couleur correspond à différents taxons hôtes (Guo et al. 2013). 20
- Figure 8.** Patron de dispersion de virus Influenza en Amérique du Nord en fonction de différentes voies de migrations aviaires (Bahl et al. 2013).. 23
- Figure 9.** Proportion des familles virales les plus détectées chez les chauves-souris entre 1956 et 2019 (Chen et al. 2014). 37
- Figure 10.** Origine des coronavirus et exemple de la diversité d’hôtes connus (modifié d’après (Lau et al. 2015 ; Chan et al. 2015 ; Cui et al. 2019). 38
- Figure 11.** Chronologie de l’émergence des six coronavirus humains (modifié d’après Forni et al. 2017). 40
- Figure 12.** Origine animale prouvée ou hypothétique des coronavirus humains (modifié d’après Cui, Li, et Shi 2019) 42
- Figure 13.** Structure d’un virion de coronavirus (Gorbalenya et al. 2006).. 43
- Figure 14.** Cycle réplcatif du coronavirus hépatique murin (MHV), Bergmann et al. 2006.. 45

Figure 15. Zones à risques d'émergence de zoonoses définies par le modèle corrigé par le biais d'effort de surveillance (Allen et al. 2017).....	48
Figure 16. Archipels de la région ouest Océan Indien et âge moyen (en vert) des différents archipels volcaniques en millions d'années. Modifiée d'après Tortosa et al. 2012.	50
Figure 17. Fréquence d'échantillonnage de fèces et de guano entre juin 2016 et juin 2018.	100
Figure 18a. Entrée de la grotte de Trois Bassin	101
Figure 18b. Représentation schématique de l'échantillonnage des fèces.	101
Figure 19. Échantillonnage de guano à l'entrée de la grotte.	101
Figure 20. Principe de la ddPCR (ThermoFisher, 2015).....	103
Figure 21. Exemples de résultats de puces de PCR digitale obtenues lors des essais de mise au point.	107

Liste des annexes

Annexe 1. Synthèse d'agents biologiques (virus, bactéries et champignons) pathogènes ou non-pathogènes détectés chez les chauves-souris (synthèse réalisée en mai 2019). (Mühldorfer 2013 ; Warrell 2013 ; Chen et al. 2014).

Annexe 2. Lebarbenchon C, Ramasindrazana B, **Joffrin L**, Bos S, Lagadec E, Le Minter G, Gomard Y, Tortosa P, Wilkinson DA, Goodman SM, Mavingui P (2017) Astroviruses in bats, Madagascar. *Emerg. Microbes Infect.* 6:e58.

Annexe 3. Hoarau F, Le Minter G, **Joffrin L**, Schoeman MC, Lagadec E, Ramasindrazana B, Dos Santos A, Goodman SM, Gudo ES, Mavingui P, Lebarbenchon C. Bat astrovirus in Mozambique. *Virol J.* 2018 ;15 :104.

Annexe 4. **Joffrin L**, Hoarau AOG, Lagadec E, Mavingui P, Lebarbenchon C. Astrovirus in Reunion Free-tailed Bat (*Mormopterus francoismoutoui*). *BioRxiv.* 2019 ; 774224.

Annexe 5. Exemple de sortie du logiciel QuantStudio 3D AnalysisSuite ® Cloud (ThermoFisher) pour l'analyse des puces de PCR digitale.

Annexe 6. Exemples d'anomalies observées pendant les essais de PCR digitale.

Introduction

1. Maladies infectieuses émergentes

1.1. Incidence des maladies infectieuses

Au début du XXIème siècle, les maladies infectieuses étaient responsables de près de 25% de la mortalité humaine avec plus de 14 millions de morts par an (Taylor et al. 2001). Aujourd'hui, même si les maladies dites non-transmissibles telles que les cancers, les maladies cardiovasculaires et les accidents vasculaires cérébraux représentent la majorité des causes de mortalité humaine (73% ; (Ritchie et Roser 2019)), les maladies infectieuses, ou transmissibles, représentent toujours un enjeu de santé publique majeur, souvent lié aux conditions de vie (Organisation Mondiale de la Santé 2018a). Dans le « Plan d'Action Mondial » proposé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2015, la lutte contre les maladies infectieuses représente un objectif prioritaire de développement durable et s'inscrit dans la section 3.3 relative à la santé et le bien-être pour tous (Organisation Mondiale de la Santé 2018a). Ainsi, l'OMS vise l'éradication de plusieurs épidémies liées aux maladies infectieuses (HIV, tuberculose, malaria, maladies tropicales négligées, maladies transmises par l'eau et autres maladies infectieuses) d'ici 2030 (Organisation Mondiale de la Santé 2018a). L'éradication d'un agent infectieux¹ a déjà été accomplie par le passé. En effet, le virus de la variole, responsable de 300 millions de morts dans le monde pendant le XXème siècle, a officiellement été déclaré éradiqué en 1980 suite à des campagnes de vaccination massives (Organisation Mondiale de la Santé 1972; Strassburg 1982). Cependant, malgré des progrès en matière d'hygiène, d'accès à une eau de bonne qualité et d'accès à la vaccination et aux traitements antibiotiques dans de nombreux pays (GBD 2015 Healthcare Access and Quality Collaborators 2017), de nouvelles maladies infectieuses sont apparues dans les populations humaines au cours des dernières décennies (Morens et al. 2004; Jones et al. 2008).

Les maladies infectieuses émergentes (MIE) sont définies comme « des infections récemment apparues dans une population ou qui ont rapidement augmenté en incidence ou de manière géographique » (Morse 1995). Cette définition regroupe à la fois (i) des maladies infectieuses apparues dans une population pour la première fois (émergence « stricte ») causées par des agents infectieux en contact pour la première fois avec les populations exposées (humaines, animales, végétales), mais également (ii) des maladies déjà identifiées par le passé et dont l'incidence (nombre de cas d'infection à un moment donné) est en augmentation dans une population ou sur un territoire et (iii) des maladies causées par de nouvelles souches² pathogènes recombinantes ou résistantes (Morse 1995; Jones et al. 2008).

¹ agent biologique vivant (bactéries, spores de champignons) ou non-vivant (virus, prions) capable d'induire chez un organisme une infection

² variant génétique d'un agent biologique

Dans le cas des maladies infectieuses apparues pour la première fois dans les populations humaines, un des exemples le plus célèbre est le Virus de l'Immunodéficience Humain (VIH). Ce virus serait apparu dans les populations humaines en 1980, et on estime à plus de 70 millions le nombre de personnes ayant été infectées (et 35 millions de morts) depuis son émergence (Organisation Mondiale de la Santé 2017a). Le Virus de l'Immunodéficience Simien (VIS), virus infectant les primates africains non humains, serait à l'origine du VIH (Keele et al. 2006). Des analyses phylogénétiques sur le VIS et le VIH ont mis en évidence au moins 6 évènements indépendants de transmission du VIS à l'Homme, survenus vraisemblablement au début du XX^{ème} siècle lors de morsures ou de la consommation de singes (Peeters et al. 2002; Sharp et Hahn 2011). Le VIS s'est ensuite adapté aux populations humaines avec le développement d'une chaîne de transmission longue et indépendante du réservoir simien, conduisant à l'émergence du VIH (Sharp et Hahn 2011).

Le second type de maladie émergente peut être illustré par la peste. La peste est une maladie infectieuse causée par une bactérie, *Yersinia pestis* qui est transmise par les piqûres et les déjections de puces infectées, notamment les puces de rats (Centers for Disease Control and Prevention 2018a). Connue depuis l'Antiquité, cette maladie a régulièrement ré-émergé dans les populations humaines au cours de l'histoire (Centers for Disease Control and Prevention 2019a). L'épidémie la plus importante de peste est celle de la peste noire survenue en Europe au milieu du XIV^{ème} siècle (Centers for Disease Control and Prevention 2019a). À l'origine endémique de l'Asie centrale puis importée en Europe à la suite de l'expansion de l'empire Mongol (Morelli et al. 2010), on estime qu'elle a décimé entre 30 à 50% de la population européenne, soit entre 25 millions et 45 millions de personnes en cinq années (Centers for Disease Control and Prevention 2019a). D'autres épidémies de pestes ont eu lieu à travers le monde, notamment en Afrique, en Asie et en Amérique du Sud (Organisation Mondiale de la Santé 2017b). Cependant depuis les années 1990, la majorité des cas humains enregistrés ont eu lieu en Afrique (Organisation Mondiale de la Santé 2017b). De 2010 à 2015, 3248 cas ont été répertoriés dans le monde, dont 584 décès (Organisation Mondiale de la Santé 2017b). Certains pays enregistrent des épidémies récurrentes notamment Madagascar, la République Démocratique du Congo, mais également le Pérou, considérés comme les trois principaux pays d'endémie de la peste (Organisation Mondiale de la Santé 2017b). À Madagascar par exemple, l'épidémie de peste de 2017 a entraîné 2 348 cas, dont 202 décès (Organisation Mondiale de la Santé 2017c).

Le troisième type d'émergence regroupe les nouvelles souches pathogènes recombinantes ou résistantes. La tuberculose est une maladie humaine causée par la bactérie *Mycobacterium tuberculosis*. Elle fait partie des dix premières causes de décès à travers le monde et la première liée à une maladie infectieuse, avec 10 millions de personnes ayant contracté la tuberculose en 2017 et 1,2 millions de décès (Organisation Mondiale de la Santé 2018b). Elle peut néanmoins

être traitée par des antibiothérapies (rifampicine et isoniazide principalement) (Centers for Disease Control and Prevention 2017; Organisation Mondiale de la Santé 2018b). Cependant, le sous-dosage et la durée trop limitée de l'utilisation de ces antibiotiques, ainsi que l'apparition spontanée de résistance au sein des populations bactériennes, a entraîné l'apparition de souches de *Mycobacterium tuberculosis* multi-résistantes aux antibiotiques (Kurz et al. 2016; Centers for Disease Control and Prevention 2017). En 2016, plus de 600 000 personnes auraient développé une tuberculose multi-résistante dans le monde (Organisation Mondiale de la Santé 2018b).

Le nombre de MIE à travers le monde semble s'intensifier, avec plus de 335 événements d'écurrences recensés entre 1940 et 2004 (Morens et al. 2004; Jones et al. 2008; Ecohealth Alliance 2015). De 2004 à 2017, une trentaine de nouvelles MIE sont apparues, avec par exemple l'émergence de la maladie liée au virus Zika au Brésil, du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS) ou de souches de staphylocoques dorés (*Staphylococcus aureus*) multi résistantes aux antibiotiques (National Institute of Allergies and Infectious Diseases 2017) (**Figure 1**). D'autres types d'écurrences par le bioterrorisme ou par la négligence de la sécurité de laboratoires microbiologiques pourraient également représenter un risque imprévisible (Morens, Folkers, and Fauci 2004). En 1979, une épidémie d'anthrax en Russie avait entraîné la mort de 96 personnes en 6 semaines (Meselson et al. 1994). Des analyses post-épidémiques ont pu déterminer que cette émergence était due à une négligence humaine: des spores de *Bacillus anthracis* ont accidentellement été libérées et disséminées par des vents forts, près d'une installation microbiologique militaire qui essayait de mettre au point un vaccin amélioré (Meselson et al. 1994).

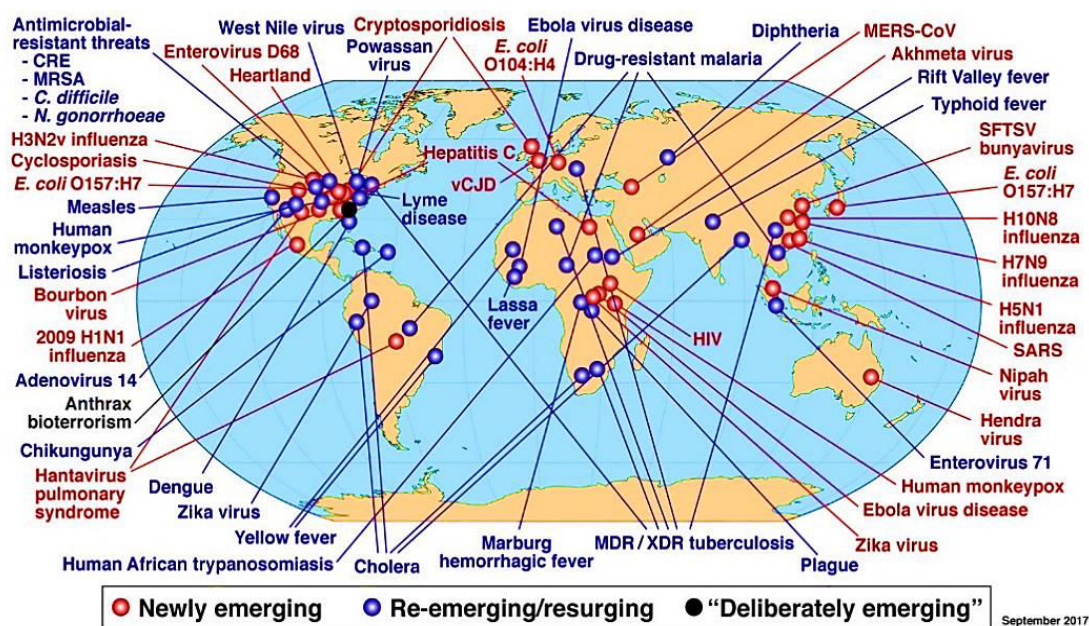


Figure 1. Exemples de maladies infectieuses émergentes et ré-émergentes entre 1940 et 2017 et répartition géographique (National Institute of Allergies and Infectious Diseases 2017). En rouge les maladies strictement émergentes, en bleues les maladies ré-émergentes et en noir un exemple de maladie qui pourrait être causée par du bioterrorisme.

1.2. Coûts humains, économiques et sociétaux

Les MIE ont un coût humain et économique mais peuvent aussi avoir des forts impacts au niveau sociétal. Pendant longtemps, le calcul du coût économique prenait seulement en compte les coûts directs (directement liés aux soins) et indirects (diminutions de la masse salariale dans certains secteurs d'activités) (Smith et al. 2019). Aujourd'hui, l'estimation du coût économique ne se limite plus à un secteur économique particulier (Smith et al. 2019). Ainsi, le calcul du coût économique d'une maladie infectieuse émergente regroupe les impacts sur les secteurs de la santé, des productions agricoles, animales et alimentaires, du tourisme et des voyages, des échanges commerciaux ainsi que les impacts environnementaux (Smith et al. 2019). Il existe néanmoins toujours des variations dans la méthode d'estimation de ces coûts économiques, limitant parfois la comparaison entre maladies (Organization 2009; Smith et al. 2019). Pour la Banque Mondiale par exemple, le principal indicateur du coût économique d'une épidémie dans un pays reste majoritairement le calcul du différentiel du Produit Intérieur Brut (indicateur de la richesse produite par année dans un pays) avant et après l'épidémie (Banque Mondiale 2012). En prenant en compte les données de la Banque Mondiale, du Programme des nations unies pour le développement (UNDP) et de bio-era, EcoHealth Alliance a estimé le coût économique associé à une minorité de ces MIE entre 1996 et 2017 à plus de 180 milliards de dollars (**Figure 2**).

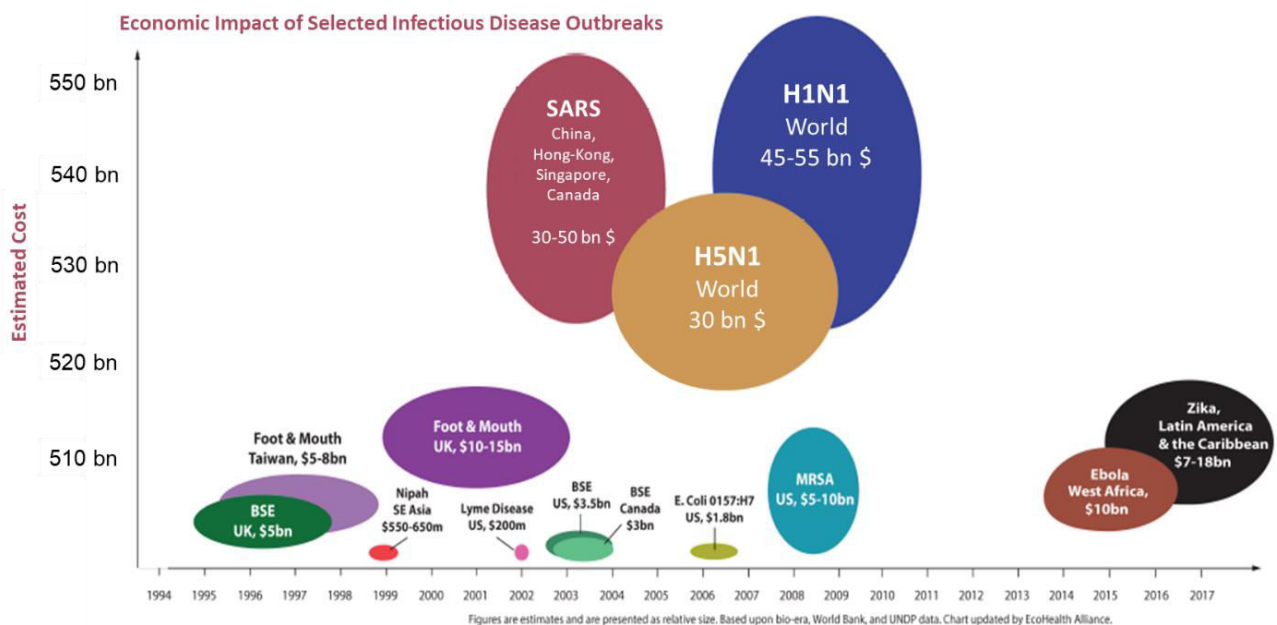


Figure 2. Impact économique (en \$) de plusieurs maladies infectieuses émergentes entre 1994 et 2017 (Bouley et al. 2017).

Exemple de l'épidémie au virus Ebola

Depuis sa première détection en 1976, le virus Ebola a été responsable de 25 épidémies (Report of an International Commission 1978; Piot et al. 2014; Breman et al. 2016). Cependant, de fortes disparités de morbidité et de mortalité existent selon les épidémies, en fonction du génotype viral, mais aussi du contexte socio-économique (McCormick et al. 1983; Piot et al. 2014; Breman et al. 2016). Lors de l'épidémie qui a touché l'Afrique de l'Ouest entre 2014 et 2016, la plus longue et la plus grande à ce jour, 28 639 cas (suspectés, probables et confirmés) et 11 316 morts ont été reportés (Centers for Disease Control and Prevention 2019b). Le coût économique mondial associé est estimé entre 8 et 10 milliards de dollars (Centers for Disease Control and Prevention 2019b). À cela s'ajoute le coût social lié à l'épidémie, comprenant la difficulté de l'accès aux établissements de santé, la fragilisation de la sécurité alimentaire, la diminution de la vaccination infantile, l'arrêt temporaire de l'accès à l'éducation ainsi que les pertes familiales (Centers for Disease Control and Prevention 2019b). Au cours de ces deux années d'épidémie, 8% des médecins, infirmiers et sages-femmes du Libéria et de la Guinée qui auraient contracté le virus sont décédés (Centers for Disease Control and Prevention 2019b). La difficulté d'accès aux établissements de santé au Libéria, en Guinée et en Sierra Leone pour des patients souffrant d'autres maladies (HIV, tuberculose, malaria) aurait entraîné le décès de plus de 10 000 personnes, soit presque autant que le nombre de décès lié directement à Ebola (Parpia et al. 2016).

Exemple de l'épidémie de grippe H1N1

Les épidémies de gripes sont responsables d'environ 5 millions de cas dans le monde et 291 000 à 645 000 décès par an (Iuliano et al. 2018). Au cours du dernier siècle, 4 pandémies ont eu lieu, en 1918, 1957, 1968, et en 2009 (Kilbourne 2006; Saunders-Hastings et Krewski 2016). En 1918, l'émergence de la « grippe espagnole », a entraîné la mort de 50 à 100 millions de personnes à travers le monde, soit 3 % de la population mondiale de l'époque, du fait de sa virulence mais aussi du manque de moyens de prévention (vaccination), de recherche et de soins médicaux (Johnson et Mueller 2002). En 2009, un nouveau génotype viral issu de la recombinaison de virus d'origines aviaires, porcines et humaines a émergé et s'est propagé dans 74 pays (Organisation Mondiale de la Santé 2010). Le coût humain associé à cette épidémie était d'environ 284 000 décès (Dawood et al. 2012). Au niveau économique, la lutte contre cette épidémie par l'organisation de campagnes de prévention, de l'achat de vaccins ainsi que d'abattages massifs de porcs et volailles dans de nombreux élevages, a coûté environ 50

milliards de dollars à travers le monde (Bouley et al. 2017; Pasquini-Descomps et al. 2017). En France, l'achat de 94 millions de vaccins a coûté 382 millions d'euros, alors que seul 8% des français ont été vaccinés (5,36 millions) et 312 décès ont été recensés (Assemblée nationale 2010; Sénat 2010).

Des inégalités dans les systèmes de santé à travers le monde

Dans le monde, des disparités importantes existent concernant l'accès à des structures médicales et à des soins de qualité, limitant l'efficacité de lutte contre les épidémies notamment dans les régions en développement (GBD 2015 Healthcare Access and Quality Collaborators 2017). Ces inégalités liées à la santé (accès et qualité) peuvent être estimées par l'indice « Health Access and Quality » (HAQ) (**Figure 3**). Cet indice est calculé à partir du nombre de causes pour lesquelles un décès ne devrait pas arriver en présence d'un traitement adapté, par pays, à une période donnée (GBD 2015 Healthcare Access and Quality Collaborators 2017). Le HAQ est compris entre 0 et 100, 0 représentant le score où aucun soin n'est apporté pour aucune cause, et 100 le score où un traitement efficace est apporté à chaque cause (GBD 2015 Healthcare Access and Quality Collaborators 2017). En 2015, les pays avec les index les plus élevés étaient l'Andorre (HAQ =95), l'Islande (HAQ =94) et la Suisse (HAQ= 92), tandis que les pays avec les index les plus bas étaient la République centrafricaine (HAQ =29), l'Afghanistan (HAQ =32) et la Somalie (HAQ =34). Même si l'accès aux systèmes de santé et leur qualité se sont globalement améliorés depuis 1990 (pour 167 pays sur 190) comme en Turquie, au Pérou ou encore en Chine, les inégalités entre pays n'ont jamais été aussi importantes (GBD 2015 Healthcare Access and Quality Collaborators 2017).

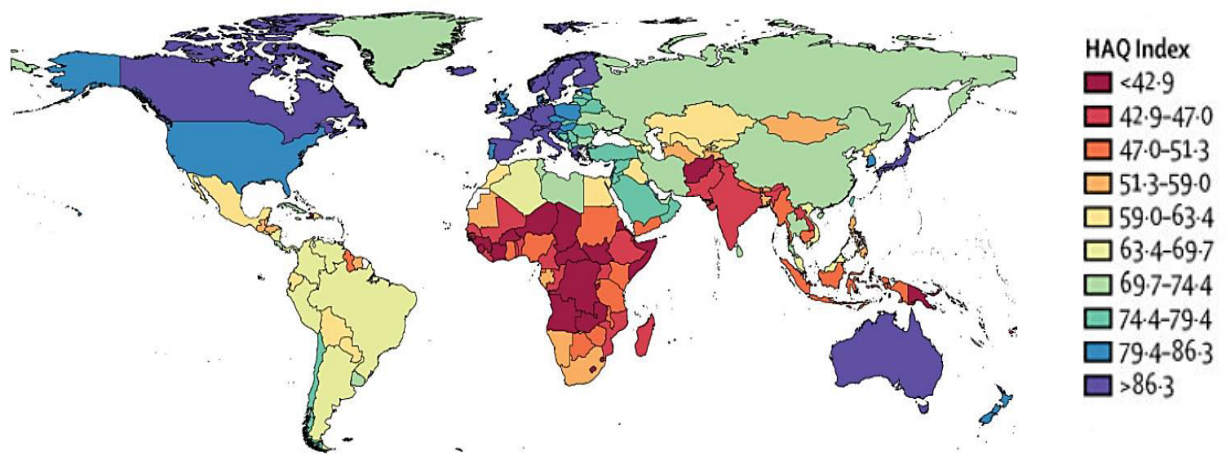


Figure 3. Distribution géographique du « Health Quality and Access (HAQ), en 2015, d'après GBD 2015 Healthcare Access and Quality Collaborators 2017.

Les inégalités face aux maladies infectieuses

Les inégalités liées à la santé entre individus, populations ou pays proviennent en partie d'inégalités sociales, environnementales et économiques (Ngonghala et al. 2014; Garchitorena et al. 2017; GBD 2015 Healthcare Access and Quality Collaborators 2017). Un lien entre la pauvreté et certaines maladies infectieuses (malaria, tuberculose, maladies tropicales négligées) a clairement été établi, et repose majoritairement sur le manque d'accès à l'eau potable, le niveau faible d'hygiène, la malnutrition, l'habitation insalubre et l'inaccessibilité aux systèmes de santé et à leur mauvaise qualité (Moon et al. 2012; Ngonghala et al. 2014; Garchitorena et al. 2017). Les pays en voie de développement sont les pays où les maladies infectieuses sont les plus prévalentes, notamment les maladies comme la tuberculose, la rougeole ou encore le tétanos alors qu'il existe des traitements efficaces (vaccins, antibiotiques, médicaments) (GBD 2015 Healthcare Access and Quality Collaborators 2017). La théorie du « 10/90 gap » soutient que l'investissement pour la lutte contre certaines maladies fortement prévalentes dans les pays en développement serait négligé par rapport à des maladies moins prévalentes dans des pays développés. Selon cette théorie, moins de 10% des ressources mondiales consacrées à la recherche dans le secteur de la santé seraient consacrées à la recherche dans les pays en développement, où plus de 90% de décès seraient liés à des causes évitables (Global Forum for Health Research 2002). Malgré des progrès et une réduction des écarts entre investissements dans la recherche et développement, et les priorités sanitaires dans les pays en développement, les inégalités liées au « 10/90 gap » semblent toujours persister (Kilama 2009; Viergever 2013).

Persistance des inégalités en santé

La question de la cause de cette persistance d'inégalité est complexe. Pour certains, elle serait due à une réticence des laboratoires pharmaceutiques à financer des projets de recherche et développement sur des maladies peu rentables (Moon, Bermudez et Hoen, 2012). Étonnamment, l'investissement dans le secteur de la santé ne semble pas être une priorité pour de nombreux pays fortement concernés par des problèmes sanitaires importants dus à des maladies infectieuses. La majorité des pays (72 % en 2015) dépensent entre 4,5 et 10,5% de leur PIB dans le secteur de la santé par an (Banque Mondiale 2019). Mais en 2015 par exemple, l'Inde n'a investi que 3,5% de son PIB dans le secteur de la santé alors que plus de 35 % de décès dans ce pays étaient liés aux maladies infectieuses cette même année (Banque Mondiale 2019). À l'inverse, la Sierra Leone a investi plus de 20% de son PIB dans le domaine de la santé pour un pourcentage de décès imputable aux maladies infectieuses similaire (Banque Mondiale 2019), bien que cette estimation soit probablement biaisée par l'épidémie d'Ebola qui avait

émergé dans ce pays en 2014 (Parpia et al. 2016). Au-delà des inégalités sociales et géographiques, la persistance des inégalités d'accès aux soins et de leur qualité aux soins à travers le monde semble donc également liée à des facteurs économiques et politiques.

1.3. Risques futurs

Au vu de l'explosion de MIE à travers le monde ces 20 dernières années, l'OMS redoute l'émergence d'un nouvel agent infectieux à fort potentiel pandémique chez l'Homme (Reusken et al. 2018). Afin d'anticiper l'émergence d'une telle pandémie, l'OMS a établi une liste d'agents infectieux susceptibles d'entraîner une telle crise sanitaire en ciblant certains critères à risques (Reusken et al. 2018) (**Figure 4**). À la suite de l'examen de ces critères, onze maladies prioritaires à haut risque de pandémie ont été mises en avant par l'OMS.

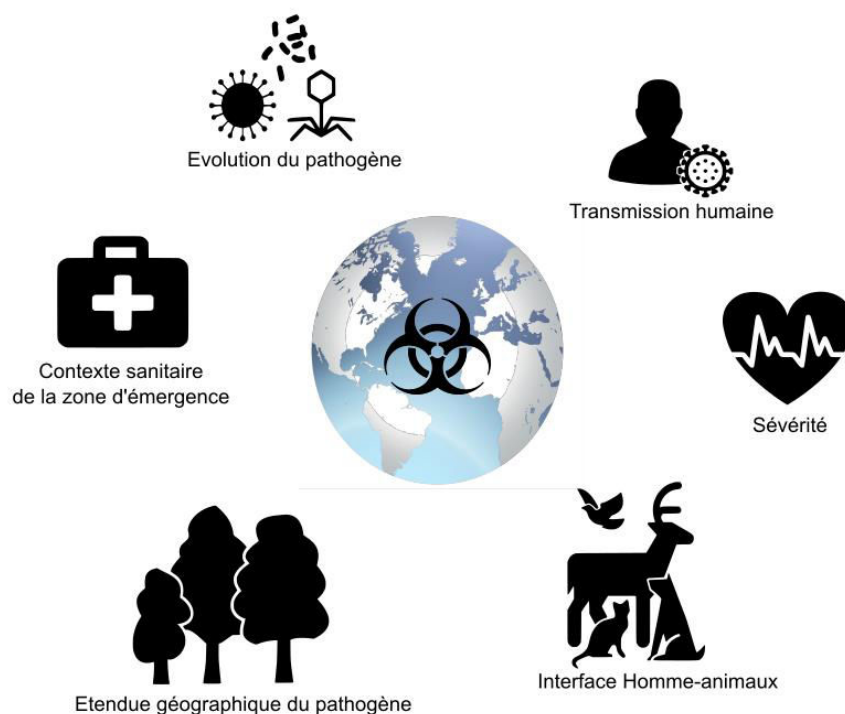


Figure 4. Principaux critères pris en compte par l'Organisation Mondiale de la Santé pour évaluer le risque d'une pandémie par un agent infectieux.

Parmi celles-ci, dix sont déjà connues mais pourraient entraîner d'importantes crises sanitaires au vu de leur taux de mortalité, et de l'absence de traitements et de vaccins efficaces à ce jour: la fièvre de Crimée-Congo, les maladies aux virus Ebola et Marburg, la fièvre de Lassa, la Fièvre de la Vallée du Rift, le MERS et le Syndrome Respiratoire Aigu Sévère (SRAS), les

maladies liées aux virus Nipah et Hendra, la maladie liée au virus Zika (Reusken et al. 2018). Ces MIE sont toutes causées par des virus à ARN et les émergences passées de chacune de ces maladies chez l'espèce humaine se sont faites par l'intermédiaire de vecteurs arthropodes ou d'animaux vertébrés.

2. Les zoonoses

2.1. Définition

Une zoonose est une maladie capable de se transmettre naturellement entre les animaux vertébrés et l'Homme (Organisation Mondiale de la Santé 2019a). On considère qu'environ 60% des maladies infectieuses émergentes sont des zoonoses, dont 70% sont issues de la faune sauvage (Jones et al. 2008). Cependant, les connaissances limitées sur la biologie et l'écologie de certaines familles animales, ainsi que sur les agents infectieux qu'ils hébergent, compliquent l'identification des facteurs impliqués dans l'émergence des maladies zoonotiques. Un nombre grandissant de travaux a souligné l'importance d'adopter une approche de travail interdisciplinaire pour aborder les recherches sur ces aspects. Le rapprochement entre l'écologie et la santé initié depuis une vingtaine d'années vise notamment à connecter des disciplines telles que l'épidémiologie, la virologie, la bactériologie, la parasitologie, l'écologie ou encore la géographie pour étudier les phénomènes d'émergence des zoonoses (Cunningham et al. 2017; Bird et Mazet 2018; Centers for Disease Control and Prevention 2018b). Ainsi, la conduite de recherches par des approches dites « One Health » permet d'étudier l'émergence des zoonoses en interconnectant les santés humaines, animales et environnementales et d'appréhender de façon plus globale les mécanismes impliqués dans ces émergences (Wang et Cramer 2014; Cunningham et al. 2017; Bird et Mazet 2018; Centers for Disease Control and Prevention 2018b).

2.2. Zoonoses et émergence

Les étapes de l'émergence

L'émergence d'une zoonose est un processus qui peut être conceptuellement divisé en plusieurs étapes ; trois (Parrish et al. 2008; Morse et al. 2012b), quatre (Howard et Fletcher 2012) ou cinq (Pike et al. 2010; Wolfe, Dunavan, et Diamond 2007; **Figure 5**) selon les auteurs. La première étape est celle de pré-émergence, décrite comme un stade où un agent infectieux circule au sein de ses hôtes réservoirs dans une aire géographique donnée (Morse et al. 2012b).

La seconde étape correspond à une émergence localisée chez une espèce non-réservoir et qui peut entraîner une transmission interindividuelle (Morse et al. 2012b). Enfin, la dernière étape correspond au stade de la pandémie, c'est-à-dire une épidémie mondiale avec une transmission essentiellement interhumaine (Morse et al. 2012b). Les étapes deux et trois peuvent être subdivisées (Wolfe et al. 2007; Pike et al. 2010). L'émergence localisée comprend une phase d'infection primaire où le pathogène est transmis exclusivement par l'animal réservoir, puis une phase d'épidémie restreinte à quelques cas de transmission interindividuelle (Wolfe et al. 2007; Pike et al. 2010). Pour finir, une étape supplémentaire s'ajoute à celle de pandémie définie par Morse et ses collaborateurs, avec une phase d'installation permanente du pathogène chez la nouvelle espèce (Wolfe et al. 2007; Pike et al. 2010).

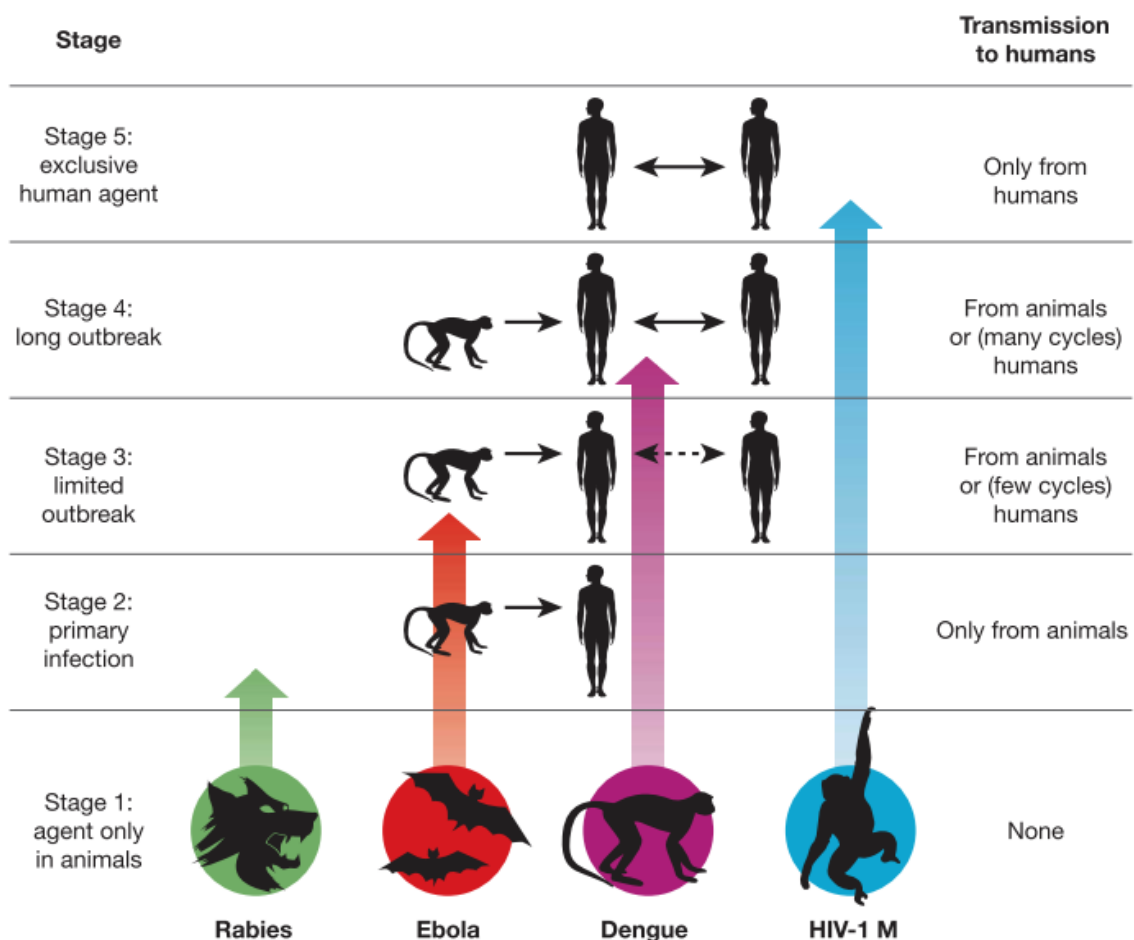


Figure 5. Illustration des étapes de l'émergence pour quatre agents infectieux zoonotiques (Wolfe, Dunavan, et Diamond 2007).

Le risque à chaque étape

Le passage d'une étape à l'autre est dépendant d'un certain nombre de facteurs liés à l'agent infectieux, à l'hôte mais également à l'environnement (Daszak et al. 2000; Woolhouse et Gowtage-Sequeria 2005; Morse et al. 2012b; Kreuder Johnson et al. 2015; Olival et al. 2017; Plowright et al. 2017). De nombreux facteurs peuvent conduire à l'émergence d'agents infectieux chez l'Homme mais aussi chez les espèces animales domestiquées ou sauvages (Daszak et al. 2000) et chaque facteur peut agir à une étape différente de l'émergence. Lorsqu'un agent infectieux est présent chez une espèce (étape 1), les probabilités d'infecter d'autres espèces animales, animaux et Homme (étapes 2, 3 et 4 et 5) vont dépendre de la distribution et de l'intensité de l'infection chez un hôte, du taux d'excrétion, de sa capacité de persistance à l'extérieur de l'hôte, mais également de son mode de transmission, de la susceptibilité des hôtes, définie par la capacité du pathogène à pénétrer dans l'organisme, à se multiplier, et à se répliquer ou se reproduire (Plowright et al. 2017). Cependant, l'importance de ces paramètres dans la probabilité de changement d'hôte est variable selon les agents infectieux considérés (Plowright et al. 2017).

2.3. Facteurs impliqués dans l'émergence

Facteurs liés au pathogène

L'émergence d'une maladie zoonotique dans une population est d'abord associée à la capacité d'un agent infectieux à franchir la barrière d'espèce, à s'adapter à l'environnement de l'hôte et à s'y multiplier (Morse 1995). Ainsi, la nature des agents infectieux (virus, prions, bactéries, champignons, protozoaires ou helminthes), leur évolution et leurs modes de transmission sont des facteurs déterminants dans les processus d'émergence (Parrish et al. 2008; Longdon et al. 2014). La majorité (44%) des agents infectieux émergents dans les populations humaines sont des virus, et en particulier des virus à ARN (Taylor et al. 2001). En effet, les virus à ARN représentent 30% des agents infectieux émergents (Howard et Fletcher 2012) et 94% des virus zoonotiques (Kreuder Johnson et al. 2015). Ils sont caractérisés notamment par des taux de mutation remarquablement élevés (10^{-3} à 10^{-5} mutations/site/an) dus à l'absence d'une fonction correctrice de l'ARN polymérase ARN-dépendante lors de la réplication (Gago et al. 2009; Holmes 2010). Les virus à ARN présentent également des taux de réarrangements de leur génome (recombinaisons et réassortiments génétiques) plus élevés que chez les organismes cellulaires, entraînant une forte diversité géotypique dans les populations virales dénommées quasi-espèces (Parrish

et al. 2008; Longdon et al. 2014). Ces caractéristiques leur confèrent une grande plasticité et capacité d'adaptation, notamment à de nouveaux hôtes et à de nouvelles conditions environnementales, comparés à d'autres agents infectieux (Woolhouse et al. 2005; Holmes 2010; Longdon et al. 2014).

Les modes de transmission des agents infectieux peuvent également faciliter leur dispersion et la transmission à de nouveaux hôtes (Parrish et al. 2008; Loh et al. 2015; Kreuder Johnson et al. 2015; Antonovics et al. 2017). Ces modes de transmission sont classés en deux grandes catégories : transmission verticale et transmission horizontale (Antonovics et al. 2017). La transmission verticale peut être due à la production de nouvelles cellules par la reproduction de cellules infectées (reproduction bactérienne ou cellules sexuelles lors de la méiose), soit liée à la transmission maternelle *via* le cordon ombilical ou à l'allaitement chez les mammifères (Antonovics et al. 2017). L'exemple le plus courant pour la transmission par voie materno-fœtale est le virus HIV-1 : les femmes enceintes HIV-positives qui ne suivent pas de traitement ont 10% à 40% de risque supplémentaire de transmettre le virus à leur enfant (Semba et al. 1994). La transmission horizontale peut être directe ou indirecte (Antonovics et al. 2017). Dans le cas d'une transmission horizontale directe, l'agent infectieux est transmis par contact direct entre deux individus (*e.g.* contact de la peau, des aérosols, rapport sexuel) (Antonovics et al. 2017). Dans le cas d'une transmission horizontale indirecte, l'agent infectieux peut être transmis à un nouvel hôte soit de manière passive par l'environnement (eau, sol, air, matériel de soin, *etc.*), soit de manière active par un vecteur arthropode (moustique, tique, glossine, *etc.*) ou d'un parasite (filaires, nématodes, *etc.*) (Antonovics et al. 2017). Parfois, plusieurs modes de transmission sont possibles pour le même agent infectieux. Par exemple, la leptospirose est causée par des bactéries du genre *Leptospira* (Levett 2001) dont le cycle de transmission peut faire intervenir plusieurs hôtes intermédiaires sauvages ou domestiques, qui sont contaminés par l'urine d'un hôte réservoir (*e.g.* rongeurs) (Ko et al. 2009). Cette contamination peut se faire soit directement par le contact direct avec des urines infectées par des leptospires pathogènes (Ko et al. 2009), soit par transmission indirecte *via* l'environnement contaminé (sols, eaux stagnantes) où les leptospires peuvent survivre pendant plusieurs mois après leur excrétion (Andre-Fontaine et al. 2015; Thibeaux et al. 2017). Ainsi, la connaissance des modes de transmissions d'un agent infectieux permet d'appréhender les risques d'émergence et de mettre en place des mesures de contrôle efficaces.

Facteurs liés à l'hôte

Un hôte dispose de différents mécanismes qui interviennent avant la rencontre avec un agent infectieux, ou lors du contact avec l'agent infectieux. Ces mécanismes peuvent soit empêcher ou limiter l'infection, soit limiter la transmission de cet agent infectieux à d'autres hôtes. Le comportement d'un hôte peut influencer sa probabilité de rencontre avec un agent infectieux. Dans le règne animal, chez de nombreuses espèces, les individus sains vont éviter les contacts avec les individus ou les sites qui semblent être infectés ou parasités pour (i) éviter de se contaminer eux-mêmes, (ii) augmenter l'efficacité de la reproduction et/ou (iii) se reproduire avec des individus potentiellement plus résistants et ainsi assurer une descendance résistante (Hart 2011; Sarabian et al. 2018). L'ensemble de ces comportements pour détecter la présence d'agent infectieux dans l'environnement et éviter les contacts avec ces agents infectieux et leurs hôtes est défini comme le « système immunitaire comportemental » (Schaller et Park 2011). Chez les oiseaux par exemple, certaines espèces détectent les environnements parasités et peuvent décider soit de ne pas s'y installer, soit d'abandonner leur nid si la nidification a déjà eu lieu (Bush et Clayton 2018). Chez les mammifères, les mandrills sont capables de détecter chimiquement le parasitisme intestinal par la bactérie *Balantidium coli* d'un congénère en sentant les fèces de ce dernier, et adaptent ainsi leur comportement en limitant les contacts avec les fèces d'un individu parasité et en évitant d'épouiller cet individu (Poirotte et al. 2017).

Chez l'Homme, certains comportements individuels liés au mode de vie tels que la consommation de viande de brousse, la proximité avec certains animaux sauvages réservoirs (notamment dans les pays en développement), ou la proximité avec des animaux d'élevages, peuvent également faciliter la transmission de zoonoses (Morse 1995; Daszak et al. 2000; Kruse et al. 2004; Karesh et al. 2012). Lors de certaines épidémies, la chasse, la préparation et la consommation de viande ont été avancées comme des facteurs de risques. Le premier cas humain de l'épidémie d'Ebola en 2007 en République Démocratique du Congo serait une personne ayant acheté au marché et consommé des chauves-souris frugivores (potentiellement réservoir du virus Ebola) (Leroy et al. 2009). De nombreux autres animaux comme les gorilles, les chimpanzés ou les antilopes forestières ont été détectés positifs au virus Ebola, augmentant ainsi les risques de contamination lors de la chasse, préparation ou consommation de leur viande (Leroy et al. 2004). Chez l'Homme, la mondialisation et la globalisation des voies d'échanges commerciaux et des transports aériens et maritimes ont entraînés des modifications dans la distribution spatiale de nombreux agent infectieux, dans leur vitesse et échelle de

dispersion, et au niveau de leur évolution, favorisant la vitesse de transmission (Lebarbenchon et al. 2008; Karesh et al. 2012; Morse et al. 2012b). En 2003, l'épidémie de SRAS a émergé en Chine et s'est ensuite propagée à 37 pays sur cinq continents en quelques mois (Organisation Mondiale de la Santé 2003). Plusieurs personnes infectées par le SRAS avaient pris l'avion, participant ainsi à une dissémination du virus dans d'autres pays (Olsen et al. 2003; Breugelmans et al. 2004).

L'infection d'un hôte par un agent infectieux dépend également de la susceptibilité de cette hôte (*i.e.* la capacité de l'agent à pénétrer dans les cellules, à se multiplier, et à se répliquer ou à se reproduire) (Plowright et al. 2017). Cette susceptibilité est principalement dépendante de facteurs immunitaires, cellulaires et génétiques de l'hôte (Parrish et al. 2008; Bean et al. 2013; Sironi et al. 2015). Lors de son entrée dans l'organisme, l'agent infectieux doit échapper aux systèmes immunitaires (inné et acquis) de l'hôte (Parrish et al. 2008; Bean et al. 2013; Sironi et al. 2015). Le système immunitaire inné, présent chez tous les animaux, et le système immunitaire acquis, présent chez les animaux vertébrés, limitent l'infection de l'hôte par un pathogène (Parrish et al. 2008; Bean et al. 2013; Sironi et al. 2015). Ces systèmes regroupent un ensemble de mécanismes cellulaires qui agissent soit de manière non-spécifique (*e.g. via* les cellules phagocytaires comme les neutrophiles ou les macrophages) soit de manière spécifique (*e.g. via* l'implication de lymphocytes et d'anticorps) sur le pathogène, entraînant la production de cytokines (*e.g.* interférons, interleukines), de réponses inflammatoires ou d'anticorps selon le système mobilisé (Sironi et al. 2015). La capacité d'un agent infectieux à pénétrer dans les cellules hôtes est également déterminante (Parrish et al. 2008). L'hôte doit notamment posséder des récepteurs cellulaires qui permettent à l'agent infectieux de s'attacher à ses cellules (Parrish et al. 2008; Plowright et al. 2017).

Facteurs liés à l'environnement

Les modifications environnementales liées aux pressions anthropiques telles que la modification des territoires, l'urbanisation ou l'intensification de l'élevage affectent les processus d'émergence (Daszak et al. 2001; Bradley et Altizer 2007; Keesing et al. 2010; Altizer et al. 2011; Loh et al. 2015). L'empiétement de l'Homme sur l'habitat naturel de réservoirs animaux sauvages, à travers la déforestation, l'urbanisation ou le développement d'activités agricoles entraîne des modifications dans la distribution et la densité de ces réservoirs, et augmente les probabilités de contacts entre la faune sauvage, la faune domestique, et l'Homme (Daszak et al. 2000). Le virus Nipah est un virus transmis par des chauves-souris frugivores décrit pour la première fois en 1998 en Malaisie (Chua et al. 1999). Depuis la première

épidémie, ce virus a ré-émergé dans différents pays, comme l'Inde ou le Bangladesh (Plowright et al. 2019). Lors de la première épidémie humaine en 1998 en Malaisie, 265 cas d'encéphalites sévères et 115 morts ont été reportés (Looi et Chua 2007). Le développement de fermes porcines à proximité d'arbres fruitiers aurait créé un environnement très favorable aux contacts entre l'Homme et les chauves-souris frugivores *Pteropus* sp. réservoirs du virus Nipah (Looi et Chua 2007; Pulliam et al. 2012). En 2004, la deuxième épidémie au virus Nipah, au Bangladesh est associée avec la production de lait de palme dans des plantations de palmier dattier (Luby et al. 2006). Des chauves-souris infectées par le virus Nipah ont contaminé par leur salive et leur urine le lait de palme, qui par la suite a été consommé par les habitants (Luby et al. 2006). En mai 2018, 23 nouveaux cas d'infection au Nipah virus ont été rapportés, en Inde dans la région du Kérala (Plowright et al. 2019). Étant donné qu'aucune trace d'ARN de virus Nipah n'a pu être détectée dans des fruits partiellement mangés autour de la zone d'émergence, la piste de la consommation de lait de palmier ou de fruits contaminés a été écartée (Arunkumar et al. 2019).

L'augmentation des températures de surface à l'échelle mondiale affecte les distances, périodes, aires de répartition ou zones de migration de nombreux organismes (Walther et al. 2002; Parmesan et Yohe 2003). La migration vers des latitudes et des altitudes de plus en plus élevées modifierait *de facto* la répartition des hôtes et des agents infectieux qui y sont associés (Hughes 2000; Parmesan et Yohe 2003; Chen et al. 2011). Dans le nord de l'Europe et en Amérique du Nord, de nombreuses espèces de cervidés, hôtes des tiques *Ixodes* sp. vectrices de la borréliose de Lyme, ont étendu leurs aires de distribution du fait de la disponibilité de ressources alimentaires à des latitudes et des altitudes plus élevées (Medlock et al. 2013). Parallèlement, d'autres études ont pu mettre en évidence l'expansion des aires de distributions de ces tiques dans ces mêmes régions (Lindgren et al. 2000; Greer et al. 2008; Jaenson et al. 2012). Certaines régions d'Amérique du nord et d'Europe peu concernées par la maladie de Lyme au début des années 2000 comme les états du Maine, du Québec, de l'Ontario ou les régions de Highland et Tayside en Ecosse ont constaté une expansion du nombre de cas de borréliose de Lyme au cours de la dernière décennie (Stone et al. 2017). Au Canada, le nombre de cas de la maladie de Lyme en 2009 avait été estimé à 144 cas contre 2025 en 2017 (Ogden et al. 2019).

L'amplification des phénomènes météorologiques extrêmes tels que l'augmentation des épisodes cycloniques, de sécheresses ou de fortes précipitations est un risque difficilement maîtrisable, notamment pour les maladies vectorielles transmis par les moustiques (Patz et al. 1996; Patz et al. 2005; Altizer et al. 2006). En effet, selon les virus et les vecteurs impliqués,

ces événements peuvent affecter la valeur sélective³, la compétence vectorielle⁴ et la capacité vectorielle⁵ à différents niveaux, en agissant sur la densité des vecteurs, les taux de piqûres, le taux d'éclosion des œufs ainsi que le développement du pathogène au sein du vecteur (Altizer et al. 2006). La Fièvre de la Vallée du Rift est une arbovirose transmise au bétail et à l'Homme par des moustiques des genres *Aedes* et *Culex* en Afrique de l'Est (Centers for Disease Control and Prevention 2016). Le virus est transmis au cours de cycles enzootiques⁶ en milieu naturel (Centers for Disease Control and Prevention 2016). Les précipitations extrêmes stimulent l'éclosion des œufs de moustiques qui peuvent être infectés, et ainsi augmenter le risque de transmission (Martin et al. 2008; Anyamba et al. 2010; Pachka et al. 2016). Des impacts similaires sont également observés pour d'autres arboviroses comme la dengue ou encore pour des parasitoses comme le paludisme (Rogers et Randolph 2000; Hales et al. 2002).

2.4. Surveillance des zoonoses

La lutte contre l'émergence de zoonoses dans les populations humaines peut s'effectuer à tous les stades de l'émergence (Karesh et al. 2012; Belay et al. 2017). Cependant, la surveillance et la prévention de zoonoses en milieu naturel resteraient les méthodes les plus sûres et les moins coûteuses pour une détection précoce et une anticipation d'éventuelles épidémies (Karesh et al. 2012; Belay et al. 2017). Avec la prédominance des zoonoses issues de la faune sauvage, il est primordial de mener des programmes de recherches pour inventorier et décrire les agents biologiques à potentiel zoonotique présents actuellement dans les hôtes réservoirs. Au vu de la menace de l'émergence de zoonoses dans un futur proche, plusieurs réseaux et programmes de recherches et de surveillance sur les zoonoses ont déjà été mis en place, à des échelles nationales et internationales (*e.g.* EcoHealth Alliance, PREDICT, GLOBAL VIROME PROJECT) (Carroll et al. 2018; Ecohealth Alliance 2019).

Les mammifères représentent les réservoirs majeurs d'agents émergents transmissibles chez l'Homme (Woolhouse et Gowtage-Sequeria 2005; Jones et al. 2008; Morse et al. 2012b), avec les groupes taxonomiques des rongeurs, des chauves-souris, des primates et des ongulés identifiés comme présentant le risque le plus élevé de transmission de zoonose (Luis et al. 2013;

³ valeur relative qui décrit l'aptitude d'un géniteur à survivre et se reproduire

⁴ aptitude d'un vecteur à permettre le développement d'un pathogène, de son ingestion à sa maturation jusqu'à la transmission à un hôte lors d'un repas sanguin

⁵ efficacité de transmission d'un agent pathogène par un vecteur arthropode

⁶ définit une maladie épidémique, qui n'atteint que les animaux d'une seule localité ou d'une seule exploitation, soit en permanence, soit à certaines époques

Luis et al. 2015; Han et al. 2016; Olival et al. 2017). Nous développerons plus en détail l'importance des chauves-souris et leur rôle dans l'émergence de zoonoses au cours du chapitre suivant.

3. Écologie et évolution des agents infectieux

Les interactions hôtes-agent infectieux sont définies comme l'ensemble des relations qui existent entre un organisme vivant et un agent biologique infectieux pour cet organisme, au travers d'un prisme environnemental. L'étude des agents infectieux en milieu naturel passe par la compréhension des interactions qui existent entre ces agents infectieux, leurs hôtes et l'environnement dans lequel ils évoluent, en étudiant leur évolution et leur écologie (Karesh et al. 2012; Engering et al. 2013). L'investigation de ces deux composantes permet ainsi d'augmenter la compréhension de la biologie et de l'épidémiologie d'infections zoonotiques dans des réservoirs naturels, et d'identifier des facteurs écologiques influant sur les dynamiques d'infection (temporelles et spatiales) dans un système hôte-agent infectieux-environnement.

3.1. Coévolution

Les interactions hôtes-agents infectieux : des interactions dynamiques

Les interactions hôtes-agents infectieux sont le résultat d'évolutions successives qui permettent à un agent biologique de s'adapter à un hôte pour se multiplier et se disperser dans l'organisme en déjouant les mécanismes de défenses de cet hôte (Van Valen 1973; Sironi et al. 2015). Ces adaptations sont la conséquence de variations aléatoires, de mutations génétiques, qui engendrent un certain phénotype chez l'agent infectieux ou l'hôte, et qui en fonction de l'environnement, vont être positivement sélectionnées (Sironi et al. 2015). En biologie évolutive, l'hypothèse de la reine rouge proposée par Van Valen soutient que "l'évolution permanente d'une espèce est nécessaire pour maintenir son aptitude suite aux évolutions des espèces avec lesquelles elle évolue" (Van Valen, 1972). Selon cette hypothèse, les agents infectieux évoluent constamment pour être capables d'infecter un hôte et survivre en palliant à d'éventuelles évolutions de l'hôte contre ces agents infectieux. C'est ce qu'on appelle la course aux armements. Sous la pression de sélection induite par l'agent infectieux, l'hôte va développer de nouveaux moyens pour réduire l'interaction qu'il a avec cet agent infectieux. Il existe ainsi un équilibre dynamique

entre le pouvoir pathogène de l'agent infectieux et les mécanismes de défenses de l'hôte (Sironi et al. 2015).

Processus macro-évolutifs

Dans de nombreuses associations hôtes-pathogènes, on retrouve une congruence (similarité topologique) plus ou moins marquée entre les phylogénies des hôtes et des agents infectieux (Page 2003). Malgré cette congruence reflétant une coévolution plus ou moins grande selon les associations, plusieurs types de mécanismes évolutifs peuvent intervenir successivement (Page, 2003). La comparaison des phylogénies d'hôtes et de leurs agents infectieux permet d'étudier les mécanismes macroévolutifs ayant conduit à ces phylogénies. Selon Page (2003), un agent infectieux peut dépendre successivement de différents mécanismes : soit évoluer conjointement avec son hôte (« cospéciation »), changer d'espèce hôte (« host-switch »), évoluer indépendamment de l'hôte (« duplication »), échouer à coloniser les descendants de l'hôte (« missing the boat »), échouer à évoluer conjointement avec son hôte (« échec de spéciation ») ou s'éteindre (« extinction ») (**Figure 6**, Page 2003). La coévolution est un processus évolutif qui décrit l'évolution conjointe de deux taxons associés dans un même environnement et exerçant une pression de sélection l'un sur l'autre (Ridley 2004). Nous utiliserons le terme co-spéciation pour décrire l'évolution conjointe d'un hôte et d'un agent infectieux écologiquement liés (Page 2003). En effet, ce terme nous permettra ici de décrire la congruence de topologie observée entre la phylogénie d'un hôte et d'un agent infectieux associé, sans présupposer des pressions évolutives qui peuvent influencer l'un sur l'autre. La duplication ou évolution indépendante est un type de co-spéciation où un agent infectieux a évolué de manière indépendante par rapport à l'hôte, tout en demeurant chez l'hôte (Page 2003). Le « host-switch » est défini par une évolution indépendante de l'agent infectieux, entraînant un changement d'hôte et une spéciation chez ce nouvel hôte (Page 2003).

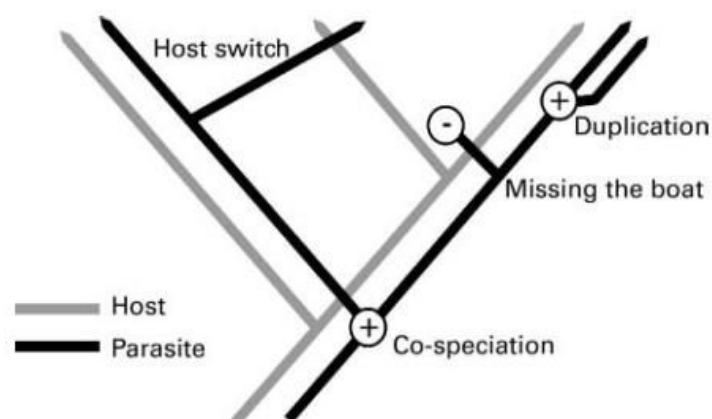


Figure 6. Événements évolutifs les plus courants dans les associations hôtes-agents infectieux (d'après Page et al. 1996).

Par exemple, les hantavirus sont des virus à ARN retrouvés dans une grande diversité d'hôtes (rongeurs, insectivores et chauves-souris). La comparaison d'hantavirus et de leurs hôtes à partir de séquences partielles du gène codant la protéine de surface et à partir de séquences de cytochromes b (gène mitochondrial) ont permis d'explorer les mécanismes évolutifs impliqués dans les associations hôtes-agent infectieux observées (Guo et al. 2013). Le test de cophylogénie a permis de dégager plusieurs mécanismes impliqués dans l'évolution de ces hantavirus, avec de la coévolution entre hôtes et hantavirus pour certains clades. Cependant, ce test a également permis de mettre en évidence plusieurs événements de transmission inter-espèces, inter-genres, inter-familles et même inter ordres (« host-switch ») au cours de l'évolution de ces hantavirus (**Figure 7**).

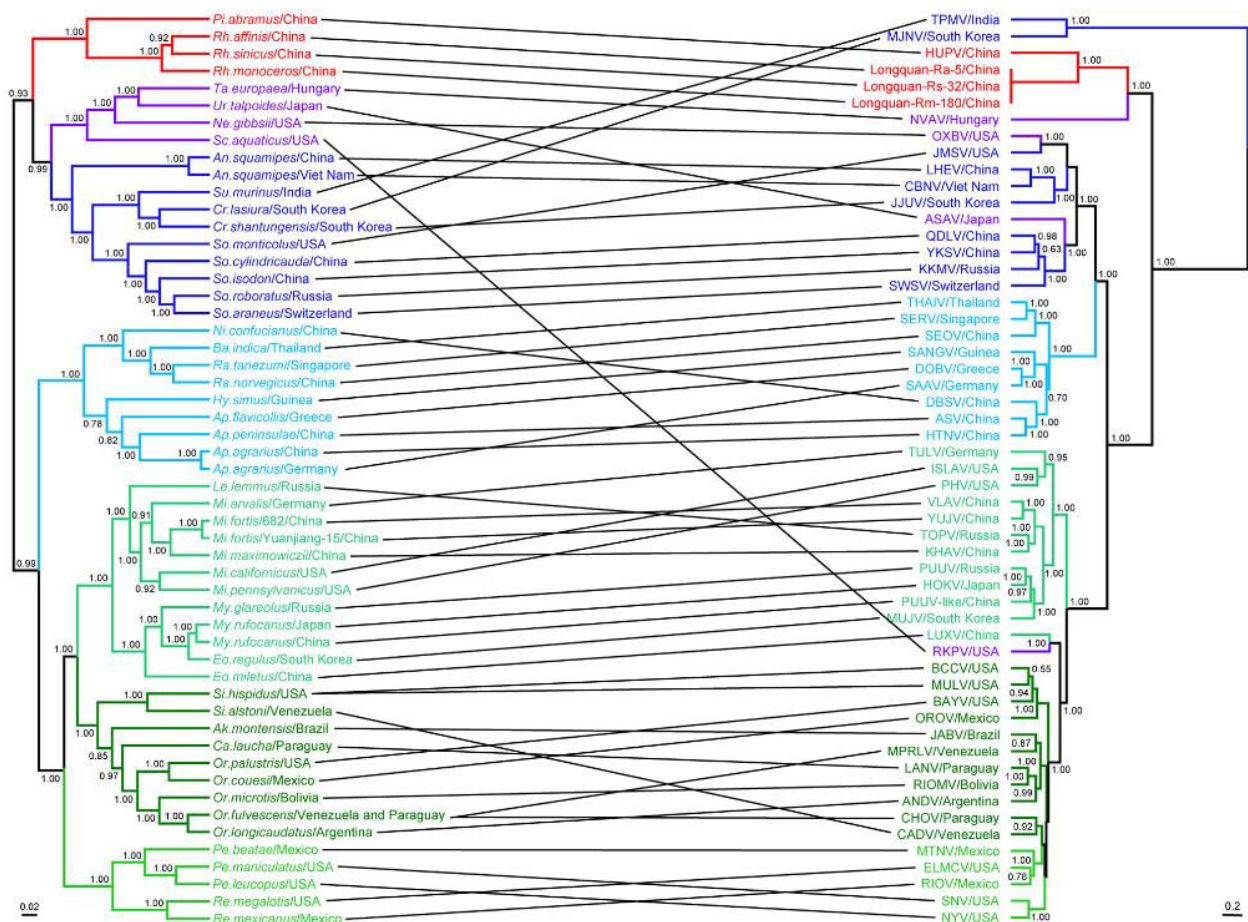


Figure 7. Tanglegram représentant les associations entre hantavirus et leurs hôtes. Chaque couleur correspond à différents taxons hôtes (Guo et al. 2013). En rouge les Chiroptera, en violet les Talpidae, en bleu foncé les Soricidae, en bleu clair les Murinae, en vert différentes sous-familles de Cricetidae.

3.2. Facteurs associés à l'hôte et à l'environnement impliqués dans la dynamique d'infection

Répartition spatiale des réservoirs

La transmission d'agents infectieux peut être influencée par la diversité génétique au sein d'une population hôte, par la diversité spécifique dans les communautés d'hôtes, et par la diversité des communautés (Ostfeld et Keesing 2012). Ainsi, la répartition des hôtes réservoirs ou des vecteurs d'agents infectieux affecte la transmission de ces agents (Loh et al. 2015; Plowright et al. 2017). La modification de la distribution spatiale de ces réservoirs par la modification des écosystèmes (fragmentation des habitats, perte d'habitats, densité des prédateurs) peut entraîner un changement dans la distribution spatiale des agents infectieux (Walsh et al. 1993; Patz et al. 2004; Karesh et al. 2012). Par exemple, la fragmentation des habitats pourrait être associée à une diversification rapide des agents infectieux et à un risque d'émergence de zoonoses issues de la faune sauvage chez l'Homme (Wilkinson et al. 2018; Zohdy et al. 2019). Allan, Keesing et Ostfeld ont étudié l'effet de la fragmentation de l'habitat sur le risque de transmission de la maladie de Lyme (Allan et al. 2003). Pour cela, ils ont analysé les densités de nymphes de tiques *Ixodes* sp. et leurs prévalences d'infection à la bactérie *Borrelia burdoferi* dans 14 patchs forestiers de 0,7 à 7,6 ha. Les prévalences d'infection des tiques étaient dépendantes de la taille des patchs forestiers, avec une augmentation des prévalences d'infection en relation avec la diminution de la taille des patchs. Dans d'autres cas, la fragmentation de l'habitat pourrait au contraire avoir un effet bénéfique pour la stabilité de populations non-infectées. En Australie, certaines populations de koalas (*Phascolarctos cinereus*) sont infectés par la bactérie *Chlamydia pecorum*, pouvant entraîner la cécité, l'infertilité et la mort des individus (Weigler et al. 2013; Augustine et Augustine 2014; Fabijan et al. 2019). Cette maladie est principalement transmise par contact horizontal direct (contacts sexuels ou oculaires) et par transmission verticale maternelle (Blanshard et Bodley 2008; Fabijan et al. 2019). Ainsi, la fragmentation de l'habitat pourrait avoir un effet négatif sur la transmission de la maladie, en formant des zones de quarantaines, limitant ainsi le contact des populations infectées avec des populations non-infectées (McCallum et Dobson 2002; Fabijan et al. 2019).

Abondance des réservoirs

Le changement dans l'abondance des réservoirs peut affecter l'incidence de certaines maladies (Karesh et al. 2012). Au début du XX^{ème} siècle, des épidémies de peste bovine en

Afrique de l'Est ont décimé 90 % des troupeaux de ruminants sauvages dans certaines zones (Headrick 2014). À la même période, des épidémies de trypanosomiase africaine (maladie du sommeil) sont apparues dans les populations humaines (Headrick, 2014). L'hypothèse soutenue est que suite à la perte d'hôtes habituels de la mouche tsé tsé (*Glossina sp.*), vecteur arthropode de trypanosomes (*Trypanosoma sp.*), ces vecteurs se sont tournés vers d'autres hôtes, en l'occurrence l'Homme (Headrick 2014). La perte de biodiversité pourrait donc affecter la dynamique de transmission des zoonoses (Keesing et al. 2010). Des exemples de ce phénomène ont été observés pour plusieurs agents infectieux, hôtes, écosystèmes et modes de transmission, suggérant que ce phénomène n'est pas rare (Clay et al. 2009; Keesing et al. 2010; Johnson et Thielges 2010; Huang et al. 2013). Selon Ostfeld et Keesing, la présence d'une grande diversité d'hôtes dans un écosystème diminuerait le risque de transmission d'un pathogène à un type d'hôte : c'est l'« effet de dilution » (Allan et al. 2003; Keesing et al. 2010; Ostfeld et Keesing 2012). Cependant, l'observation d'un tel effet implique certains critères, dont une faible spécificité d'hôte de la part de l'agent infectieux, ou du vecteur dans le cas d'une maladie vectorielle. Plusieurs études sont en désaccord avec le caractère universel de cette théorie, en argumentant que d'autres facteurs sont à prendre en compte et que, de ce fait, cet effet ne peut pas être décrit comme une règle applicable à la majorité des zoonoses (Randolph et Dobson 2012; Wood et Lafferty 2013; Wood et al. 2014).

Saisonnalité

Les interactions hôtes-agent infectieux sont des interactions dynamiques dépendantes des dynamiques de populations hôtes et des variations saisonnières abiotiques (Altizer et al. 2006). Ainsi, l'analyse de facteurs liés à l'hôte ou à l'environnement permet de décrypter les cycles des agents infectieux en milieu naturel. Les dynamiques d'infection temporelles et spatiales observées pour de nombreux agents infectieux sont liées à des comportements spécifiques en lien avec la biologie d'une espèce (reproduction, gîtes de maternité, dispersion des jeunes, migrations saisonnières) ou à des variations saisonnières de facteurs abiotiques ou climatiques (précipitations, sécheresses, températures, cyclones) (Altizer et al. 2006; Plowright et al. 2008; Plowright et al. 2015). Le roselin familier (*Haemorrhous mexicanus*) est une espèce de passereau qui peut être infecté par la bactérie *Mycoplasma gallisepticum* (Altizer et al. 2004; Hosseini et al. 2004). En 2004, deux études ont pu mettre en évidence d'une part des cycles d'infection semi-annuels et récurrents chez cette espèce, et d'autre part, une influence de la saison de reproduction et de l'agrégation saisonnières expliquant cette dynamique d'infection (Hosseini et al. 2004 ; Altizer et al. 2004).

Les migrations saisonnières sont également reconnues comme un potentiel moteur de dispersion d'agents infectieux (Altizer et al. 2011). Elles peuvent soit diminuer les risques d'infections si l'agent infectieux a un effet sur la physiologie de l'individu, soit permettre de disperser un agent infectieux du point d'origine vers de nouvelles zones géographiques (zones de haltes migratoires ou destinations finales) si peu d'effet sur la physiologie (Altizer et al. 2011). Les oiseaux sauvages représentent les hôtes réservoirs majoritaires pour les virus Influenza A, impliqués dans plusieurs épidémies dans les élevages et les populations humaines (Webster et al. 1992; Yoon et al. 2014). Certaines de ces espèces entreprennent des migrations saisonnières entre hémisphères et favoriseraient ainsi la dispersion de ces virus sur de longues distances (Verhagen et al. 2015). Aux États-Unis, Bahl et al. ont pu mettre en évidence le rôle des migrations de plusieurs espèces aviaires sur la dispersion de sous-types du virus influenza H3 le long d'un axe migratoire est-ouest (**Figure 8**) (Bahl et al. 2013).

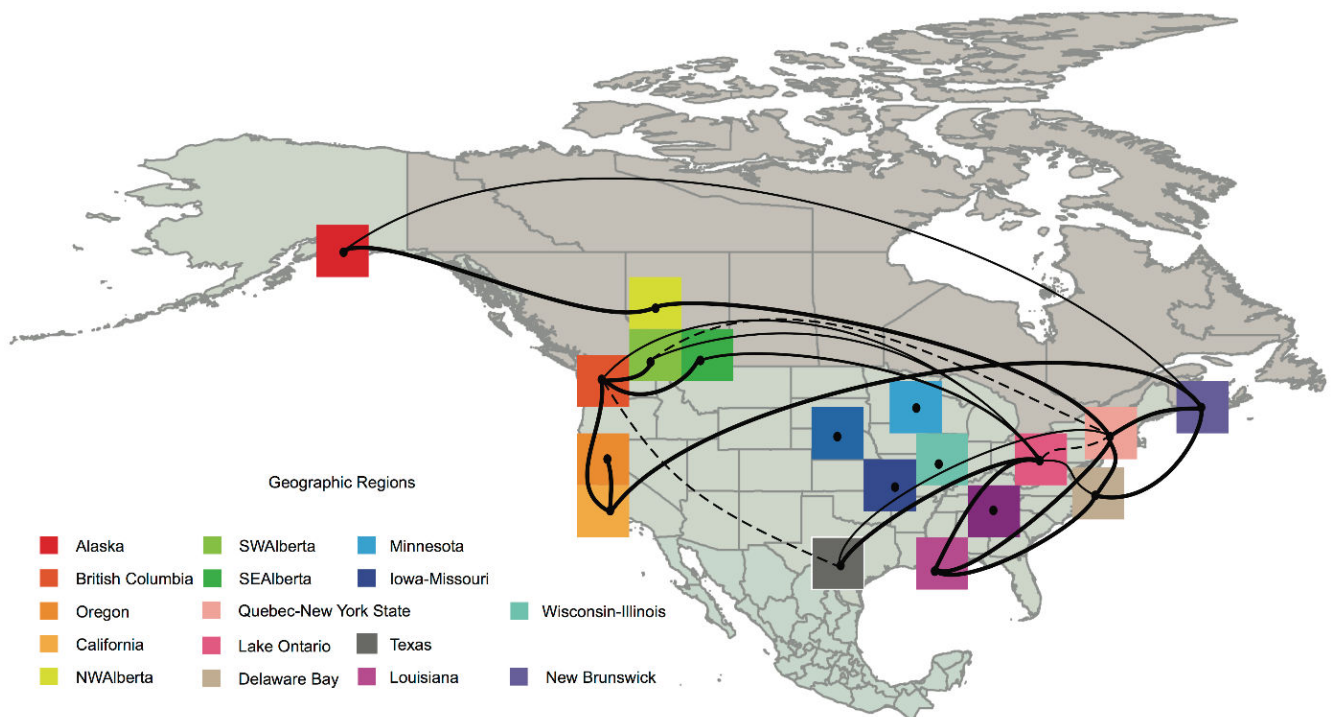


Figure 8. Patron de dispersion de virus Influenza en Amérique du Nord en fonction de différentes voies de migrations aviaires (Bahl et al. 2013). Les lignes représentent les relations entre les flux génétiques supportés et sont épaissies en fonction du support statistique.

4. Objectifs des travaux de thèse

L'**objectif général** de cette thèse est **d'étudier l'écologie et l'évolution des coronavirus dans des populations de chauves-souris de l'ouest de l'Océan Indien**. Dans le **chapitre I**, nous avons dans un premier temps synthétisé les connaissances sur le rôle des chauves-souris en tant que réservoir d'agents biologiques potentiellement infectieux, et sur les risques d'émergence de zoonoses associées. Nous nous sommes intéressés à la diversité des modes de transmissions impliqués dans les zoonoses transmises par les chauves-souris, et nous avons souligné le manque de connaissance pour de nombreux agents infectieux. Nous avons ensuite focalisé notre étude sur les Coronaviridae, famille virale la plus fréquemment détectée chez les chauves-souris, et responsable d'épidémies mortelles dans les populations humaines et animales (animaux d'élevages).

Dans le **chapitre II**, nous nous sommes intéressés à l'évolution des coronavirus de chauves-souris dans un contexte insulaire. La région ouest de l'Océan Indien est une zone propice à l'étude d'agents à potentiel zoonotique chez les chauves-souris. En effet, cette région héberge une grande diversité de chauves-souris, endémiques pour une large majorité. Le contexte insulaire nous permet ainsi d'explorer les différences inter-territoires et l'effet de l'insularité (isolement géographique, endémisme) sur l'évolution de ces virus. Les objectifs étaient d'une part de (i) d'estimer la diversité des coronavirus chez les chauves-souris de cette région, (ii) d'étudier les différents facteurs écologiques qui pouvaient influencer sur les prévalences d'infection et (iii) d'identifier les mécanismes évolutifs impliqués dans les systèmes insulaires.

Enfin, nous avons évalué dans le **chapitre III** l'importance de la prise en considération de facteurs biologiques et écologiques sur la dynamique d'infection de coronavirus dans une population de chauves-souris endémique de La Réunion (*Mormopterus francoismoutoui*). Plusieurs travaux ont mis en évidence l'importance de la structure de la population des espèces de chauves-souris sur les dynamiques d'infection, et particulièrement en saison de reproduction et de maternité. Basé sur une étude longitudinale à fine échelle réalisée sur deux années consécutives, les objectifs de notre étude étaient d'estimer les prévalences d'infections pendant la saison de maternité et (ii) d'explorer la persistance de l'ARN de CoVs dans l'environnement pendant et hors saison de maternité.

Chapitre I : Chauves-souris et zoonoses

I.1. Rôle des chauves-souris comme réservoir

I.1.1. Généralités

Les chauves-souris sont les réservoirs d'une grande diversité d'agents biologiques, infectieux ou non (Calisher et al. 2006; Luis et al. 2013; Olival et al. 2017). Dans l'**annexe 1**, nous avons réalisé une synthèse des agents biologiques identifiés chez les chauves-souris, sur la base de deux études et de la base de donnée DBatVir (Mühldorfer 2013; Warrell 2013; Chen et al. 2014). Les chauves-souris abritent le plus grand nombre de virus zoonotiques chez les mammifères, devant les rongeurs (Luis et al. 2013; Olival et al. 2017). Plus de 200 virus appartenant à plus de 27 familles virales différentes (Moratelli et Calisher 2015) ont été détectés ou isolés à partir des chauves-souris, et certains sont responsables de maladies sévères chez l'Homme (Li et al. 2005; Calisher et al. 2006; Wynne et Wang 2013). Des virus respiratoires originaires des chauves-souris comme le Syndrome Respiratoire Aigu Sévère (SRAS) et le « Middle East Respiratory Syndrome » (MERS) ont émergé en Asie et au Moyen-Orient, et infectés plus de 8000 et 2000 personnes respectivement, avec un taux de létalité de 10 à 30% (Organisation Mondiale de la Santé 2003; Organisation Mondiale de la Santé 2019b). Le virus Ebola a infecté plus de 28 000 personnes en Guinée, Sierra Léone et Libéria entre 2014 et 2016 avec un taux de létalité moyen de 50% (Organisation Mondiale de la Santé 2019c). Cependant, bien que de nombreuses études aient spéculé sur le rôle des chauves-souris comme réservoir du virus Ebola responsable d'épidémies chez l'Homme, aucune preuve de leur implication dans la transmission directe à l'Homme n'a encore pu être établie à ce jour (Caron et al. 2018).

Entre 2007 et 2013, plus de 44 000 chauves-souris appartenant à 17 familles, 110 genres et 340 espèces, ont été échantillonnées et testées pour la présence d'agents infectieux (Young et Olival 2016). Malgré le nombre croissant d'études sur la détection d'agents infectieux dans les chauves-souris ces dernières décennies, seuls 25% de la diversité taxonomique de ces hôtes ont été explorés, représentant ainsi un biais considérable dans l'évaluation de la diversité virale (Young et Olival 2016). En effet, de nombreuses études suggèrent que les caractéristiques biologiques et écologiques des chauves-souris favoriseraient leur capacité à héberger des agents infectieux, en comparaison d'autres taxons (Coleman et Frieman 2013; Dobson 2013; Anthony et al. 2017a). Au-delà de la détection et la description des agents infectieux de chauves-souris, l'étude des facteurs et des processus écologiques impliqués dans la transmission est incontournable si l'on souhaite anticiper les événements d'émergence dans les populations humaines (Plowright et al. 2016).

I.1.2. Caractéristiques des hôtes

Diversité écologique

Les chauves-souris représentent 20 % des espèces de mammifères (Kunz 1982) avec plus de 1400 espèces décrites (American Society of Mammalogist 2019), réparties sur tous les continents à l'exception de l'Antarctique (Kunz 1982). Ainsi, l'ordre Chiroptera constitue le deuxième ordre des mammifères le plus important en termes de diversité d'espèces (après l'ordre Rodentia) et serait apparu il y a environ 64 millions d'années (Teeling 2005). La distribution très large ainsi que la diversité de leur régime alimentaire (insectivore, sanguinivore, frugivore, nectarivore, piscivore) permet aux chauves-souris d'occuper de nombreuses niches écologiques à travers le monde (Kunz et Lumsden 2006). Les chauves-souris exploitent des gîtes variés comme des grottes, des fissures dans la roche, des cavités d'arbres, mais également des structures synanthropiques (*i.e.* constructions humaines) telles que des maisons, des églises ou des ponts (Lamb et al. 2011). Certains de ces habitats (grottes, bâtiments) pourraient protéger les agents infectieux des précipitations, des fortes températures, des variations d'humidité et des rayons ultra-violet, facilitant ainsi leur maintien et leur transmission au sein des colonies (Fogarty et al. 2008; Chan et al. 2011; Willoughby et al. 2017).

Taille, reproduction et espérance de vie

Chez de nombreux petits mammifères la maturité sexuelle est précoce, le nombre de descendants produits à chaque portée est élevé, et la longévité faible (Promislow et Harvey 1990). Le rat noir (*Rattus rattus*), par exemple, est sexuellement mature dès trois mois, produit plus de cinq portées par an de 6 à 12 ratons, et possède une longévité d'environ un an (Nowak 1999). Ces traits d'histoire de vie sont très différents chez la plupart des espèces de chauves-souris, même chez les plus petites espèces (Kunz 1982). Par exemple, chez la chauve-souris grise (*Myotis grisescens*), la maturité sexuelle des femelles n'apparaît qu'entre 2 et 3 ans, elle produit un seul petit par an, et a une longévité de 15 ans (Harriman 2003). La longévité surprenante de ces animaux pourrait être due à leur écologie et à la capacité des chauves-souris à voler par rapport aux autres mammifères, puisque des espérances de vies similaires peuvent être également observées chez les oiseaux (Healy et al. 2014). D'autre part, l'écologie de ces espèces (vie nocturne et gîtes abrités) jouerait un rôle dans la diminution des risques de prédation et donc dans l'augmentation de l'espérance de vie (Healy et al. 2014). Cependant, d'autres facteurs physiologiques et moléculaires doivent également être pris en compte. Une

étude récente a montré que la vitesse de raccourcissement des télomères des chromosomes du Grand Murin *Myotis myotis* (espérance de vie de 30 ans) est inférieure à celle de la plupart des mammifères (Foley et al. 2018). Ce phénomène ne serait pas dû à une augmentation de la synthèse de la télomérase (enzyme permettant de stabiliser la longueur des chromosomes lors de la réplication de l'ADN chez les eucaryotes) mais résulterait de l'activation de certains gènes impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN (Foley et al. 2018).

Vol actif, migration et infection

Les chauves-souris sont les seuls mammifères capables de réaliser un vol actif. Cette particularité pourrait être associée à leur tolérance à de multiples infections virales (O'Shea et al. 2014). Au niveau physiologique, l'utilisation du vol dans un cycle journalier notamment pour rejoindre les sites d'alimentation, augmenterait le métabolisme et la température corporelle des individus à un niveau semblable à celui d'autres mammifères, lors d'une réponse immunitaire accompagnée de fièvre ; on parle alors de l'hypothèse « flight as fever » (O'Shea et al. 2014). La mise en place du vol actif permettrait aux chauves-souris d'atteindre une température corporelle entre 38°C et 41°C ce qui stimulerait certains mécanismes immunitaires (amélioration de la phagocytose, augmentation de la production d'anticorps, etc.) (O'Shea et al. 2014).

De plus, la migration est un facteur qui peut augmenter la dispersion des agents infectieux dans le monde animal et ainsi favoriser la transmission à d'autres espèces susceptibles (Kruse et al. 2004; Altizer et al. 2011). Ces migrations peuvent survenir de manière saisonnière durant le cycle de vie de l'animal (reproduction) ou de manière épisodique pour fuir un environnement perturbé (perte des sources d'alimentations, des habitats), induit ou non par l'activité humaine (Altizer et al. 2011; Hayman et al. 2013; O'Shea et al. 2014; Plowright et al. 2015). Lors de la migration, les ressources énergétiques sont redistribuées en faveur des organes locomoteurs au dépend du système immunitaire (O'Shea et al. 2014; Allocati et al. 2016). Certaines espèces de chauves-souris peuvent effectuer des migrations de plusieurs centaines de kilomètres en quelques mois (Richter et Cumming 2008; Roberts et al. 2012), pouvant alors disperser des agents infectieux sur de très longues distances et potentiellement le transmettre à de nouvelles populations hôtes. Par exemple, une étude portant sur les migrations des chauves-souris frugivores (*Eidolon helvum*) en Zambie a montré qu'elles étaient capables de parcourir

plus de 2000 km en 3 mois, soulignant ainsi un rôle potentiel dans la dispersion d'agents infectieux sur de longues distances (Richter et Cumming 2008).

Système immunitaire

En dépit de leur capacité à héberger une grande diversité d'agent biologiques (virus, bactéries, champignons), les chauves-souris semblent dans la majorité des cas ne pas présenter de symptômes d'infection (Amman et al. 2015; Schuh et al. 2017). La résistance ou tolérance des chauves-souris à de nombreux agents biologiques a longtemps été basée sur l'hypothèse « flight as fever » mentionnée précédemment et qui stimulerait certains mécanismes immunitaires (O'Shea et al. 2014; Brook et Dobson 2015). Cependant, cette hypothèse est de plus en plus remise en question au vu des expérimentations et de l'avancée des connaissances sur le système immunitaire des chauves-souris (Ahn et al. 2016; Miller et al. 2016; Ahn et al. 2019; Subudhi et al. 2019). Miller et ses collaborateurs ont notamment mis en évidence que la température ne semblait pas avoir d'effet sur la réplication virale de deux Filovirus, *in vitro* (Miller et al. 2016). Ces résultats laissent suggérer que ce n'est pas l'augmentation de la température corporelle pendant le vol qui permettrait aux chauves-souris de limiter l'infection par des agents infectieux (Miller et al. 2016; Subudhi et al. 2019).

L'une des hypothèses de la capacité des chauves-souris à résister à des effets pathogènes d'infections virales serait liée à un contrôle de la réplication virale tôt dans la réponse immunitaire, induite par des mécanismes antiviraux du système immunitaire inné (Papenfuss et al. 2012; Kuzmin et al. 2017; Subudhi et al. 2019). Une analyse du génome du renard volant noir (*Pteropus alecto*) a pu mettre en évidence que cette espèce possède et exprime une grande partie des gènes liés classiquement aux immunités innées et acquises chez les mammifères (Papenfuss et al. 2012). Les interférons (IFNs) sont des protéines majoritairement secrétées par les cellules du système immunitaire lors d'une infection virale, et vont interférer avec la réplication virale par différents mécanismes (Pestka et al. 2004). Il existe 2 grands types d'interférons ; le type I est divisé en 7 classes (IFN- α , IFN- β , IFN- δ , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- τ , IFN- ω) et le type II contient uniquement les IFN- γ (Pestka et al. 2004). La réponse des interférons est un composant clef du système immunitaire inné (Pestka et al. 2004). Chez les chauves-souris, il existerait des mécanismes immunitaires particuliers de la réponse des interférons et de la réponse inflammatoire induites par une infection en comparaison à d'autres vertébrés (Schountz 2014; Zhou et al. 2016; Pavlovich et al. 2018; Ahn et al. 2019; Subudhi et al. 2019). Chez *Pteropus alecto* par exemple, les interférons IFNs- α seraient exprimées à un niveau basal

plus important que chez d'autres vertébrés (porc, vache, cheval, homme, souris, éléphant), suggérant ainsi que les gènes codants pour les interférons seraient exprimés de façon permanente chez cette espèce (Zhou et al. 2016).

Colonies, comportement grégaire et transmission

Les animaux sociaux, majoritairement grégaires, peuvent former des colonies de tailles importantes parfois constituées de plusieurs espèces. Au nouveau Mexique, les colonies de *Tadarida brasiliensis* peuvent dépasser 700 000 individus dans la même grotte (Hristov et al. 2010). En Turquie, la grotte Koyunbaba abrite une colonie de maternité qui peut regrouper 23 000 chauves-souris appartenant à 11 espèces différentes (Paksuz 2017). Bien que rencontré chez d'autres mammifères, il semblerait que l'effet de la sympatrie (*i.e.* coexistence de plusieurs espèces dans un même habitat) sur la transmission virale chez les chiroptères soit 3,9 fois plus important que chez les rongeurs, autre grand groupe réservoir de virus zoonotiques (Luis et al. 2013). Ces regroupements mono- et pluri-spécifiques favoriseraient ainsi la transmission horizontale des virus, intra- et inter-spécifiques, et leur maintien dans les communautés (Luis et al. 2013). Des transmissions verticales sont également possibles; Williamson et collaborateurs ont infecté expérimentalement des femelles de cochons d'Inde et de chauves-souris gestantes par le virus Hendra et ont pu détecter par sérologie des anticorps dirigés contre ce dernier dans les organes de la mère (poumons, reins, rate, cerveau) ainsi que dans le placenta et les tissus de certains fœtus (Williamson et al. 2000). Mungall et collaborateurs ont inoculé le virus Nipah à des chattes gestantes et ont ensuite détecté par RT-PCR le génome viral dans leurs tissus y compris le placenta, suggérant la possibilité d'une transmission verticale chez les chauves-souris (Dimitrov et Wang 2007; Mungall et al. 2007). Les zones de regroupement avec de grandes populations, comme les colonies de mise-bas, pourraient ainsi favoriser la transmission virale au sein des populations par des transmissions verticales et horizontales, mais aussi entre espèces vivant dans le même environnement.

I.1.3. Article 1: Bat pathogens hit the road: but which one ?

Bien que les chauves-souris soient reconnues comme des hôtes majeurs d'une grande diversité d'agent infectieux, de nombreuses interrogations persistent quant aux modes de transmission à d'autres hôtes, dont l'Homme. L'étude des modes de transmission est donc

déterminante pour comprendre et identifier les facteurs impliqués dans l'épidémiologie des agents infectieux hébergés et d'appréhender de futurs risques de changements d'hôtes (Loh et al. 2015; Plowright et al. 2015; Plowright et al. 2016; Wang et Anderson 2019). Dans la publication suivante (Joffrin et al. 2018), nous avons synthétisé les connaissances sur ces aspects. Nous soulignons le rôle des voies de transmission indirectes (par l'intermédiaire de vecteur arthropodes et de l'environnement), peu étudiées jusqu'à aujourd'hui. Nous insistons sur l'importance d'une évaluation précise de la diversité des voies de transmission impliquées dans l'épidémiologie des agents infectieux portés par les chauves-souris afin d'obtenir des informations exploitables pour le développement de mesures de biosécurité.

PEARLS

Bat pathogens hit the road: But which one?

Léa Joffrin*, Muriel Dietrich, Patrick Mavingui, Camille Lebarbenchon

Université de La Réunion, Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, INSERM 1187, CNRS 9192, IRD 249, Saint Denis, Réunion Island, France

* lea.joffrin@univ-reunion.fr

Current evidence suggests that environmental changes and interactions between wildlife, livestock, and humans contribute to the spillover of infectious agents from bats to other hosts [1]. An increasing number of studies investigating the diversity and infection dynamics of bat pathogens has recently been published; however, how these infectious agents are transmitted both within bat populations and to other hosts, including humans, often remains unknown. Here, we summarize current knowledge on direct and indirect transmission routes of bat infectious agents of public health concern (Fig 1). Although bats are recognized as major reservoir hosts of emerging infectious diseases, we highlight that a significant knowledge gap on transmission mechanisms remains and needs further exploration.

Bat bites: The exception rather than the rule?

Although bat bites may be the main transmission route coming to mind, pathogen transmission involving bat bites has been documented mostly for rabies virus (Rhabdoviridae). The common vampire bat (*Desmodus rotundus*) can, for instance, naturally transmit rabies to other species when biting to feed on blood, particularly to livestock and sometimes to humans [2]. *Mycoplasma* has also been detected in common vampire bat blood and saliva and might be transmitted between bats, for instance, during aggressive behaviors [3]. Obligate blood-feeding bats are, however, restricted to Central and South America and represent only a very small proportion of the bat species diversity (<0.005%; 3/1,200). Most bat species do not naturally bite humans unless intentional contacts occur (e.g., veterinarian and field biologists involved in bat capture and handling, people trying to remove bats from houses).

Contact with bat body fluids (saliva, urine, and feces) is increasingly recognized as an important mechanism of pathogen spillover to humans. Human encroachment into bat habitats as well as increasing urbanization, which facilitates bat roosting in artificial structures, are likely to increase contact with bat body fluids. For example, Nipah virus (Paramyxoviridae) human infection cases reported in Bangladesh were associated with the consumption of raw sap from date palm trees contaminated with fruit bat saliva and urine [4]. In the case of Marburg virus (Filoviridae), experimental studies indicate that bat-to-bat transmission may occur via saliva and aerosols, suggesting that the virus may be transmitted to other hosts by a similar mechanism [5,6]. This hypothesis is supported by investigations revealing that most humans infected with Marburg virus had entered bat (*Rousettus aegyptiacus*) caves before becoming sick and reported regular contacts with bats or their secretions [7].

Hunting, preparation, and consumption of bats as bushmeat have also been pointed out as a potential source of infection, especially for Ebola virus. For instance, the putative first human case of the 2007 Ebola outbreak in the Democratic Republic of Congo would have bought freshly killed bats for consumption [8]. The fruit bat *Eidolon helvum*, which is the most frequently hunted and traded bat species in many African countries (e.g., more than 120,000 *E. helvum* are sold yearly in markets in Ghana [9]), has been shown to be infected with Henipa-



OPENACCESS

Citation : Joffrin L, Dietrich M, Mavingui P, Lebarbenchon C (2018) Bat pathogens hit the road: But which one? PLoS Pathog 14(8): e1007134. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007134>

Editor: Rebecca Ellis Dutch, University of Kentucky, UNITED STATES

Published: August 9, 2018

Copyright: © 2018 Joffrin 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.

Funding: LJ is supported by a "Région Réunion, European Regional Development Funds (FEDER 2014-2020)" PhD fellowship, and CL by a "chaire mixte Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)—Université de La Réunion." 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.

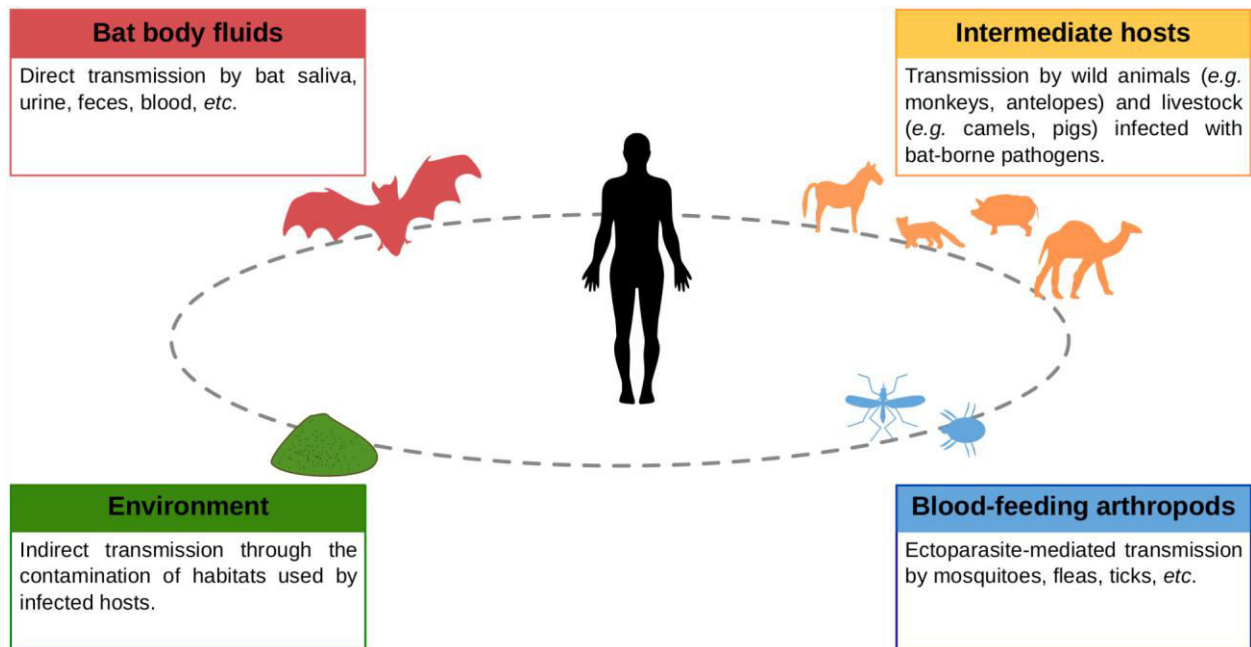


Fig 1. Possible transmission routes of bat-borne pathogens to humans.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007134.g001>

related viruses. This highlights the substantial exposure of local hunters and consumers to viruses of potential zoonotic importance [10].

Can other animals transmit bat-borne pathogens?

Infection of wild animals such as apes, monkeys, and antelopes with bat-borne infectious agents may also play a role in the transmission chain to humans, such as for Ebola virus [11]. In the case of the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus, civets (*Paguma larvata*) got infected with a virus circulating in horseshoe bats (*Rhinolophus* sp.) and would have then acted as an intermediate amplifying host [12]. Natural bat predation by other animals (e.g., monkeys, domestic cats) and its consequences on infectious agents transmission are poorly documented [13,14] but could also favor spillover opportunities to other hosts.

In addition to wild animals, the role of livestock as intermediate and amplifying hosts between wild animals and humans has been clearly demonstrated in several outbreaks, such as for Filovirus and Henipavirus [15,16]. Indeed, in Malaysia, the growth of commercial pig farms with fruit trees on the farm has created an environment where bats could drop partially eaten fruits contaminated with Nipah virus into pig stalls [4,17].

In contrast to rapid and short-time spillover events, long-time and silent circulation of viruses in livestock before transmission to humans may also occur, as is strongly suspected for the ongoing outbreak of Middle East respiratory syndrome (MERS). Although bats are likely to be a source of MERS-like coronaviruses, dromedary camels (*Camelus dromedaries*) act as the natural reservoir host in which the MERS coronavirus could have circulated for more than 30 years before its first detection in humans [18]. Other animals such as llamas (*Lama glama*) and wild boars (*Sus scrofa*) have shown susceptibility to MERS coronavirus infection [19], suggesting a large host species range. The endemic human coronavirus 229E may also constitute a descendant of camelid-associated viruses [20] and further supports that livestock plays a key role in the long-time establishment of bat-borne viruses in humans.

Are blood-feeding arthropods involved in bat-borne pathogen transmission?

A large diversity of arthropods, such as mosquitoes, mites, flies, fleas, and ticks [21], can be found in habitats occupied by bats, particularly in cave systems. Some bat ectoparasites (e.g., fleas and ticks) might incidentally bite humans [22], but ectoparasite-mediated transmission of bat-borne infectious agents to humans is difficult to demonstrate and has rather been speculated, such as for the transmission of Ebola virus [23]. Nevertheless, the presence of the bacterium *Bartonella mayotimonensis*, the etiologic agent of endocarditis in humans, both in bat blood and fleas, suggests that transmission to humans by flea bites or their fecal droppings may occur [24]. With the advance of metagenomic technologies, a large diversity of potentially zoonotic bacteria (e.g., *Rickettsia*, *Bartonella* [25]) have been described in bat ectoparasites, but such investigations remain scarce for other infectious agents, such as haemosporidian parasites and viruses [26]. Dengue virus (DENV) was recently detected simultaneously in bat flies (Streblidae) and in their host (*Desmodus rotundus*), although DENV transmission from bat flies to humans has never been reported [27]. To date, the role of blood-feeding arthropods in pathogen spillover to humans therefore remains highly speculative.

Does environmental transmission occur?

Environmental transmission or indirect transmission through the contamination of habitats used by infected hosts has been described as a major mechanism in the epidemiology of wildlife diseases. For bat infectious agents, a limited number of experimental and field studies have been performed to assess their persistence in the environment. Henipaviruses can persist in liquids and on solid surfaces for several days under laboratory conditions and filoviruses for several weeks [28,29]. Bat-borne *Leptospira* could be a source of contamination to other hosts, as this bacterial genus is known to persist in moist environments [30]. Transmission may also occur by bat guano (i.e., accumulation of bat excrement in the environment). Indeed, guano from cave-dwelling bats is commonly used in agriculture as fertilizer worldwide [31]. Reports of human infection with bat guano are usually restricted to histoplasmosis, also known as “cave disease,” a lung infection caused by a fungus (*Histoplasma capsulatum*). The detection of coronavirus RNA in bat guano has been demonstrated [32], although there was no evidence of long-time maintenance of infectious viral particles by virus isolation. Longitudinal sampling of environmental material (water, guano, and soil) exposed to bat secretions for the detection, quantification, and isolation of infectious agents is needed to better assess the risk associated with this transmission route.

What can we learn from bat-to-bat transmission?

Transmission of infectious agents is highly dynamic in bats and is associated with significant changes in bat population structure (e.g., birth pulse in maternity colonies) [1]. Periods of high prevalence of infected bats with Hendra and Marburg viruses have been shown to coincide with the timing of infectious agent spillover to other hosts [1,33]. Although several studies have focused on these aspects, a precise assessment of the diversity of transmission routes involved in disease epidemiology in bats is still lacking, especially when considering the extreme diversity of bat species and associated ecological and biological features. Such information is not only relevant from a fundamental perspective but can provide major information for the development of biosafety measures, therefore limiting emergence risk.

Although communication and education on the risk associated with bat-borne pathogens has increased over the past decade, the benefits of bats in ecosystem functions (e.g., pollination,

soil fertilization, and crops pest control) tend to be disregarded [34]. Gaining knowledge on disease epidemiology and bat ecology is critical to fully assess the challenges associated with human health and bat conservation. In this context, implementation of One Health approaches seems essential and beneficial for a sustainable development, particularly for populations living in hotspots of bat-borne disease emergence [35].

Acknowledgments

We thank the three anonymous reviewers for their careful reading, insightful comments, and suggestions on the previous version of the manuscript.

References

1. 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.* 2015; 282: 20142124.
2. Streicker DG, Allgeier JE. Foraging choices of vampire bats in diverse landscapes: potential implications for land-use change and disease transmission. *J Appl Ecol.* 2016; 53: 1280–1288. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12690> PMID: 27499553
3. Volokhov D V, Becker DJ, Bergner LM, Camus MS, Orton RJ, Chizhikov VE, et al. Novel hemotropic mycoplasmas are widespread and genetically diverse in vampire bats. *Epidemiol Infect.* 2017; 145: 3154–67. <https://doi.org/10.1017/S095026881700231X> PMID: 29061202
4. Luby S, Rahman M, Hossain M, Blum L, Husain M, Gurley E, et al. Foodborne transmission of Nipah virus, Bangladesh. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 1888–1894. <https://doi.org/10.3201/eid1212.060732> PMID: 17326940
5. Amman BR, Jones ME, Sealy TK, Uebelhoer LS, Schuh AJ, Bird BH, et al. Oral shedding of Marburg virus in experimentally infected Egyptian fruit bats (*Rousettus aegyptiacus*). *J Wildl Dis.* 2015; 51: 113–124. <https://doi.org/10.7589/2014-08-198> PMID: 25375951
6. Schuh AJ, Amman BR, Sealy TK, Spengler JR, Nichol ST, Towner JS. Egyptian rousette bats maintain long-term protective immunity against Marburg virus infection despite diminished antibody levels. *Sci Rep.* 2017; 7: 8763. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07824-2> PMID: 28821722
7. Adjemian J, Farnon EC, Tschioke F, Wamala JF, Byaruhanga E, Bwire GS, et al. Outbreak of Marburg hemorrhagic fever among miners in Kamwenge and Ibanda districts, Uganda, 2007. *J Infect Dis.* 2011; 204: S796–S799. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir312> PMID: 21987753
8. Leroy EM, Epelboin A, Mondonge V, Pourrut X, Gonzalez J-P, Muyembe-Tamfum J-J, et al. Human Ebola outbreak resulting from direct exposure to fruit bats in Luebo, Democratic Republic of Congo, 2007. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2009; 9: 723–728. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0167> PMID: 19323614
9. Kamins AO, Restif O, Ntiamao-Baidu Y, Suu-Ire R, Hayman DTS, Cunningham AA, et al. Uncovering the fruit bat bushmeat commodity chain and the true extent of fruit bat hunting in Ghana, West Africa. *Biol Conserv.* 2011; 144: 3000–3008. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2011.09.003> PMID: 22514356
10. Weiss S, Nowak K, Fahr J, Wibbelt G, Mombouli J-V, Parra H-J, et al. Henipavirus-related sequences in fruit bat bushmeat, Republic of Congo. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18: 1536–1537. <https://doi.org/10.3201/eid1809.111607> PMID: 22935105
11. Leroy EM, Rouquet P, Formenty P, Souquière S, Kilbourne A, Froment J-M, et al. Multiple Ebola virus transmission events and rapid decline of central African wildlife. *Science.* 2004; 303: 387–390. <https://doi.org/10.1126/science.1092528> PMID: 14726594
12. Hu B, Zeng L, Yang X, Ge X, Zhang W, Li B, et al. Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus. *PLoS Pathog.* 2017; 13: e1006698. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006698> PMID: 29190287
13. Tapanes E, Detwiler KM, Cords M. Bat predation by Cercopithecus monkeys: implications for zoonotic disease transmission. *Ecohealth.* 2016; 13: 405–409. <https://doi.org/10.1007/s10393-016-1121-0> PMID: 27138290
14. Delpietro H, Konolsaisen F, Marchevsky N, Russo G. Domestic cat predation on vampire bats (*Desmodus rotundus*) while foraging on goats, pigs, cows and human beings. *Appl Anim Behav Sci.* 1994; 39:141–150.
15. Glennon EE, Restif O, Sbarbaro SR, Garnier R, Cunningham AA, Suu-Ire RD, et al. Domesticated animals as hosts of henipaviruses and filoviruses: A systematic review. *Vet J.* 2018; 233: 25–34 <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.12.024> PMID: 29486875
16. Field H, Young P, Yob JM, Mills J, Hall L, Mackenzie J. The natural history of Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect.* 2011; 3: 307–314.

17. Pulliam JRC, Epstein JH, Dushoff J, Rahman SA, Bunning M, Jamaluddin AA, et al. Agricultural intensification, priming for persistence and the emergence of Nipah virus: a lethal bat-borne zoonosis. *J. R. Soc. Interface*. 2012; 9: 89–101. <https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0223> PMID: [21632614](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21632614/)
18. Müller MA, Corman VM, Jores J, Meyer B, Younan M, Lijander A, et al. MERS Coronavirus neutralizing antibodies in camels, Eastern Africa, 1983–1997. *Emerg Infect Dis*. 2014; 20: 2093–2095. <https://doi.org/10.3201/eid2012.141026> PMID: [25425139](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25425139/)
19. Vergara-Alert J, van den Brand JMA, Widagdo W, Muñoz M, Raj S, Schipper D, et al. Livestock susceptibility to infection with Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *Emerg Infect Dis*. 2017; 23: 232–240. <https://doi.org/10.3201/eid2302.161239> PMID: [27901465](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27901465/)
20. Corman VM, Eckerle I, Memish ZA, Lijander AM, Dijkman R, Jonsdottir H, et al. Link of a ubiquitous human coronavirus to dromedary camels. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016; 113: 9864–9869. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604472113> PMID: [27528677](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27528677/)
21. Obame-Nkoghe J, Leroy E-M, Paupy C. Diversity and role of cave-dwelling hematophagous insects in pathogen transmission in the Afrotropical region. *Emerg Microbes Infect*. 2017; 6: e20. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.6> PMID: [28400590](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28400590/)
22. Dick CW, Patterson BD. Bat flies—obligate ectoparasites of bats. In: Morand S, Krasnov BR, Poulin R, editors. *Micromammals and macroparasites: from evolutionary ecology to management*. Springer; 2006. pp. 179–194.
23. Monath T.P. Ecology of Marburg and Ebola viruses: speculations and directions for future research. *J Infect Dis*. 1999; 179(Suppl 1): S127–38.
24. Veikkolainen V, Vesterinen EJ, Lilley TM, Pulliainen AT. Bats as reservoir hosts of human bacterial pathogen, *Bartonella mayotimonensis*. *Emerg Infect Dis*. 2014; 20: 960–967. <https://doi.org/10.3201/eid2006.130956> PMID: [24856523](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24856523/)
25. Wilkinson DA, Duron O, Cordonin C, Gomard Y, Ramasindrazana B, Mavingui P, et al. The Bacteriome of Bat Flies (Nycteribiidae) from the Malagasy region: a community shaped by host ecology, bacterial transmission mode, and host-vector specificity. *Appl Environ Microbiol*. 2016; 82: 1778–1788. <https://doi.org/10.1128/AEM.03505-15> PMID: [26746715](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26746715/)
26. Goldberg TL, Bennett AJ, Kityo R, Kuhn JH, Chapman CA. Kanyawara Virus: A novel Rhabdovirus infecting newly discovered Nycteribiid bat flies infesting previously unknown Pteropodid bats in Uganda. *Sci Rep*. 2017; 7: 5287. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05236-w> PMID: [28706276](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28706276/)
27. Abundes-Gallegos J, Salas-Rojas M, Galvez-Romero G, Perea-Martínez L, Obregón-Morales CY, Morales-Malacara JB, et al. Detection of Dengue virus in bat flies (Diptera: Streblidae) of common vampire bats, *Desmodus rotundus*, in Progreso, Hidalgo, Mexico. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2018; 18: 70–73. <https://doi.org/10.1089/vbz.2017.2163> PMID: [29232534](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29232534/)
28. Piercy TJ, Smither SJ, Steward JA, Eastaugh L, Lever MS. The survival of filoviruses in liquids, on solid substrates and in a dynamic aerosol. *J Appl Microbiol*. 2010; 109: 1531–1539. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04778.x> PMID: [20553340](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20553340/)
29. Fogarty R, Halpin K, Hyatt AD, Daszak P, Mungall BA. Henipavirus susceptibility to environmental variables. *Virus Res*. 2008; 132: 140–144. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.11.010> PMID: [18166242](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18166242/)
30. Thibeaux R, Gerout S, Benezech C, Chabaud S, Soupé-Gilbert M-E, Girault D, et al. Seeking the environmental source of Leptospirosis reveals durable bacterial viability in river soils. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11: e0005414. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005414> PMID: [28241042](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28241042/)
31. Mildenstein T. and De Jong C. (2011). Natural history, ecological and socio-economic value of bats. In: FAO. *Investigating the role of bats in emerging zoonoses: Balancing ecology, conservation and public health interests*. Newman SH, Field HE, de Jong CE, Epstein JH, editors. Vol. 12, FAO Animal Production and Health Manual n°12. Rome, Italy; 2011. p 63.
32. Wacharapluesadee S, Sintunawa C, Kaewpom T, Khongnomnan K, Olival KJ, Epstein JH, et al. Group C Betacoronavirus in bat guano fertilizer, Thailand. *Emerg Infect Dis*. 2013; 13: 1349–1351.
33. Amman BR, Carroll SA, Reed ZD, Sealy TK, Balinandi S, Swanepoel R, et al. Seasonal pulses of Marburg virus circulation in juvenile *Rousettus aegyptiacus* bats coincide with periods of increased risk of human infection. *PLoS Pathog*. 2012; 8: e1002877. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002877> PMID: [23055920](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23055920/)
34. López-Baucells A, Rocha R, Fernández-Llamazares A. When bats go viral: negative framings in virological research imperil bat conservation. *Mamm Rev*. 2018; 48: 62–66.
35. Wood JLN, Leach M, Waldman L, MacGregor H, Fooks AR, Jones KE, et al. A framework for the study of zoonotic disease emergence and its drivers: spillover of bat pathogens as a case study. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2012; 367: 2881–92.

I.2. Coronavirus chez les chauves-souris

Les coronavirus représentent 35% des virus identifiés chez les chauves-souris (Chen et al. 2014) (**Figure 9**). La famille des Coronaviridae est ainsi la famille virale la plus fréquemment détectée chez les chauves-souris, devant les Rhabdoviridae (*e.g.* lyssavirus responsables de la rage) et les Paramyxoviridae (*e.g.* virus Hendra et Nipah) (Chen et al. 2014). Entre 1996 et 2018, 99 études ont détecté des coronavirus chez les chauves-souris, et généré plus de 3600 séquences nucléotidique de coronavirus (partielles ou complètes, tous gènes confondus), chez 11 familles (sur 18 existantes) et plus de 190 espèces de chauves-souris (Chen et al. 2014).

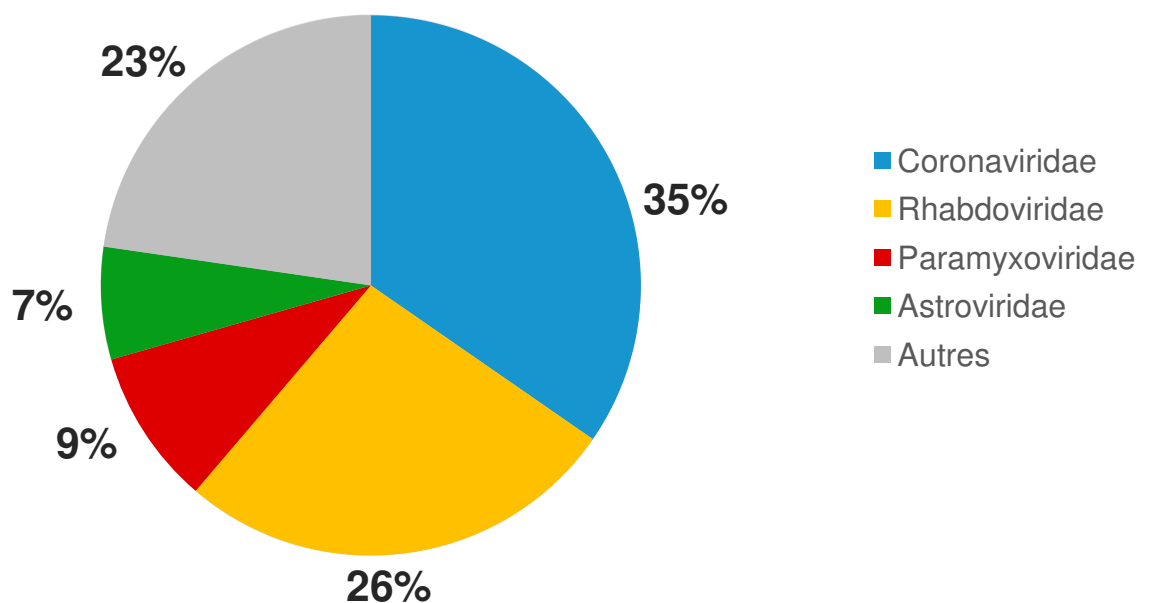


Figure 9. Proportion des familles virales les plus détectées chez les chauves-souris entre 1956 et 2019. Synthèse effectuée à partir de 10 678 détections dans 464 publications référencées sur le site internet « Database of bat-associated viruses » mai 2019 (Chen et al. 2014).

I.2.1. Origine zoonotique et diversité d'hôtes

Une première étude de l'horloge moléculaire des coronavirus avait estimé l'origine de ce genre viral à 10 000 ans (Woo et al. 2010). Cependant en 2013, Wertheim et al. remettent en cause cette estimation, et avance une origine beaucoup plus ancienne de l'ordre de 55,8 millions d'années grâce à l'utilisation d'une horloge moléculaire relâchée (Wertheim et al. 2013). Le genre coronavirus est subdivisé en 4 sous-genres : α -CoV, β -

CoV, δ -CoV et γ -CoV (Chan et al. 2013; Drexler et al. 2014). Les sous-genres δ et γ seraient originaires des oiseaux, tandis que les sous-genres α et β seraient originaires des chauves-souris (Chan et al. 2013). Les coronavirus sont retrouvés chez une grande diversité d'hôtes, mammifères et aviaires (**Figure 10**) (Lau et al. 2015; Chan et al. 2015; Cui et al. 2019). Selon Chan et collaborateurs, cette grande diversité d'espèces hôtes et de génotypes viraux traduirait de fortes capacités d'adaptation de ces coronavirus à de nouveaux hôtes et à de nouvelles niches écologiques, avec par exemple la découverte de coronavirus chez des mammifères marins (Mihindukulasuriya et al. 2008; Chan et al. 2013; Woo et al. 2014).

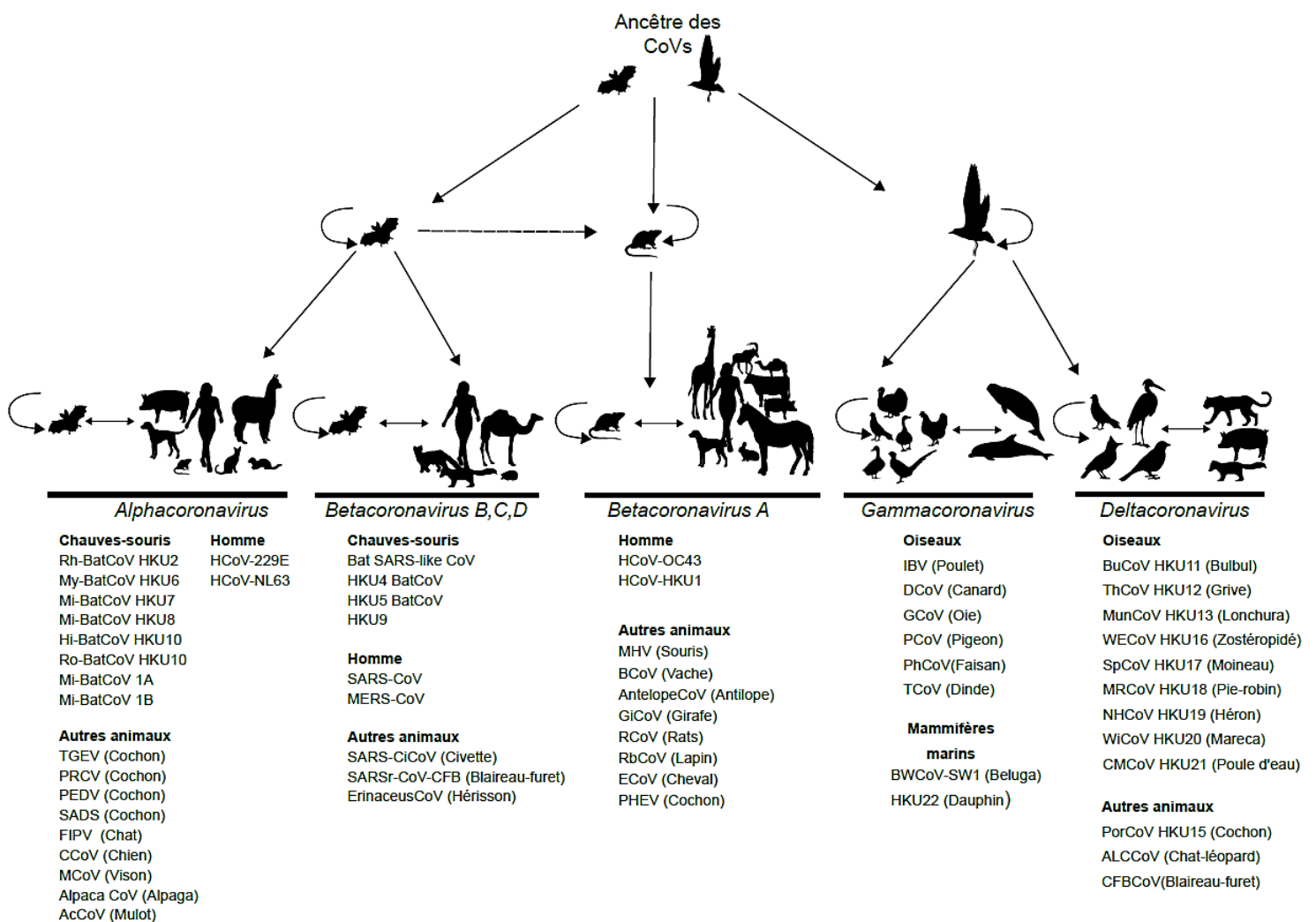


Figure 10. Origine des coronavirus et exemple de la diversité d'hôtes connus (modifié d'après (Lau et al. 2015 ; Chan et al. 2015 ; Cui et al. 2019).

I.2.2. Importance sanitaire des coronavirus

Les coronavirus sont des virus responsables d'infections respiratoires modérées à sévères chez de nombreux hôtes, notamment chez des animaux domestiques, des animaux de laboratoire et chez l'Homme (Saif 2004; Chan et al. 2013). En 1931, Schalk et Hawn décrivent une maladie respiratoire inconnue et très contagieuse chez les poulets aux États-Unis, qui provoque des pertes importantes de rendements dans les élevages (Schalk et Hawn 1931). Ce n'est qu'en 1937 que Beaudette et Hudson isolent pour la première fois le virus responsable de la bronchite infectieuse aviaire (« Infectious Bronchitis Virus », IBV) (Bijlenga et al. 2004; Cavanagh 2007). Le second coronavirus à être identifié est le virus responsable de l'hépatite murine (« Murine Hepatitis Virus » ; MHV) chez des souris de laboratoire. Décrit pour la première fois en 1949 (Cheever et al. 1949), ce virus est aujourd'hui considéré comme le pathogène le plus courant des souris de laboratoire (Baker 1998). Très contagieux chez les souris, le tropisme peut être respiratoire et entérique, et provoquer un ralentissement de la croissance, des diarrhées et une diminution du système immunitaire pouvant entraîner la mort et ainsi fortement perturber les résultats d'expérimentations animales (Baker 1998). D'autres coronavirus ont été identifiés dans de nombreux autres hôtes, comme le virus de la gastroentérite transmissible du porc (« Transmissible Gastro-Enteritic Virus » ; TGEV) chez les porcs en 1946, le virus de la péritonite infectieuse féline (« Feline Infection Peritonitis Virus » ; FIPV) chez les chats en 1970 et le coronavirus bovin (« Bovine coronavirus » ; BCoV) en 1973 (Doyle et Hutchings 1946; Ward 1970; Mebus et al. 1973).

Les porcs représentent un réservoir majeur de coronavirus (Fu et al. 2018; Wang et al. 2018; Wang et al. 2019; Mora-Díaz et al. 2019). En plus du TGEV cité précédemment, le virus diarrhéique épidémique porcin (PEDV), le delta coronavirus porcin (PDCoV), le virus HKU15, le coronavirus entérique du porc (Swine enteric coronavirus), le virus de l'encéphalomyélite porcine hémagglutinante (PHEV) et le syndrome diarrhéique aigu du porc (SADS), peuvent entraîner des problèmes sanitaires majeurs et de fortes mortalités dans les élevages porcins (Song et al. 2015; Lee 2015; Xia et al. 2018). Le PEDV est un coronavirus porcin décrit pour la première fois en 1978 et entraînant des diarrhées mortelles, en particulier chez les porcelets (Pensaert et de Bouck 1978). Depuis 2013, le PEDV est devenu un problème sanitaire aux États-Unis, en Asie et en Amérique centrale et du Sud. Aux États-Unis, il a entraîné la perte de 10% des porcs d'élevages en 1 an après son émergence en 2013 (Song et al. 2015; Niederwerder et Hesse 2018). Récemment, en 2017, un nouveau coronavirus porcin, le SADS, est apparu en Chine, causant la mort de 24 693 porcs dans les exploitations porcines (Zhou et al. 2018).

Importance en santé humaine

Six types de coronavirus ont été décrits chez l'Homme: le HCoV-229E, le HCoV-NL63, le HCoV-OC43, HCoV-HKU1, le SRAS-CoV et le MERS-CoV (Forni et al. 2017; Cui et al. 2019). Depuis leur découverte au début des années 1960 jusqu'à la fin du XXème siècle, les coronavirus humains n'étaient connus que pour provoquer des symptômes respiratoires légers à modérés dans les populations (Saif 2004). Cependant en 2002-2003, un coronavirus jusqu'alors inconnu (le SRAS-CoV) a émergé en Chine et s'est propagé dans 30 pays, entraînant des symptômes respiratoires sévères, infectant 8 096 personnes et causant 774 morts en moins d'un an (Organisation Mondiale de la Santé 2003). Depuis 2012, un autre coronavirus entraînant des symptômes respiratoires sévères chez l'Homme est apparu en Arabie Saoudite (MERS-CoV) et circule toujours de nos jours, infectant 2 454 personnes et entraînant 850 décès (Organisation Mondiale de la Santé 2019b). Bien que tous les coronavirus humains aient été décrits récemment (XXème et XXIème siècle), les émergences de certains de ces coronavirus dans les populations humaines pourraient cependant être beaucoup plus anciennes (Forni et al. 2017; Cui et al. 2019) (**Figure 11**).

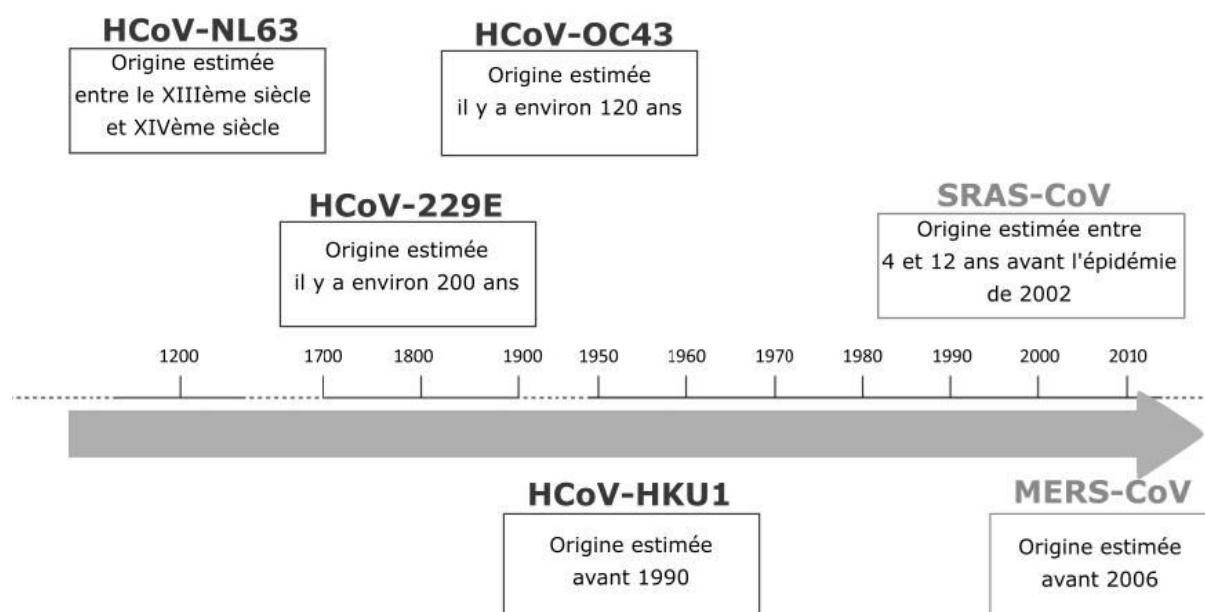


Figure 11. Chronologie de l'émergence des six coronavirus humains (modifié d'après Forni et al. 2017). En noir les coronavirus induisant une infection respiratoire légère à modérée et en gris les coronavirus induisant une infection respiratoire aiguë.

Le HCoV-NL63 (HCoV : Human coronavirus) a été décrit pour la première fois en 2004 (Van der Hoek et al. 2004). En s'appuyant sur la reconstruction de la phylogénie d'une portion du gène de la polymérase de HCoV-NL63 par analyse bayésienne, Huynh et collaborateurs ont pu mettre en évidence que l'ancêtre commun le plus récent entre ce virus et un coronavirus identifié chez la pipistrelle de l'Est *Perimyotis subflavus*, aux États-Unis, aurait existé il y a entre 822 et 563 ans (Huynh et al. 2012). Le HCoV-229E a été décrit pour la première fois en 1965 (Tyrell et Bynoe 1965). La reconstruction de la phylogénie basée sur une portion du gène de la polymérase de HCoV-229E, par analyse bayésienne, a permis d'estimer la période de divergence entre ce virus et une séquence de coronavirus détectée chez l'espèce de chauve-souris *Hipposideros caffer ruber* à il y a environ 200 ans (Pfefferle et al. 2009). La première description du HCoV-OC43 date de 1965 (Hamre et Procknow 1966). Au début des années 2000, Vijgen et collaborateurs ont estimé son origine à il y a environ 120 ans (Vijgen et al. 2005). Cependant, la nouvelle estimation de l'horloge moléculaire de ce virus et des taux de mutations ont permis d'énoncer une origine plus récente à la fin des années 1950 (Lau et al. 2011; Al-Khannaq et al. 2016). Le HCoV-HKU1 a été détecté pour la première fois en 2005 chez un patient atteint d'une pneumonie (Woo et al. 2005). En 2016, Al-Khannaq et collaborateurs ont estimé une origine précédant les années 1990 (Al-Khannaq et al. 2016). En ce qui concerne les coronavirus humains ayant émergé plus récemment dans les populations humaines, le SRAS-CoV serait apparu dans les populations humaines entre 1985 et 1998 (Lau et al. 2015) ; l'ancêtre commun entre le MERS-CoV et des virus génétiquement proches chez les chauves-souris, pourrait dater de 2006 (Zhang et al. 2016). Cependant, le MERS-CoV circulerait depuis plus de 30 ans chez les dromadaires en Afrique, mettant en avant que le passage du virus des chauves-souris à l'Homme se serait fait par l'intermédiaire des dromadaires (Müller et al. 2014).

La majorité des coronavirus humains sont donc des virus originaires des chauves-souris, qui auraient émergé chez l'Homme par le biais d'hôtes intermédiaires (Corman et al. 2015; Tao et al. 2017; Menachery et al. 2017; Cui et al. 2019) (**Figure 12**). Le passage par ces hôtes intermédiaires aurait permis (i) le maintien de la chaîne de transmission virale chez ces hôtes, (ii) des contacts réguliers avec l'Homme, et (iii) l'adaptation du virus à des récepteurs cellulaires proches des récepteurs humains (Corman et al. 2015; Tao et al. 2017; Menachery et al. 2017; Cui et al. 2019). Pour les émergences les plus récentes comme pour le MERS-CoV, l'hôte intermédiaire (dromadaire) a été clairement identifié (Corman et al. 2015). Pour le SRAS, l'épidémie de 2003 aurait été causée par le contact avec des civettes (*Paguma larvata*) vendues dans des marchés (Song et al. 2005). En revanche pour les autres coronavirus, peu d'éléments

permettent de confirmer avec certitude l'existence d'un potentiel hôte intermédiaire. Pour le HCoV-229E, des séquences nucléotidiques proches de coronavirus 229E de chauves-souris et humains ont été détectées chez des lamas, suggérant un rôle possible d'hôte intermédiaire (Corman et al. 2016; Tao et al. 2017). Pour le HCoV-NL63, aucune hypothèse sur le type d'hôte intermédiaire n'a encore été formulée et vérifiée (Tao et al. 2017). Pour les coronavirus HCoV-OC43 et HCoV-HKU1, l'identification de plusieurs coronavirus chez des rongeurs dans le même clade phylogénétique suggère que les rongeurs pourrait avoir eu un rôle dans l'émergence de ces coronavirus chez l'Homme (Cui et al. 2019).

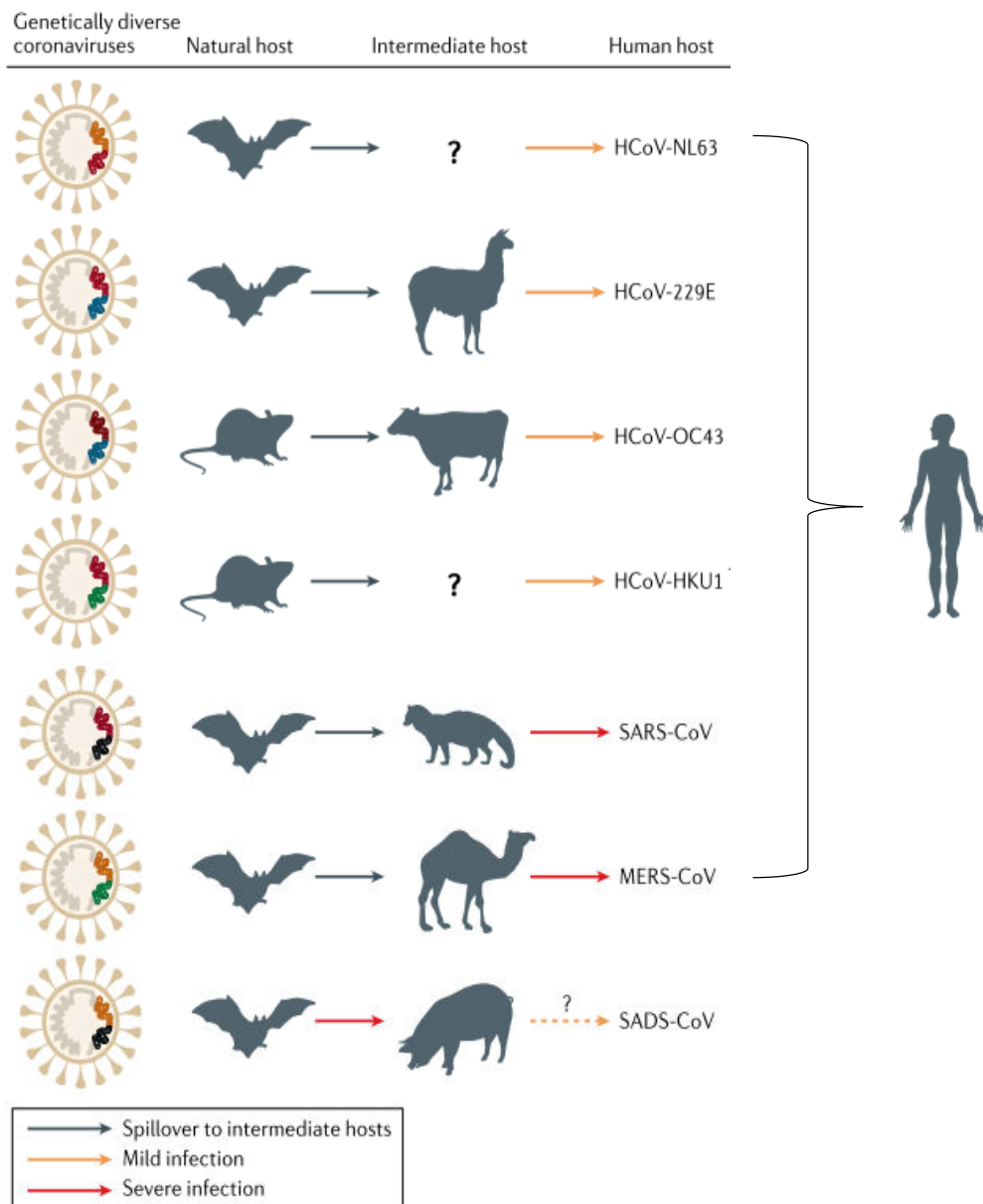


Figure 12. Origine animale prouvée ou hypothétique des coronavirus humains (modifié d'après Cui, Li, et Shi 2019). Les flèches pleines représentent les données confirmées. Les flèches noires indiquent une infection *via* un hôte intermédiaire, les flèches jaunes une infection modérée et les flèches rouges une infection aiguë chez l'Homme ou l'animal.

L'exploration de la similarité nucléotidique par comparaison d'une séquence complète de HCoV-OC43 avec des séquences complètes d'autres coronavirus du groupe β -CoV-A (virus de l'hépatite murin (MHV), coronavirus bovin (BCoV), virus sialodacryoadenitique du rat (SDAV), virus de l'encéphalomyélite porcine hémagglutinante (PHEV), coronavirus respiratoire canin (CRCoV) et coronavirus équin (ECoV)) a révélé que le HCoV-OC43 avait le pourcentage de similarité le plus élevé pour la très grande majorité des gènes avec le coronavirus bovin BCoV, suggérant une origine commune (Vijgen et al. 2005).

I.2.3. Structure et réplication des coronavirus

Structure du virion et génome

Le genre coronavirus (ordre des Nidovirales, famille des *Coronaviridae*) appartient au groupe IV, défini par les virus à ARN monocaténaire à polarité positive (Masters 2006). Les coronavirus sont des virus enveloppés de forme sphérique d'environ 125 nm de diamètre, composés de grandes glycoprotéines de surfaces (spicules S), de protéines membranaires intégrées (M et M'), de petites protéines membranaires formant l'enveloppe (E), d'hémagglutinines estérases (HE), et de protéines formant la nucléocapside (N) renfermant l'ARN génomique (**Figure 13**) (Fehr et Perlman 2015). La taille du génome est de 26 à 32 kilobases et est constitué d'un seul brin d'ARN linéaire (Lai et Cavanagh 1997; Masters 2006; Gorbalenya et al. 2006). Il est divisé en 7 à 10 gènes fonctionnels dont 4 ou 5 codant des protéines structurales (Lai et Cavanagh 1997).

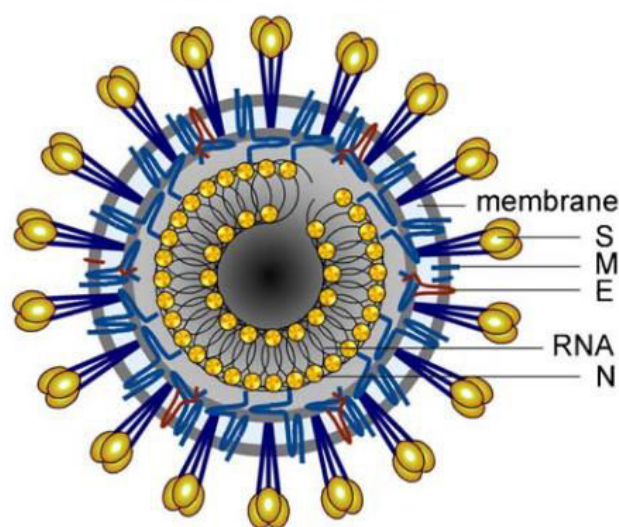


Figure 13. Structure d'un virion de coronavirus (Gorbalenya et al. 2006). N, protéine de la nucléocapside ; S, protéine de spicule ; M, protéine membranaire ; E, protéine d'enveloppe.

Chez certaines espèces, d'autres gènes dits « accessoires » peuvent s'ajouter à cette structure de base et semblent avoir un rôle indispensable pour la réplication virale (Masters 2006; Cui et al. 2019). L'organisation de la structure des gènes est constante entre les coronavirus, avec un arrangement toujours dans le même ordre: 5'-Polymérase-(HE)-S-E-M-N-3' (Fehr et Perlman 2015; Forni et al. 2017; Cui et al. 2019).

Le cycle répliatif

La première étape du cycle répliatif des coronavirus est l'attachement du virus grâce à la reconnaissance du récepteur membranaire de la cellule hôte par la protéine de surface S du virus (Lai et Cavanagh 1997; Bergmann et al. 2006; Masters 2006; Gallagher et Perlman 2013) (**Figure 14**). Cette étape est considérée comme l'une des plus déterminantes lors d'une infection par un coronavirus puisque c'est cette interaction qui va déterminer le tropisme du virus, le spectre d'hôtes qu'il va pouvoir infecter, ainsi que sa capacité à passer la barrière de l'espèce (Li et al. 2006; Li 2013; Li 2015). Différents récepteurs cellulaires peuvent être utilisés selon les coronavirus, indépendamment de leur classification α ou β -CoV (Belouzard et al. 2012; Li 2015). Par exemple, l' α -CoV HCoV-NL63 et le β -CoV SRAS-CoV utilisent tous les deux les récepteurs à l'enzyme de conversion 2 (ACE2 : Angiotensin converting enzyme 2) (Kuhn et al. 2004; Li 2015). Chez les α -CoV, le coronavirus respiratoire porcin (PRCV : Porcine respiratory coronavirus), le coronavirus félin de type II, le coronavirus canin de type II et le HCoV-229E utilisent le récepteur à l'aminopeptidase N (APN : Aminopeptidase N) (Tresnan et Holmes 1998; Li 2015). Le β -CoV MERS-CoV utilise le récepteur à la dipeptidyl peptidase (DPP4 : Dipeptidyl peptidase-4) (Raj et al. 2013).

Après attachement du virus au récepteur membranaire, celui-ci est internalisé dans la cellule soit par endocytose, soit par fusion des membranes selon le type de cellules et le coronavirus considérés (Lai et Cavanagh 1997; Belouzard et al. 2012). Après la dégradation de la membrane et décapsidation de la nucléocapside, l'ARN génomique du virus est libéré dans le cytoplasme (Lai et Cavanagh 1997). La polarité positive de l'ARN du virion permet dans un premier temps aux ribosomes de la cellule hôte de traduire les gènes ORF1a (ORF : *Open Reading Frame*) et ORF1b codants pour l'ARN polymérase ARN-dépendante (Lai et Cavanagh 1997). Suite à la synthèse de l'ARN polymérase ARN-dépendante, un brin d'ARN de polarité négative sera produit et servira de matrice pour la synthèse d'ARN subgénomiques et génomiques (Lai et Cavanagh 1997). Après la synthèse des protéines structurales et accessoires, les virions vont être assemblés par le réticulum endoplasmique rugueux (Lai et Cavanagh 1997).

Chaque virion sera ensuite transporté et libéré à la surface de la cellule hôte par exocytose via l'appareil de Golgi (Lai et Cavanagh 1997).

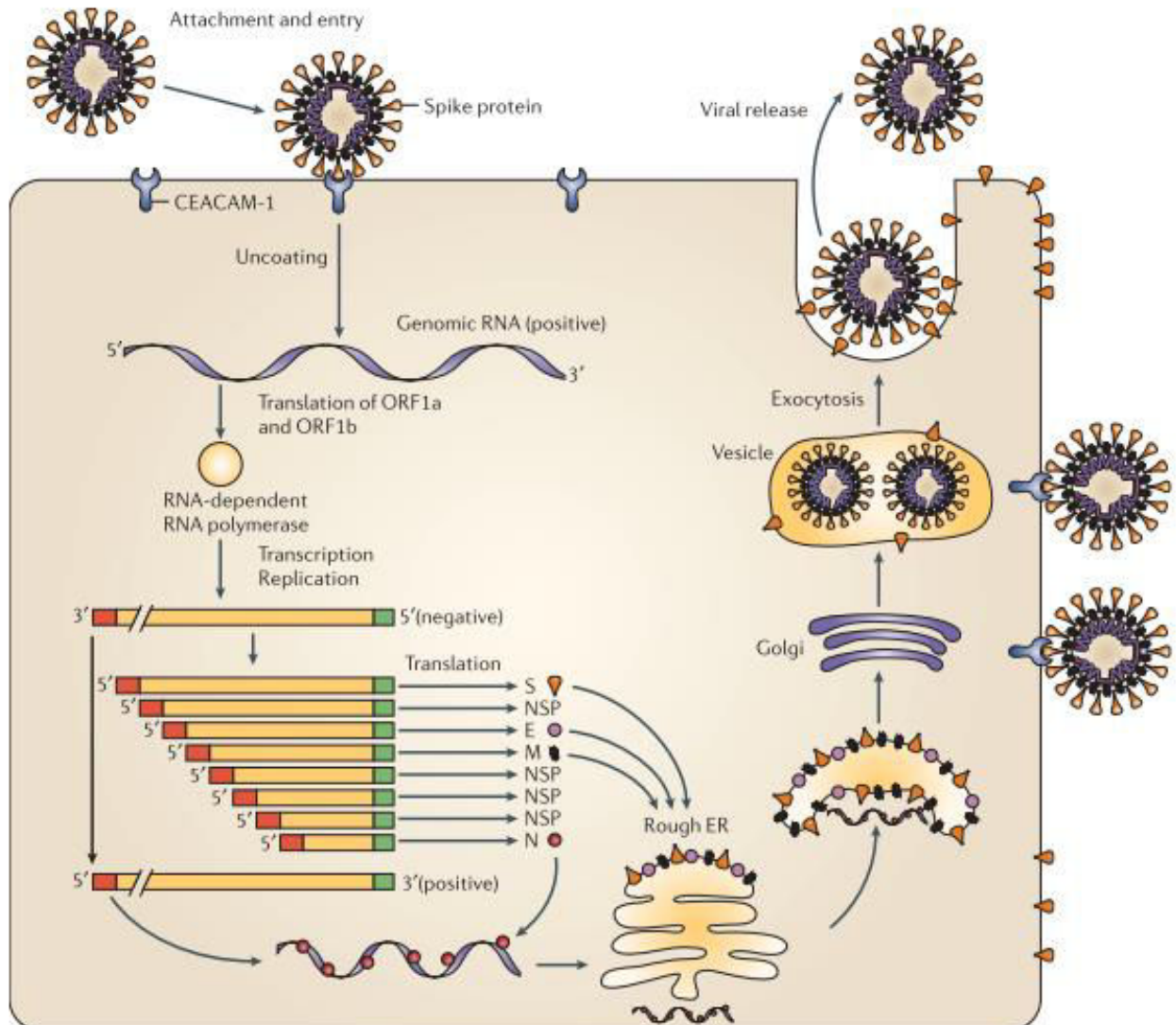


Figure 14. Cycle réplcatif du coronavirus hépatique murin (MHV), Bergmann et al. 2006. CEACAM-1, *CarcinoEmbryonic Antigen Cell Adhesion Molecule 1*, récepteur du MHV ; S, protéine de spicule ; NSP, protéines non structurales ; E, protéine d'enveloppe ; M, protéine membranaire ; N, protéine de la nucléocapside ; ER, réticulum endoplasmique ; ORF, *Open Reading Frame*.

I.3. Conclusion

Les coronavirus sont des virus d'importance sanitaire majeurs, infectant de nombreux hôtes mammifères et aviaires. Les α et β -coronavirus sont responsables d'infections modérées à sévères chez l'Homme et chez plusieurs espèces de mammifères domestiques, dont les porcs, les bovins et les dromadaires. Leur origine chez les chauves-souris démontre que des événements de transmission inter-espèces sont possibles et fréquents, et qu'il peut exister un décalage entre le saut d'espèce et la détection de ces coronavirus dans de nouvelles populations ou espèces. L'étude de la diversité des coronavirus dans les populations de chauves-souris dans les zones géographiques présentant une grande diversité spécifique, des différences écologiques majeurs, et des contacts avec les populations humaines, est une étape clef dans la connaissance de leur écologie et évolution. Plusieurs études ont rapporté la présence de coronavirus chez des chauves-souris en Afrique continentale au Zimbabwe, en Afrique du Sud, au Kenya, au Ghana et au Congo. Cependant, une seule étude s'est intéressée à la détection de coronavirus dans des chauves-souris des îles de l'ouest de l'Océan Indien (Razanajatovo et al. 2015).

**Chapitre II : Étude phylogéographique des
coronavirus de chauves-souris du sud-
ouest de l'Océan Indien**

II.1. Répartition des zoonoses

II.1.1. Latitude et diversité en agents infectieux

Les analyses comparatives de la distribution mondiale des agents infectieux et parasitaires chez l'Homme ont révélé une relation négative entre la richesse spécifique en agents infectieux humains et la latitude (Guernier et al. 2004). Ainsi, les zones tropicales à subtropicales hébergeraient une plus grande diversité d'agents infectieux que les zones tempérées, notamment liée à des facteurs abiotiques tels que la température et la pluviométrie (Guernier et al. 2004). Les risques d'émergences de zoonoses issues de la faune sauvage sont également concentrés dans les zones tropicales (Allen et al. 2017); **Figure 15**). En 2017, Allen et collaborateurs ont analysé l'impact de différents facteurs (biologiques, anthropiques et environnementaux) sur les probabilités d'émergence de zoonoses en provenance de la faune sauvage à l'aide de modèles d'arbres de régression boostés (« Boosted Regressions Tree ») (Allen et al. 2017). La probabilité d'émergence d'une zoonose dans une zone donnée était positivement liée à la présence d'arbres à feuillages persistants, à un climat chaud et à une diversité importante en mammifères, et négativement corrélée à la densité des populations humaines (Allen et al. 2017). Les distributions des zoonoses varient également en fonction du type d'espèce animale impliquée (Han et al. 2016). Ainsi, les zoonoses issues de la faune sauvage (hors rongeurs) sont plus communes dans les régions avec une forte diversité d'espèces animales vertébrées ; et les zoonoses transmises par la faune domestique sont plus importantes dans les zones à forte densité humaine (Han et al. 2016).

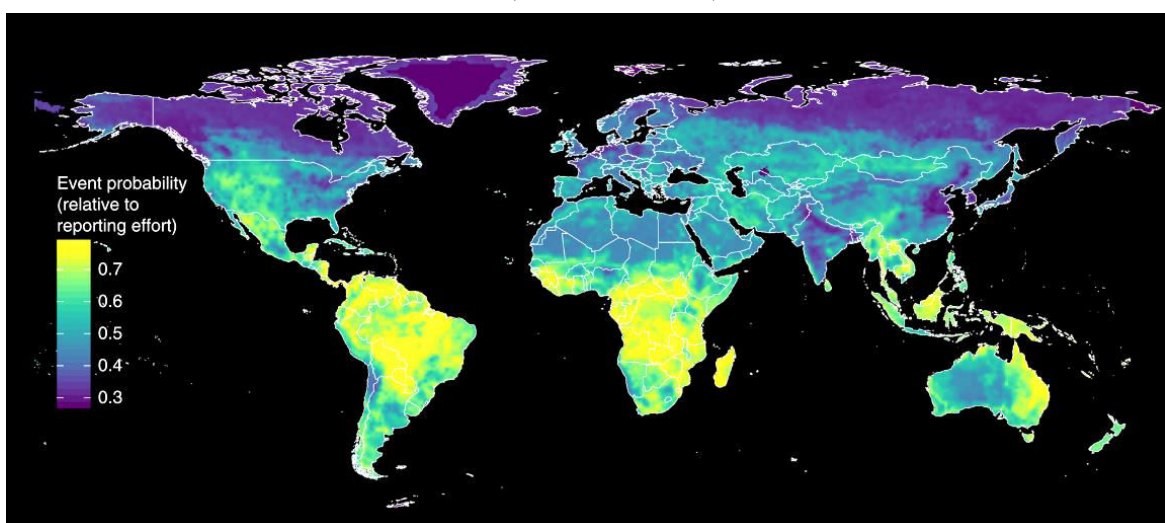


Figure 15. Zones à risques d'émergence de zoonoses définies par le modèle corrigé par le biais d'effort de surveillance (Allen et al. 2017). La valeur indique la probabilité binomiale qu'une cellule de la carte échantillonnée à un emplacement contienne un événement d'émergence de zoonose par rapport à une cellule de la carte qui n'en contient pas.

II.1.2. L'ouest de l'Océan Indien : un point chaud de biodiversité

Les îles de l'ouest de l'Océan Indien (Madagascar, l'archipel des Mascareignes, l'archipel des Comores, et l'archipel des Seychelles) représentent un point chaud (« hot spot ») de biodiversité (Myers et al. 2000). Un point chaud de biodiversité est défini par deux grands critères : le taux d'endémisme des espèces végétales vasculaires et animales vertébrées terrestres, ainsi que le degré de menace auquel ces espèces sont exposées (Myers et al. 2000). Pour être considérée comme un point chaud de biodiversité, une région doit abriter de manière exclusive, (i) au moins 0,5% de la diversité spécifique mondiale en plantes vasculaires et (ii) au moins 0,5% de la diversité spécifique animale (vertébrée) mondiale (Myers et al. 2000). Les îles de l'ouest de l'Océan Indien représentent 3,2 % de la diversité spécifique mondiale en plantes vasculaires (>9000 espèces) et 2,8 % de la diversité spécifique animale (vertébrée) mondiale (> 700 espèces).

L'ouest de l'Océan Indien est un système insulaire avec une histoire géologique complexe (Agnarsson et Kuntner 2012). Madagascar est la plus grande île continentale de la région et s'est séparée du Gondwana il y a 160 millions d'années, atteignant sa position actuelle il y a 120 millions d'années (de Wit 2003). Les archipels de Zanzibar et des Seychelles sont mixtes, avec des îles continentales et des îles coralliennes (Baker et Miller 1963; Hammond et al. 2013; Prendergast et al. 2016). Toutes les autres îles se sont formées par l'activité volcanique et sont âgées de 1 à 15 millions d'années (**Figure 16**; Agnarsson and Kuntner 2012). La distance de ces îles au continent africain a influencé la colonisation de ces territoires par les animaux vertébrés (Agnarsson et Kuntner 2012). L'archipel de Zanzibar par exemple abrite à l'heure actuelle une cinquantaine d'espèces de mammifères terrestres contre seulement une petite dizaine dans l'archipel des Mascareignes (Pakenham 1984; IUCN 2019).

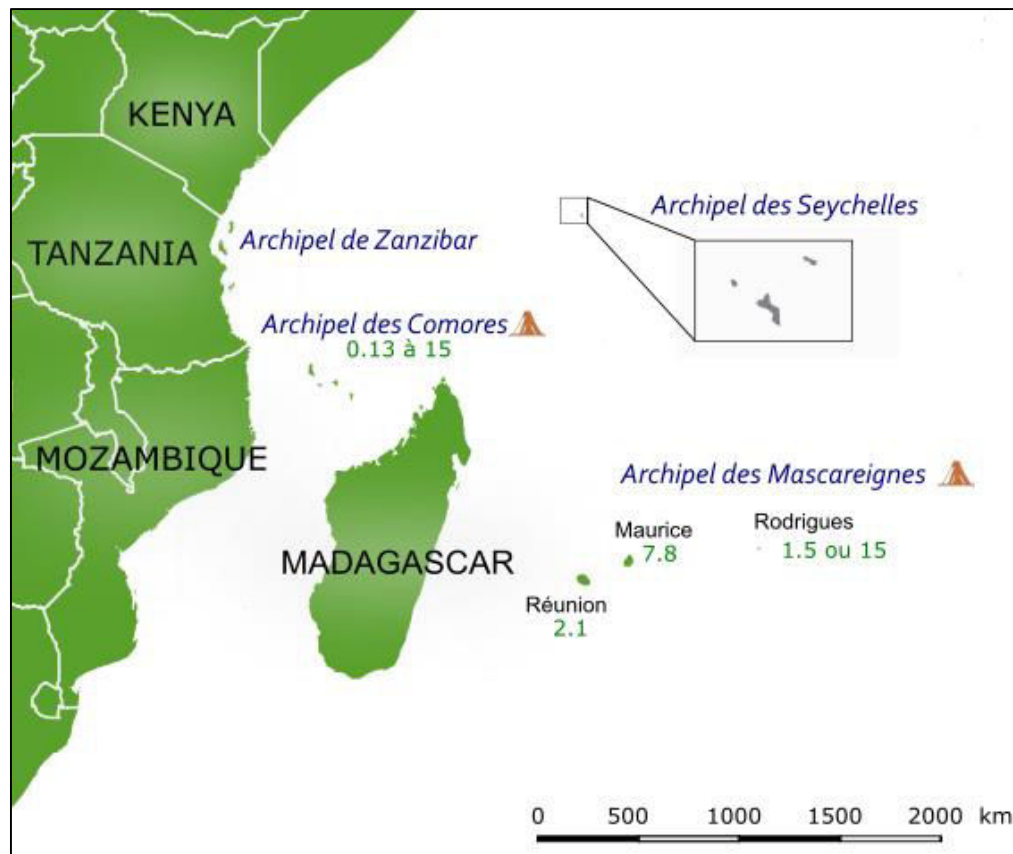


Figure 16. Archipels de la région ouest Océan Indien et âge moyen (en vert) des différents archipels volcaniques en millions d’années, modifiée d’après Tortosa et al. 2012.

II.1.3. Diversité spécifique des chauves-souris

De par leur capacité de dispersion, les chauves-souris ont colonisé la plupart des îles océaniques de l’ouest de l’Océan Indien (O’Brien 2011). La diversité des chauves-souris dans les systèmes insulaires dépend de l’isolement géographique de ces îles par rapport au continent, ou des îles entre elles (O’Brien 2011). La région héberge 11 des 18 familles de chauves-souris existantes dans le monde, avec des différences dans la diversité spécifique pour chaque île (O’Brien 2011). Madagascar regroupe plus de 45 espèces de chauves-souris, avec près de 80% d’endémisme (Goodman 2011; Goodman et al. 2015). L’archipel des Comores, proche de la côte est-africaine, abrite dix espèces de chauves-souris, dont cinq espèces endémiques de l’archipel (Goodman et al. 2010b). Les archipels des Mascareignes et des Seychelles, archipels les plus éloignés des continents africains et asiatiques, abritent jusqu’à 3 espèces, dont au moins une espèce endémique (O’Brien 2011).

Cette histoire géologique insulaire a influencé la colonisation de la région par les chauves-souris (O'Brien 2011). Pour certains genres, l'histoire de ces colonisations a pu être partiellement résolue par l'étude de marqueurs moléculaires et morphologiques (Russell et al. 2008; O'Brien et al. 2009; Goodman et al. 2010a; Christidis et al. 2014). D'après l'analyse de séquences de cytochrome *b* (gène de l'ADN mitochondrial) et la datation par une approche bayésienne, le premier évènement de colonisation du genre *Triaenops* de Madagascar depuis l'Afrique est estimé à il y a 600 000 ans (Russell et al. 2008). Pour le genre *Pteropus*, des analyses phylogénétiques basées sur les séquences de cytochrome *b* et de l'ARN ribosomal 12S, de différentes espèces de *Pteropus* insulaires de l'Océan Indien et d'espèces continentales (Inde), ont permis d'estimer trois évènements de colonisations différents (O'Brien et al. 2009). Cependant pour ce genre, aucune étude n'a à ce jour daté ces évènements de colonisation, même si en se basant sur l'histoire géologique de l'archipel des Seychelles, O'Brien (2011) estime qu'un d'entre eux aurait eu lieu il y a moins de 125 000 ans (O'Brien 2011).

II.2. Évolution des agents infectieux associés aux chauves-souris

II.2.1. Diversité des d'agents infectieux associés aux mammifères

Plusieurs études ont été réalisées ces dix dernières années pour identifier les agents infectieux et estimer leur diversité chez les mammifères non-humains. Une grande diversité de bactéries, virus, protozoaires et filaires a pu être identifiée principalement chez les ordres Rodentia, Afrosoricida, et Chiroptera (Iehlé et al. 2007; Wilkinson et al. 2012; Wilkinson et al. 2014; Dietrich et al. 2015; Brook et al. 2015; Razanajatovo et al. 2015; Gomard et al. 2016; Ramasindrazana et al. 2016; Mélade et al. 2016b; Mélade et al. 2016a; Lagadec et al. 2016; Lebarbenchon et al. 2017; Cordonin et al. 2018; Dietrich et al. 2018; Hoarau et al. 2018; Brook et al. 2019; Ranaivoson et al. 2019). Chez les chauves-souris, la circulation de plusieurs genres viraux (astrovirus, filovirus, lyssavirus, paramyxovirus), genres bactériens (*Bartonella*, *Leptospira*, et *Rickettsia*), et parasites (polychromophilus) a été mise en évidence directement (par biologie moléculaire), ou indirectement (par sérologie) (Iehlé et al. 2007; Wilkinson et al. 2012; Brook et al. 2015; Razanajatovo et al. 2015; Gomard et al. 2016; Ramasindrazana et al.

2016; Mélade et al. 2016b; Lebarbenchon et al. 2017; Dietrich et al. 2018; Hoarau et al. 2018; Brook et al. 2019; Ranaivoson et al. 2019). À ce jour, une seule étude s'est intéressée aux coronavirus chez les chauves-souris de l'ouest de l'Océan Indien, à Madagascar (Razanajatovo et al. 2015). Des prélèvements rectaux et oraux ont été effectués pour détecter la présence d'ARN du coronavirus chez 351 chauves-souris de trois espèces différentes (*Eidolon dupreanum*, *Pteropus rufus* et *Rousettus aegyptiacus*) capturées dans quatre régions différentes de Madagascar (Anjohibe, Anosibe, Menabe et Toliara). Cette étude a révélé la circulation de coronavirus chez 17% des chauves-souris *Pteropus rufus* et chez 1% des chauves-souris *Eidolon dupreanum*. En ce qui concerne la diversité virale, de nouveaux variants génétiques du β -coronavirus ont été identifiés chez les deux espèces, proches de coronavirus détectés chez d'autres chauves-souris du Kenya pour les chauves-souris *Eidolon* et de Chine pour les chauves-souris *Pteropus* (Razanajatovo et al. 2015).

II.2.2. Histoires évolutives des agents infectieux dans la zone

Malgré cette grande diversité d'agents infectieux associés aux chauves-souris dans la région, seules deux études ont se sont focalisées sur leur histoire évolutive (Gomard et al. 2016; Mélade et al. 2016b), spécifiquement sur les paramyxovirus du genre Morbillivirus d'une part (Mélade et al. 2016b), et sur les bactéries du genre *Leptospira* (Gomard et al. 2016). Pour les deux études, 947 chauves-souris à Madagascar ont été analysées, de 7 familles et 31 espèces, réparties dans 52 sites (grottes, bâtiments et forêt) et 4 zones biogéographiques de l'île (sec, sub-aride, sub-humide et humide) (Mélade et al. 2016b). Les histoires évolutives ont été explorées par des analyses phylogénétiques et de coévolution basées sur l'étude des zones conservées du génome des paramyxovirus (gène L codant pour l'ARN polymérase ARN-dépendante), et des leptospires (gènes *secY*, *adk* et *rrs2* (ARN 16S)) (Gomard et al. 2016; Mélade et al. 2016b). Ces études ont révélé que les paramyxovirus de chauves-souris de la région ont une faible spécificité d'hôtes et une diversité génétique due à du « host-switch » plutôt que de la co-spéciation. Les leptospires ont en revanche une forte spécificité d'hôte, avec une diversité génétique due à plusieurs mécanismes évolutifs comme la duplication, la co-spéciation et le « host-switch ».

II.3. Phylogéographie de coronavirus de populations de chauves-souris de l'ouest de l'Océan Indien

II.3.1. Article 2: Phylogeography of coronaviruses in bats in West Indian Ocean

Une association étroite entre groupes génétiques de coronavirus et familles ou genre de chauves-souris a été mise en évidence, suggérant une coévolution étroite des coronavirus avec leurs hôtes réservoirs (Zhang et al. 2007; Anthony et al. 2017b; Leopardi et al. 2018). Par exemple, les coronavirus du clade β -CoV-C semblent majoritairement associés aux chauves-souris de la famille des Vespertilionidae, alors que les coronavirus du clade β -CoV-D semblent majoritairement associés aux chauves-souris de la famille des Pteropodidae (Zhang et al. 2007; Anthony et al. 2017b; Leopardi et al. 2018). Anthony et al. ont tenté de reconstruire l'histoire évolutive des coronavirus et des chauves-souris, en examinant notamment les différents mécanismes macro-évolutifs qui pourraient expliquer les congruences actuelles des phylogénies de certains coronavirus et chauves-souris (Anthony et al. 2017b). Le « host-switch » et, en moindre mesure la co-spéciation, semblent être les mécanismes dominant, expliquant les associations actuelles entre coronavirus et chauves-souris en Afrique continentale (Anthony et al. 2017b).

Cependant, une seule étude a été réalisée sur les coronavirus de chauves-souris dans des systèmes insulaires, avec une grande diversité d'espèce et une diversité d'habitats (Smith et al. 2016). En 2016, Smith et collaborateurs ont exploré la diversité de coronavirus hébergés par 2 195 chauves-souris d'Australie et des îles alentours telles que la Papouasie-Nouvelle-Guinée, le Timor oriental, l'Indonésie, la Malaisie et Taïwan par approches sérologiques et moléculaires (Smith et al. 2016). L'amplification d'un fragment du gène codant pour l'ARN polymérase ARN-dépendante a permis de mettre en évidence 4 génotypes viraux différents chez 7 espèces sur les différents territoires (Smith et al. 2016). Ce travail n'a pas exploré l'histoire évolutive de ces coronavirus dans ce système insulaire (Smith et al. 2016).

Les événements de colonisations à des époques différentes et l'hétérogénéité des communautés de chauves-souris sur les différentes îles pourraient avoir un impact sur la distribution et la diversité des coronavirus qui leur sont associés. Dans l'Océan Indien, une étude a recherché la présence des coronavirus chez les chauves-souris dans la région, à Madagascar (Razanajatovo et al. 2015). Cependant, les mécanismes évolutifs et les facteurs

écologiques impliqués dans la structure génétique des coronavirus dans ce système insulaire n'ont pas encore été explorés. Dans le travail suivant, l'étude de la diversité et l'évolution des coronavirus des communautés de chauves-souris de la région a été réalisée par une approche phylogéographique, c'est-à-dire par l'étude des données phylogénétiques dans un contexte géographique. Pour ce faire, plus de 1000 échantillons biologiques provenant de 39 espèces de chauves-souris différentes, de cinq îles et d'une zone continentale ont été analysés, afin (i) d'estimer la proportion de chauves-souris positives aux coronavirus, (ii) d'identifier des facteurs écologiques affectant la probabilité de détection de ces virus chez les différentes espèces hôtes, (iii) de mesurer la diversité génétique de ces coronavirus et de reconstituer leur histoire évolutive, et (iii) d'identifier de potentielles associations entre familles d'hôtes et coronavirus. Dans ce contexte insulaire, nous supposons une forte influence de la structure géographique sur la diversité des coronavirus, avec une évolution indépendante des coronavirus sur chaque île, en raison de l'isolement spatial et de l'endémisme des chauves-souris

523 **Title:** Bat coronavirus phylogeography in the western Indian Ocean

524 **Running title:** Bat coronavirus in the western Indian Ocean

525 **Authors:** Léa Joffrin*, Steven M. Goodman, David A. Wilkinson, Beza Ramasindrazana,
526 Erwan Lagadec, Yann Gomard, Gildas Le Minter, Andréa Dos Santos, M. Corrie Schoeman,
527 Rajendraprasad Sookhareea, Pablo Tortosa, Simon Julienne, Eduardo S. Gudo, Patrick
528 Mavingui and Camille Lebarbenchon

529

530 **Author affiliations :**

531 Université de La Réunion, UMR Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT)
532 INSERM 1187, CNRS 9192, IRD 249, Sainte-Clotilde, La Réunion, France (L. Joffrin, B.
533 Ramasindrazana, E. Lagadec, Y. Gomard, G. Le Minter, D.A. Wilkinson, P. Tortosa, P.

534 Mavingui,

535 C. Lebarbenchon)

536 Association Vahatra, Antananarivo, Madagascar (S.M. Goodman, B. Ramasindrazana)

537 Field Museum of Natural History, Chicago, USA (S.M. Goodman)

538 Veterinary Faculty, Eduardo Mondlane University, Maputo, Mozambique (A. Dos Santos)

539 School of Life Sciences, University of Kwa-Zulu Natal, Kwa-Zulu Natal, South Africa (M.C.

540 Schoeman)

541 National Parks and Conservation Service, Réduit, Mauritius (R. Sookhareea)

542 Seychelles Ministry of Health, Victoria, Mahe, Seychelles (S. Julienne)

543 Instituto Nacional de Saúde, Maputo, Mozambique (E.S. Gudo).

544

545 *Corresponding author: lea.joffrin@univ-reunion.fr

546 UMR PIMIT, 2 rue Maxime Rivière, 97490 Sainte-Clotilde, Reunion Island, France.

547 Tel: +262 262 93 88 00

548 **Abstract – 147 words**

549 Bats are important reservoirs of zoonotic pathogens, including coronaviruses (CoVs). The
550 Western Indian Ocean (WIO) islands are a biodiversity hotspot with more than 50 bat species.
551 Here we tested 1,099 bats belonging to 39 species from Mozambique, Madagascar, Mauritius,
552 Mayotte, Reunion Island and Seychelles. Based on molecular screening and partial sequencing
553 of the RNA-dependent RNA polymerase gene, a total of 88 bats ($8.0\% \pm 1.6\%$) tested positive
554 for bat-borne coronaviruses (CoVs), with higher prevalence in Mozambican bats ($19.6\% \pm$
555 4.7%) as compared to those sampled on islands ($4.2\% \pm 1.2\%$). Phylogenetic analyses revealed
556 that a large diversity of α - and β -CoVs are maintained in bat populations of the WIO, some being
557 genetically related to human CoVs (e.g. NL63, MERS). Finally, we found a strong signal of co-
558 evolution between CoVs and their bat host species with limited evidence for hostswitching,
559 except for bat species sharing day roost sites.

560

561 **Keywords:** bat, coronavirus, islands, tropical, evolution, ecology **Text – 3356 words**

562 **Introduction**

563 The burden of emerging infectious diseases has significantly increased over the last decades
564 and is recognized as a major global health concern. In 2018, the World Health Organization
565 (WHO) established the “Blueprint priority disease list”, identifying viruses such as Ebola, Lassa
566 fever, Middle East Respiratory Syndrome (MERS), and Nipah fever as significant threats to
567 international biosecurity (1). This list also highlights the potential pandemic risk from the
568 emergence of currently unknown zoonotic pathogens, collectively referring to these unknown
569 threats as “disease X” (1). Investigation of the potential zoonotic pathogens in wild animals,
570 particularly vertebrates, is thus critical for emerging infectious diseases preparedness and
571 responses.

572 Bats represent nearly 1,400 species and live on all continents except Antarctica. They
573 provide key ecosystem services such as crop pest regulation, pollination, seed dispersal, and soil
574 fertilization. Bats are also recognized as reservoirs of many zoonotic pathogens. Several
575 batborne coronaviruses (CoVs) have recently emerged in humans and livestock with sometimes
576 major impacts to public health. For instance, in 2003, the Severe Acute Respiratory Syndrome
577 (SARS) outbreak in China spread to 30 countries, infecting 8,096 people and leading to 774
578 deaths in less than a year (2). The Middle East Respiratory Syndrome (MERS) is caused by a
579 camel-associated CoV that likely originated from bats, and in 2003 afflicted humans in Saudi
580 Arabia and elsewhere, infecting 2,442 people with 842 associated deaths worldwide (3).

581 Our study area spans geographic locations across the islands of the western Indian Ocean
582 (WIO) and southeastern continental Africa (SECA) (Figure 1). These land areas have diverse
583 geological origins that have influenced the process of bat colonization and species distributions.
584 The ecological settings and species diversity on these islands for bats are notably different. On
585 Madagascar, more than 45 bat species are known to occur, of which more than 80 % are endemic
586 to the island. The smaller studied islands of the WIO, Mauritius, Mayotte, Reunion Island, and
587 Mahé (Seychelles), host reduced bat species diversity (e.g. three species on Reunion Island),
588 whereas SECA supports a wide range of bat species. To date, several studies have identified
589 bat-infecting CoVs in countries of continental Africa, including Zimbabwe (4), South Africa (5),
590 and Kenya (6). CoVs have also been reported in fruit bat (Pteropodidae) populations of
591 Madagascar, where beta-coronaviruses belonging to the D-subgroup were identified in the two
592 bat species *Eidolon dupreanum*, and *Pteropus rufus* (7).

593 In this study, we investigated the presence of CoVs in over 1,000 individual bats
594 belonging to 39 species and sampled on five islands (Madagascar, Mauritius, Mayotte, Reunion
595 Island, and Mahé) and one continental area (Mozambique). Based on molecular screening and
596 partial sequencing of the RNA-dependent RNA polymerase gene, we (i) estimated CoV

597 prevalence in the regional bat populations, (ii) assessed CoVs genetic diversity, and (iii)
598 identified potential association between bat families and CoVs and evolutionary drivers leading
599 to these associations.

600

601 **Materials and methods**

602 **Origin of the tested samples**

603 Samples obtained from vouchered bat specimens during previous studies in Mozambique
604 (February to May 2015), Mayotte (November to December 2014), Reunion Island (February
605 2015), Seychelles (February to March 2014), Mauritius (November 2012) and Madagascar
606 (October to November 2014) were tested (8–11) (Technical Appendix). We also collected
607 additional swab samples from several synanthropic bat species on Madagascar, in January 2018
608 (Technical Appendix). A total of 1,099 bats were tested (Figure 1). Details on sample types, bat
609 families, species, and locations are provided in Appendix Table S1.

610

611 **Molecular detection**

612 RNA was extracted from 140 μL of each sample using the QIAamp Viral RNA mini kit
613 (QIAGEN, Valencia, California, USA), and eluted in 60 μL of Qiagen AVE elution buffer. For
614 bat organs, approximately 1 mm^3 of tissue (either lungs or intestines) was placed in 750 μL of
615 DMEM medium and homogenized in a TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Germany) for 2 min at
616 25 Hz using 3 mm tungsten beads, prior to the RNA extraction. Reverse transcription was
617 performed on 10 μL of RNA using the ProtoScript II Reverse Transcriptase and Random Primer
618 6
619 (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) under the following thermal conditions: 70 °C for

620 5 min, 25 °C for 10 min, 42 °C for 50 min, and 65 °C for 20 min (12). cDNAs were tested for
621 the presence of the RNA-dependent RNA-polymerase (RdRp) gene using a multi-probe
622 RealTime (RT) PCR (13). The primer set with Locked Nucleic Acids (LNA; underlined position
623 in probe sequences) was purchased from Eurogentec (Seraing, Belgium): 11-FW: 5'-
624 TGATGATGS-NGT-TGT-NTG-YTA-YAA-3' and 13-RV: 5'-GCA-TWG-TRT-GYT-GNG-
625 ARC-
626 ARA-ATT-C-3'. Three probes were used: probe I (ROX): 5'-TTG-TAT-TAT-CAG-AAT-
627 GGY-GTS-TTY-AT-3', probe II (FAM): 5'-TGT-GTT-CAT-GTC-WGA-RGC-WAA-
628 ATGTT-3', and probe III (HEX): 5'-TCT-AAR-TGT-TGG-GTD-GA-3'. RT-PCR was
629 performed with ABsolute Blue QPCR Mix low ROX 1X (Thermo Fisher Scientific, Waltham,
630 MA, USA) and 2.5 µL of cDNA under the following thermal conditions: 95 °C for 15 min, 95
631 °C for 30 s, touchdowns from 56 °C to 50°C for 1 min and 50 cycles with 95 °C for 30 s and 50
632 °C for 60 s in a CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA,
633 USA).

634 Because of the limited size of the sequence generated from the RT-PCR, a second PCR
635 targeting 440 bp of the RdRp gene was performed with 5 µL of cDNA of each positive sample,
636 with the following primer set: IN-6: 5'-GGT-TGG-GAC-TAT-CCT-AAG-TGT-GA-3' and
637 IN7: 5'-CCA-TCA-TCA-GAT-AGA-ATC-ATC-ATA-3' (14). PCRs were performed with the
638 GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) in an Applied
639 Biosystems 2720 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). After
640 electrophoresis in a 1.5% agarose gel stained with 2% GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA),
641 the remaining amplicons of the expected size were directly sequenced on both strands by
642 Genoscreen (Lille, France). All generated sequences were deposited in GenBank under the
643 accession numbers MN183146 to MN183273.

644

645 **Statistical analysis**

646 We tested the effect of bat family, species, sex, as well as sampling location and roosting
647 habitat (caves, outdoor or buildings) on the probability for detecting CoV RNA using Pearson
648 χ^2 tests. The effect of bat age (adult vs juvenile) and female reproductive status (pregnant vs not
649 pregnant) was investigated for species in which we detected at least 15 CoV positive individuals.
650 Finally, the effect of sampling during the wet (February) or dry (May) season was investigated
651 in Mozambique. Analyses were conducted with R v3.5.1 software (15).

652

653 **Phylogenetic analyses**

654 Sequences obtained with the second PCR system (14) were edited with the Chromas Lite
655 Software package version 2.6.4 (16). We explored CoV diversity of the sequences with pairwise
656 identity values obtained from *seqidentity* function in R *bio3d* package v2.3-4 (17) and identified
657 the most similar CoV RdRp sequences referenced in GenBank using BLASTN 2.2.29+. An
658 alignment was then generated using the 51 nucleotide sequences obtained in this study and 151
659 reference CoV sequences from a large diversity of host family and geographic origins (Europe,
660 Asia, Oceania, America and Africa), with CLC Sequence viewer 8.0 Software (CLC Bio,
661 Aarhus, Denmark). A phylogenetic tree was obtained by maximum likelihood using MEGA
662 Software v10.0.4 (18), with 1,000 bootstrap iterations, and the best evolutionary model for our
663 dataset as selected by modelgenerator v0.85 (19).

664 Host-virus associations were investigated using the phylogeny of WIO bats and their
665 associated CoVs. Bat phylogeny was generated from an alignment of 1,030 bp of mitochondrial
666 Cytochrome *b* (Cyt *b*) gene sequences downloaded from GenBank and sequenced for this study
667 (Appendix Table S2), for each CoV positive bat species with available sequence data. Finally,
668 bat and pruned CoV phylogenies based on each 393 bp RdRp unique sequence fragment were

669 generated by Neighbor-Joining with 1,000 bootstrap iterations, using CLC Sequence viewer 8.0
670 Software (CLC Bio, Aarhus, Denmark)(20). Phylogenetic congruence was tested (21) to assess
671 the significance of the coevolutionary signal between bat host species and CoVs sequences,
672 using *ParaFit* with 999 permutations in the ‘*ape*’ package v5.0 in R 3.5.1 (22). Tanglegram
673 representations of the co-phylogeny were visualized using the Jane software v4.01
674 (23).

675

676 **Results**

677 **Prevalence of CoV**

678 In total, 88 of the 1,099 bat samples tested positive for CoV by RT-PCR (mean detection
679 rate \pm 95% confidence interval: 8.0% \pm 1.6%). The prevalence of positive bats was different
680 according to the sampling locations ($\chi^2 = 70.2$; $p < 0.001$), with a higher prevalence in
681 Mozambique (19.6% \pm 4.7%) than on all WIO islands (4.2% \pm 1.2%) (Figure 2). A significant
682 difference in the prevalence of positive bats was also detected between families ($\chi^2 = 44.2$;
683 $p < 0.001$; Appendix Figure S1). The highest prevalence was observed in the families Nycteridae
684 (28.6 % \pm 23.6%), Rhinolophidae (24.6% \pm 10.5%), Hipposideridae (11.9% \pm 6.9%), and
685 Rhinonycteridae (10.7% \pm 5.5%). Bat species ($\chi^2 = 156.27$; $p < 0.001$; Appendix Figure S2) and
686 roosting habitat ($\chi^2 = 23.76$; $p < 0.001$; Figure 3) had a significant effect on the probability of
687 CoVs detection, but not host sex ($\chi^2 = 2.32$; $p = 0.13$). For Mozambican *Hipposideros caffer* and
688 *Mops condylurus*, bat age (adult vs juvenile) had no effect on the probability of CoVs detection
689 ($\chi^2 = 0.1$; $p = 0.8$ and $\chi^2 = 0.1$; $p = 0.7$, respectively). For *Chaerephon pusillus*, female
690 reproductive status (pregnant or not pregnant) had no effect on the probability of CoVs detection
691 ($\chi^2 = 2.50$; $p = 0.3$). Finally, the prevalence of CoV positive bats in Mozambique was
692 significantly different
693 ($\chi^2 = 21.5$; $p < 0.001$; Appendix Figure S3) between February (35.1% \pm 4.9%) and May (11.0% \pm

694 2.3).

695

696 **RdRp sequence diversity**

697 Of the 88 positive samples, we obtained 77 partial RdRp sequences using the RT-PCR
698 detection system (179 bp) and 51 longer partial RdRp sequences using the standard PCR system
699 (440 bp): this latter was subsequently used for phylogenetic analyses. Details of the sequenced
700 CoV-positive samples are given in Appendix Table S3. Pairwise comparison of these 51
701 sequences revealed 28 unique sequences, and sequences similarities ranging from 60.2% to
702 99.8%. The lowest sequence similarity was found in Mozambique (60.2% to 99.8%), then in
703 Madagascar (64.0% to 99.8%). No genetic variation was observed for samples from Mayotte
704 and Reunion Island.

705

706 **Phylogenetic structure of CoVs**

707 Sequence comparison indicated that WIO bats harbor a high diversity of both α and
708 β CoV, with conserved clade groups clustering mostly by bat family (Figure 4). Specifically, 25
709 sequences were identified as α -CoVs, and three sequences were genetically related to the β CoVs.
710 For α -CoVs, all sequences detected in our study of members of the family Molossidae formed a
711 highly supported monophyletic group, including CoV sequences from Molossidae bats
712 previously detected in continental Africa (Figure 5). CoVs detected in *Mops condylurus*
713 (Mozambique), *Mormopterus francoismoutoui* (Reunion Island), *Chaerephon pusillus* and
714 *Chaerephon* sp. (Mayotte), and *Mormopterus jugularis* (Madagascar) shared 90% - 98%
715 nucleotide similarity with a CoV detected in *Chaerephon* sp. in Kenya (Appendix Table S4).
716 All CoVs found in Miniopteridae clustered in a monophyletic group, including Miniopteridae
717 CoVs sequences from Africa, Asia, and Oceania (Appendix Table S4). The great majority of

718 α CoVs detected in Rhinolophidae bats clustered in two monophyletic groups (Figure 4); one
719 with African Rhinolophidae CoVs and one with Asian Rhinolophidae CoVs. We additionally
720 detected one CoV from *Rhinolophus rhodesiae*, which was 100% similar to a Miniopteridae
721 CoV from this study. Rhinonycteridae CoVs formed a single monophyletic group with NL63
722 Human CoVs. The Rhinonycteridae CoVs detected clustered with NL63-related bat sequences
723 found in *Triaenops afer* in Kenya (Figure 6) and showed 85% similarity to NL63 Human CoVs
724 (Appendix Table S4). Hipposideridae α -CoVs mainly clustered into a single monophyletic
725 group. Hipposideridae CoV sequences from this study clustered with a 229E Human CoV-related
726 bat sequence found in *Hipposideros vittatus* from Kenya (Figure 7) and demonstrated 93%
727 similarity to 229E Human CoV (Appendix Table S4).

728 Regarding the β -CoVs, two sequences obtained from *Nycteris thebaica* clustered in the
729 C-subgroup of β -CoVs together with other CoVs previously reported in African *Nycteris sp.*
730 bats (Figure 8). The sequences showed 88% nucleotide identity to a β -C CoV found in *Nycteris*
731 *gambiensis* in Ghana (Appendix Table S4). *Rousettus madagascariensis* CoV clustered with
732 Pteropodidae CoVs belonging to the D-subgroup of β -CoVs (Figure 9). BLAST queries against
733 the NCBI database showed 98% nucleotide identity between CoV sequences from *Rousettus*
734 *madagascariensis* and a β -D CoV sequence detected in *Eidolon helvum* from Kenya (Appendix
735 Table S4).

736

737 **Co-phylogeny between bats and CoVs**

738 Co-phylogeny tests were conducted using 11 Cyt *b* sequences obtained from the 11 CoVs
739 positive bat species and 27 partial CoV RdRp sequences (440 bp). Results supported coevolution
740 between the WIO bats and their CoVs (ParaFitGlobal = 0.04; $p = 0.001$) and a high level of
741 phylogenetic congruence (Figure 10).

742

743 **Discussion**

744 We provide evidence for a high diversity of CoVs in bat populations on WIO islands. The
745 overall prevalence of CoV positive bats was consistent with other studies from continental
746 Africa (5) and island systems in the Australasian region (24). However, in the case of WIO
747 islands, prevalence rates showed considerable variations based on bat family, species, landmass,
748 and season.

749 We found a significant effect of the roosting habitat on the probability of CoV detection,
750 with higher detection in bats occupying caves and buildings than outdoor habitats. Bats use
751 different types of day roosts sites, including caves, rock crevices, tree cavities, forest vegetation,
752 or synanthropic structures (25). Critical for this study, roosting site choice could be a risk factor
753 for infection of bats (26). This was indeed the case with higher detection rates for bats using
754 caves and buildings, as compared to other roost sites. Shelters like caves or buildings (bridges,
755 houses, etc.) may protect excreted viral particles from rainfall, temperature, humidity variation,
756 and ultraviolet radiation (27,28). Thus, these roost types may facilitate the maintenance and
757 transmission of viruses between syntopic species. Moreover, the accumulation of guano in these
758 confined environments compared to outdoor habitats could favor virus transmission in bat
759 populations. However, our investigation of infectious CoV particles in bat guano only detected
760 RNA, without demonstrating the infectious potential of viral particles from this environment
761 (29).

762 Host specificity is well known for some bat CoVs subgenera (30,31). For example, β -C
763 CoVs are largely associated with Vespertilionidae bats, whereas β -D CoVs are found mostly in
764 Pteropodidae (31,32). In our study, we showed that WIO bats harbor genetic structured CoVs,
765 of both α -CoV and β -CoV subclades, clustering mostly by bat family. In the new CoV taxonomy

766 based on full genomes proposed by the International Committee of Taxonomy of Viruses
767 (ICTV), α -CoVs and β -CoVs are split in subgenera mostly based on host families (33), reflected
768 in the subgenera names (e.g. Rhinacovirus for a Rhinolophidae α -CoV cluster, Minuacovirus
769 for a Miniopteridae α -CoV cluster, Hibecovirus for an Hipposideridae β -CoV cluster). Although
770 our classification was based on a partial sequence of the RdRp region, we identified sequences
771 from samples belonging to four of these subgenera (Minuacovirus, Duvinacovirus,
772 Rhinacovirus, and Nobecovirus) and three that could not be classified according to this
773 taxonomic scheme hence representing unclassified subgenera (we propose “Molacovirus”,
774 “Nycbecovirus”, and “Rhinacovirus2”).

775 In the context of WIO islands, we expect a strong geographical influence on CoVs diversity
776 rather than on host specificity, with independent evolution of CoVs on each island because of
777 spatial isolation and endemism. Anthony et al. (32) suggested that the dominant evolutionary
778 mechanism for African CoVs was host switching. In our study, congruence between host and
779 viral phylogenies suggests a strong signal for co-evolution between WIO bats and their
780 associated CoVs. This strongly suggests that individual bat species harbor specific CoV
781 lineages, but
782 CoV transmission between different bat species may nevertheless occur infrequently. However,
783 the geographical influence seems to occur within family specific groups, as in the WIO
784 Molossidae CoV clade. Endemism resulting from geographic isolation may then have favored
785 viral diversification within family specific viral lineages.

786 Although co-evolution could be the dominant mechanism, host-switching may take place in
787 certain situations. For example, in Mozambique we found a potential Miniopteridae CoV in a
788 Rhinolophidae bat co-roosting with Miniopteridae in the same cave. These host-switching
789 events could be favored when several bat species roost in the same portion of a cave *in sympatria*

790 (34). A similar scenario was described on Australia where *Miniopteridae* CoV was detected in
791 *Rhinolophidae* bats (24). These infrequent host-switching events show that spillovers can
792 happen but suggest that viral transmission is not maintained independently within the spillover
793 host. Thus, the co-evolution of virus and host might have resulted in strong adaptation of the
794 CoVs to the specific bat species. In addition, viral factors (mutation rate, recombination
795 propensity, replication ability in the cytoplasm, changes in the ability to bind host cells),
796 environmental factors (climate variation, habitat degradation, decrease of bat preys), and
797 phylogenetic relatedness of host species are also critical for the viral establishment in a novel
798 host (35). Nevertheless, apparent evidence of host switching as a dominant mechanism of CoV
799 evolution could be an artifact of a lack of data for some potential bat hosts, leading to incomplete
800 phylogenetic reconstructions (32).

801 Several bat CoVs we identified in *Rhinonycteridae* and *Hipposideridae* from Mozambique
802 had between 85% and 93% nucleotide sequence similarity with NL63 Human CoVs and 229E
803 Human CoVs, respectively. These two human viruses are widely distributed in the world and
804 associated with mild to moderate respiratory infection in humans (36). Tao et al. established that
805 the NL63 Human CoVs and 229E Human CoVs have a zoonotic recombinant origin from their
806 most recent common ancestor, estimated to be about 1,000 years ago (37). During the past
807 decade, they were both detected in bats in Kenya, and in Ghana, Gabon, Kenya, and Zimbabwe,
808 respectively (4,6,38,39). Moreover, CoVs notably similar to both NL63 and 229E have been
809 described in Kenya and Mozambique bats, suggesting an East African bats origin of these human
810 viruses. Intermediate hosts are important in the spillover of CoVs, despite gaps in direct and
811 indirect transmission routes of bat infectious agents to secondary hosts (40). This hypothesis has
812 been formulated for the 229E Human CoV, with an evolutionary origin in *Hipposideridae* bats
813 and with camelids as intermediate hosts (39). Similarly, the spillover of NL63 from
814 *Rhinonycteridae* bats to humans might have occurred through a currently unidentified

815 intermediate host (6,41,42). Because receptor recognition by viruses is the first essential cellular
816 step to infect host cells, CoVs may have spilt over into humans from bats through an intermediate
817 host possibly due to mutations on spike genes (6,43). Further investigations of CoVs in Kenyan
818 and Mozambican livestock and hunted animals could potentially provide information on the
819 complete evolutionary and emergence history of these viruses before their establishment in
820 humans.

821 MERS-like CoV, with high sequence similarity (>85%) to human and camel strains of
822 MERS-CoV, have been detected in *Neoromicia capensis* in South Africa and *Pipistrellus cf.*
823 *hesperidus* in Uganda, suggesting a possible origin of camel MERS-CoV in Vespertilionidae
824 bats (5,32,44). This family has been widely studied, with 30% of all reported bat CoVs
825 sequences from the past 20 years coming from vespertilionids (45), including MERS-like CoVs.
826 No members of this family were positive for CoV in our study, which may be associated with
827 the low number of individuals sampled; additional material is needed to explore potential
828 MERS-like CoV on Madagascar.

829 CoV transmission risk also depends on ecological factors and human actions such as
830 encroachment, landscape uses, and cultural traditions. On Madagascar, for example, bats are
831 hunted for commercial or personal consumption (46,47). Further, certain Malagasy ethnic
832 groups have cultural rituals associated with caves, including those with bat roosts (47). Indirect
833 contact with contaminated environments such as bat guano may also increase infection risk.
834 Given the strong co-evolution of CoV and bats in the WIO, there is the potential of human
835 populations being exposed to CoV spillovers, which in part depends on contact with day roost
836 sites and different ecological contexts, as well as the bat families present. Moreover, there is
837 evidence of a relationship between biodiversity loss and the risk of infectious disease emergence
838 (48).

839 At a worldwide scale, epidemiological studies with serological surveys on human
840 populations are necessary to investigate potential CoV transmission from bats to humans (49,50)
841 and should be considered on WIO islands. Even if CoV prevalence in bats is higher on
842 Madagascar than other oceanic islands around the world, the high CoV genetic diversity in
843 Malagasy bats could complicate the development of detection protocols in human populations.
844 On oceanic islands, however, the development of serological tests for particular coronaviruses
845 found in endemic bat species is achievable, and underlines the need to develop virus surveillance
846 in local populations based on results from bat studies.

847 **Acknowledgments**

848 We are very grateful to S. Muradrasoli for recommendations on the optimization of the
849 multiprobe PCR protocol as well as for providing PCR controls and to C. Cordonin for providing
850 bat
851 *Cyt b* sequences. L. Biscornet, C. Dionisio, L. Domergue, M. Dietrich, T. Mbohoahy, T. Neken, a,
852 J. Rakotoarivelo, M. Rakotomanga, C. F. Rakotondramanana, and A. Randrenjarison are
853 thanked for their assistance in the field. We also thank S. Bos and A. Hoarau for their help in
854 the laboratory, and K. Dellagi and H. Pascalis for the development and the management of the
855 ‘partenariat Mozambique-Réunion dans la recherche en santé: pour une approche intégrée
856 d’étude des maladies infectieuses à risque épidémique (MoZaR)’ research program.

857

858 **Funding**

859 Field research was funded by the ‘Pathogènes associés à la Faune Sauvage Océan Indien
860 (FSOD)’, the ‘Leptospirose Océan Indien (LeptOI)’, the ‘Paramyxovirus Océan Indien
861 (ParamyxOI)’, and the ‘Partenariat Mozambique-Réunion dans la recherche en santé : pour une

862 approche intégrée d'étude des maladies infectieuses à risque épidémique (MoZaR)' programs
863 (Fond Européen de Développement Régional, Programme Opérationnel de Coopération
864 Territoriale). Fieldwork on Mayotte was funded by the 'Centre National de la Recherche
865 Scientifique' (Projets Exploratoires Premier Soutien BATMAN). Molecular analyses were
866 financially supported by tutorship institutions of the UMR PIMIT. LJ is a recipient of a 'Région
867 Réunion, European Regional Development Funds (FEDER 2014-2020)' PhD fellowship. BR's
868 post-doctoral fellowship was supported by the 'Run Emerge' European Union's Seventh
869 Framework Program (FP7/2007–2013; Grant agreement NO 263958), the 'Fonds de
870 Coopération Régionale, Prefecture de La Réunion', and The Field Museum of Natural History,
871 Chicago, through the Ralph and Marian Falk Medical Research Trust. CL is supported by a
872 'Chaire mixte : Université de La Réunion – INSERM'. The funding agencies were not involved
873 in the study design, implementation or publishing of this study, and the research presented herein
874 represents the opinions of the authors but not necessarily the opinions of the funding agencies.

875

876 **References**

- 877 1. Reusken C, Obasanya J, Messori S, Vasconcelos P, Wilkinson A, Khellef N, et al. WHO
878 Research and Development Blueprint 2018 Annual review of diseases prioritized under
879 the Research and Development Blueprint Informal consultation. Geneva, Switzerland;
880 2018.
- 881 2. World Health Organization. Summary of probable SARS cases with onset of illness from
882 1 November 2002 to 31 July 2003 Based on data as of the 31 December 2003.
883 [Internet]. World Health Organization. 2003. Available from:
884 https://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/
- 885 3. World Health Organization. MERS situation update [Internet]. 2018. Available from:
886 <http://www.emro.who.int/health-topics/mers-cov/mers-outbreaks.html>
- 887 4. Bourgarel M, Pfukenyi DM, Boué V, Talignani L, Chiweshe N, Diop F, et al. Circulation
888 of alphacoronavirus, betacoronavirus and paramyxovirus in *Hipposideros* bat species in
889 Zimbabwe. *Infect Genet Evol.* 2018 Mar 1;58:253–7.
- 890 5. Ithete NL, Stoffberg S, Corman VM, Cottontail VM, Richards LR, Schoeman MC, et al.
891 Close relative of human Middle East respiratory syndrome coronavirus in bat, South
892 Africa. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(10):1697–9.

- 893 6. Tao Y, Shi M, Chommanard C, Queen K, Zhang J, Markotter W, et al. Surveillance of
894 bat coronaviruses in Kenya identifies relatives of human coronaviruses NL63 and 229E
895 and their recombination history. *J Virol*. 2017;91(5):e01953-16.
- 896 7. Razanajatovo NH, Nomenjanahary LA, Wilkinson DA, Razafimanahaka JH, Goodman
897 SM, Jenkins RK, et al. Detection of new genetic variants of betacoronaviruses in endemic
898 frugivorous bats of Madagascar. *Virol J*. 2015 Dec 12;12(1):42.
- 899 8. Wilkinson DA, Temmam S, Lebarbenchon C, Lagadec E, Chotte J, Guillebaud J, et al.
900 Identification of novel paramyxoviruses in insectivorous bats of the Southwest Indian
901 Ocean. *Virus Res*. 2012;170(1–2):159–63.
- 902 9. Wilkinson DA, Mélade J, Dietrich M, Ramasindrazana B, Soarimalala V, Lagadec E, et
903 al. Highly diverse morbillivirus-related paramyxoviruses in wild fauna of the
904 Southwestern Indian Ocean islands: evidence of exchange between introduced and
905 endemic small mammals. *J Virol*. 2014;88(15):8268–77.
- 906 10. Gomard Y, Dietrich M, Wieseke N, Ramasindrazana B, Lagadec E, Goodman SM, et al.
907 Malagasy bats shelter a considerable genetic diversity of pathogenic *Leptospira*
908 suggesting notable host-specificity patterns. *FEMS Microbiol Ecol*. 2016;92(4):fiw037.
- 909 11. Mélade J, Wieseke N, Ramasindrazana B, Flores O, Lagadec E, Gomard Y, et al. An
910 ecoepidemiological study of morbilli-related paramyxovirus infection in Madagascar bats
911 reveals host-switching as the dominant macro-evolutionary mechanism. *Sci Rep*. 2016
912 Apr 12;6:23752.
- 913 12. Lebarbenchon C, Ramasindrazana B, Joffrin L, Bos S, Lagadec E, Le Minter G, et al.
914 Astroviruses in bats, Madagascar. *Emerg Microbes Infect*. 2017;6:e58.
- 915 13. Muradrasoli S, Mohamed N, Hornyák Á, Fohlman J, Olsen B, Belák S, et al. Broadly
916 targeted multiprobe QPCR for detection of coronaviruses: coronavirus is common among
917 mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *J Virol Methods*. 2009;159(2):277–87.
- 918 14. Poon LLM, Chu DKW, Chan KH, Wong OK, Ellis TM, Leung YHC, et al. Identification
919 of a novel coronavirus in bats. *J Virol*. 2005 Feb;79(4):2001–9.
- 920 15. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation
921 for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2018.
- 922 16. Technelysium Pty. Ltd. Chromas Lite Software. 2018.
- 923 17. Grant BJ, Rodrigues APC, ElSawy KM, McCammon JA, Caves LSD. Bio3d: an R
924 package for the comparative analysis of protein structures. *Bioinformatics*. 2006 Nov
925 1;22(21):2695–6.
- 926 18. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary
927 Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol*. 2018;35(6):1547–9.
- 928 19. Keane TM, Creevey CJ, Pentony MM, Naughton TJ, McInerney JO. Assessment of
929 methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad
930 hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol Biol*. 2006 Mar 24;6:29.
- 931 20. QIAGEN. CLC Sequence Viewer 8. 2018.
- 932 21. Legendre P, Desdevises Y, Bazin E. A Statistical test for host-parasite coevolution. *Syst*
933 *Biol*. 2002;51(2):217–34.
- 934 22. Paradis E, Schliep K. ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary
935 analyses in R. *Bioinformatics*. 2018;1–3.
- 936 23. Conow C, Fielder D, Ovadia Y, Libeskind-Hadas R. Jane: a new tool for the cophylogeny
937 reconstruction problem. *Algorithms Mol Biol*. 2010 Feb 3;5:16.

- 938 24. Smith CS, de Jong CE, Meers J, Henning J, Wang L-F, Field HE. Coronavirus infection
939 and diversity in bats in the Australasian region. *Ecohealth*. 2016 Mar 5;13(1):72–82.
- 940 25. Kunz T, Lumsden L. Ecology of cavity and foliage roosting bats. In: Kunz TH, Fenton
941 M, editors. *Bat Ecology*. Chicago, USA: University of Chicago Press, 2005; 2006. p.
942 24.
- 943 26. Mühldorfer K, Speck S, Kurth A, Lesnik R, Freuling C, Müller T, et al. Diseases and
944 causes of death in European bats: dynamics in disease susceptibility and infection rates.
945 *PLoS One*. 2011;6(12):e29773.
- 946 27. Chan KH, Peiris JSM, Lam SY, Poon LLM, Yuen KY, Seto WH. The effects of
947 temperature and relative humidity on the viability of the SARS coronavirus. *Adv Virol*.
948 2011;2011:734690.
- 949 28. Fogarty R, Halpin K, Hyatt AD, Daszak P, Mungall BA. Henipavirus susceptibility to
950 environmental variables. *Virus Res*. 2008;132(1–2):140–4.
- 951 29. Wacharapluesadee S, Sintunawa C, Kaewpom T, Khongnomnan K, Olival KJ, Epstein
952 JH, et al. Group C betacoronavirus in bat guano fertilizer, Thailand. *Emerg Infect Dis*.
953 2019;13(8):1349–51.
- 954 30. Leopardi S, Holmes EC, Gastaldelli M, Tassoni L, Priori P, Scaravelli D, et al. Interplay
955 between co-divergence and cross-species transmission in the evolutionary history of bat
956 coronaviruses. *Infect Genet Evol*. 2018;58:279–89.
- 957 31. Cui J, Han N, Streicker D, Li G, Tang X, Shi Z, et al. Evolutionary relationships between
958 bat coronaviruses and their hosts. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(10):1526–32.
- 959 32. Anthony SJ, Johnson CK, Greig DJ, Kramer S, Che X, Wells H, et al. Global patterns in
960 coronavirus diversity. *Virus Evol*. 2017 Jan 1;3(1):vex012.
- 961 33. Ziebuhr J, Baric RS, Baker S, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva A, et al. ICTV Report
962 2017.013S. 2017.
- 963 34. Luis AD, Hayman DTS, O’Shea TJ, Cryan PM, Gilbert AT, Pulliam JRC, et al. A
964 comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? *Proc R
965 Soc B Biol Sci*. 2013;280(1756):20122753.
- 966 35. Parrish CR, Holmes EC, Morens DM, Park E-C, Burke DS, Calisher CH, et al.
967 Crossspecies virus transmission and the emergence of new epidemic diseases. *Microbiol
968 Mol Biol Rev*. 2008 Sep;72(3):457–70.
- 969 36. Dijkman R, van der Hoek L. Human coronaviruses 229E and NL63: close yet still so far.
970 *J Formos Med Assoc*. 2009;108:270–9.
- 971 37. Pyrc K, Dijkman R, Deng L, Jebbink MF, Ross HA, Berkhout B, et al. Mosaic structure
972 of human coronavirus NL63, one thousand years of evolution. *J Mol Biol*. 2006 Dec
973 15;364(5):964–73.
- 974 38. Pfefferle S, Oppong S, Drexler JF, Gloza-Rausch F, Ipsen A, Seebens A, et al. Distant
975 relatives of Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus and close relatives of human
976 coronavirus 229E in bats, Ghana. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:1377–84.
- 977 39. Corman VM, Baldwin HJ, Fumie Tateno A, Zerbinati RM, Annan A, Owusu M, et al.
978 Evidence for an ancestral association of human coronavirus 229E with bats. *J Virol*.
979 2015;89(23):11858–70.
- 980 40. Joffrin L, Dietrich M, Mavingui P, Lebarbenchon C. Bat pathogens hit the road: But
981 which one? *PLoS One*. 2018;14(8):e1007134.

- 982 41. El-Duah P, Meyer B, Sylverken A, Owusu M, Gottula LT, Yeboah R, et al. Development
983 of a whole-virus ELISA for serological evaluation of domestic livestock as possible hosts
984 of human coronavirus NL63. *Viruses*. 2019;11(43):v11010043.
- 985 42. Huynh J, Li S, Yount B, Smith A, Sturges L, Olsen JC, et al. Evidence supporting a
986 zoonotic origin of human coronavirus strain NL63. *J Virol*. 2012 Dec 1;86(23):12816–
987 25.
- 988 43. Cui J, Li F, Shi Z-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev*
989 *Microbiol*. 2019;17(March 2019):181–92.
- 990 44. Geldenhuys M, Mortlock M, Weyer J, Bezuidt O, Seamark ECJ, Kearney T, et al. A
991 metagenomic viral discovery approach identifies potential zoonotic and novel
992 mammalian viruses in *Neoromicia* bats within South Africa. *PLoS One*.
993 2018;13(3):e0194527.
- 994 45. Chen L, Liu B, Yang J, Jin Q. DBatVir: the database of bat-associated viruses. *Database*
995 (Oxford). 2014;2014:bau021.
- 996 46. Hobbs JJ. People and caves in Madagascar. *Focus Geogr*. 2010;46(3):1–7.
- 997 47. Fernández-Llamazares Á, López-Baucells A, Rocha R, Andriamitandrina SM,
998 Andriatafika ZE, Burgas D, et al. Are sacred caves still safe havens for the endemic bats
999 of Madagascar? *Oryx*. 2019;25(2):271–5.
- 1000 48. Wilkinson DA, Marshall JC, French NP, Hayman DTS. Habitat fragmentation,
1001 biodiversity loss and the risk of novel infectious disease emergence. *J R Soc Interface*.
1002 2018;15(149):20180403.
- 1003 49. Meyer B, Drosten C, Müller MA. Serological assays for emerging coronaviruses:
1004 Challenges and pitfalls. *Virus Res*. 2014 Dec 19;194:175–83.
- 1005 50. Wang L-F, Anderson DE. Viruses in bats and potential spillover to animals and humans.
1006 *Curr Opin Virol*. 2019;34:79–89.
- 1007

1008 **Data Accessibility:**

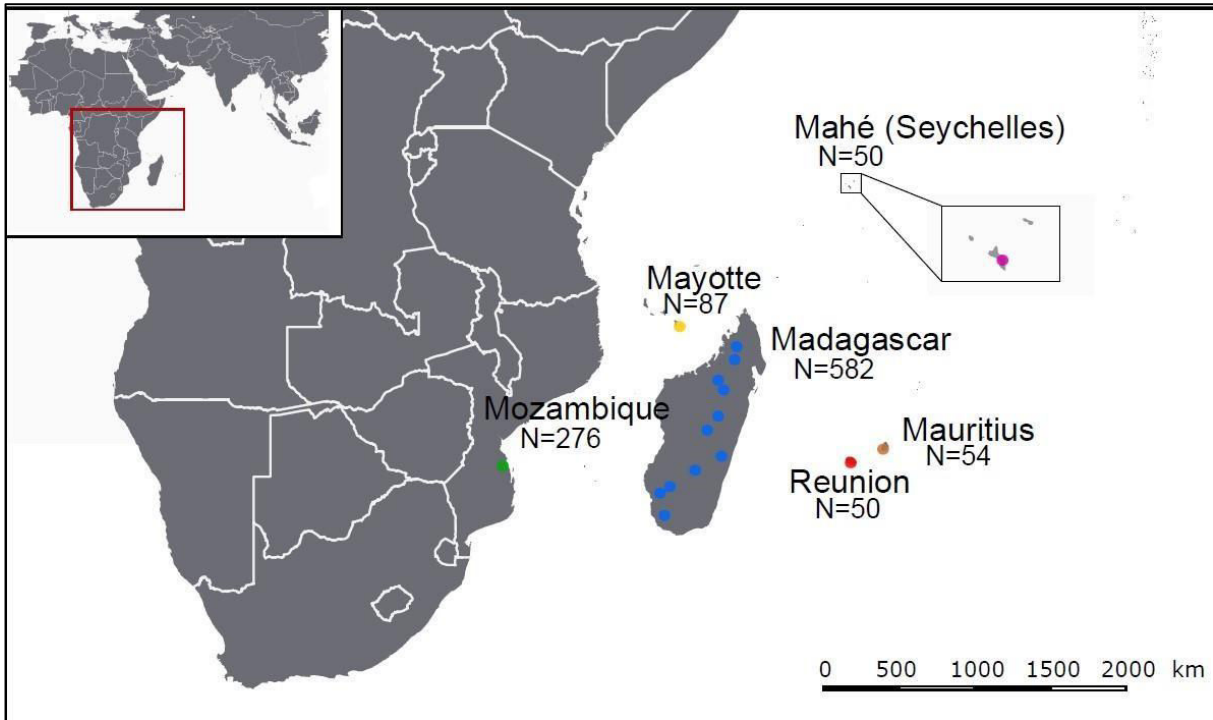
1009 - DNA sequences: Genbank accessions MN183146 to MN183273

1010

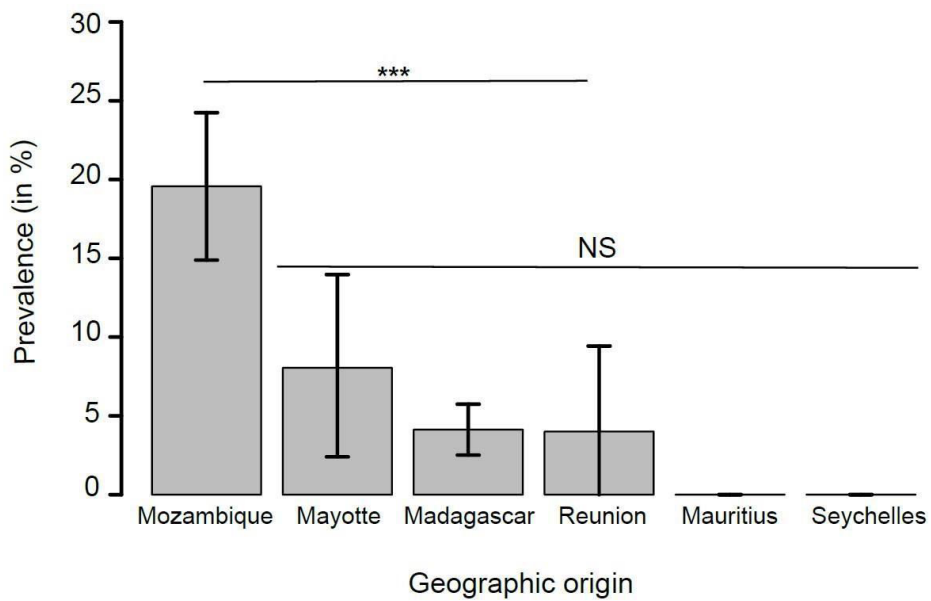
1011 **Author Contributions:** CL and LJ conceived and designed the study. BR, CL, DAW, EL, LJ,
1012 PT, SMG and YG collected biological material on Madagascar. SMG, RS and YG collected
1013 biological material on Mauritius. BR, EL and GLM, collected biological material on Mayotte.
1014 SMG, GLM, ADS and MCS, collected biological material in Mozambique. BR, DAW, EL and
1015 GLM collected biological material on Reunion Island. EL, GLM, SJ and YG collected
1016 biological material in the Seychelles. LJ performed the molecular analyses. CL and DAW
1017 analyzed the data. CL and LJ wrote the paper. SMG, ESG, MP, PM and SJ contributed to the
1018 project management in Malagasy, Mauritian, Seychelles, Mozambican, and French
1019 institutions. All authors edited, read, and approved the final manuscript.

1020

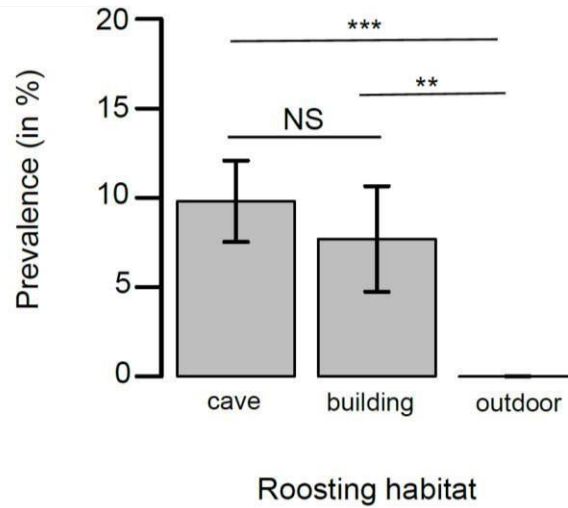
1021 Figures



1022
1023 **Figure 1.** Geographic distribution of the tested samples. N: number of bats sampled for each
1024 locality.



1025
1026 **Figure 2.** Mean CoV prevalence (\pm 95% confidence interval) in bats in the western Indian
1027 Ocean. Pairwise test; ***: $p < 0.001$; NS: $p > 0.05$, not significant.

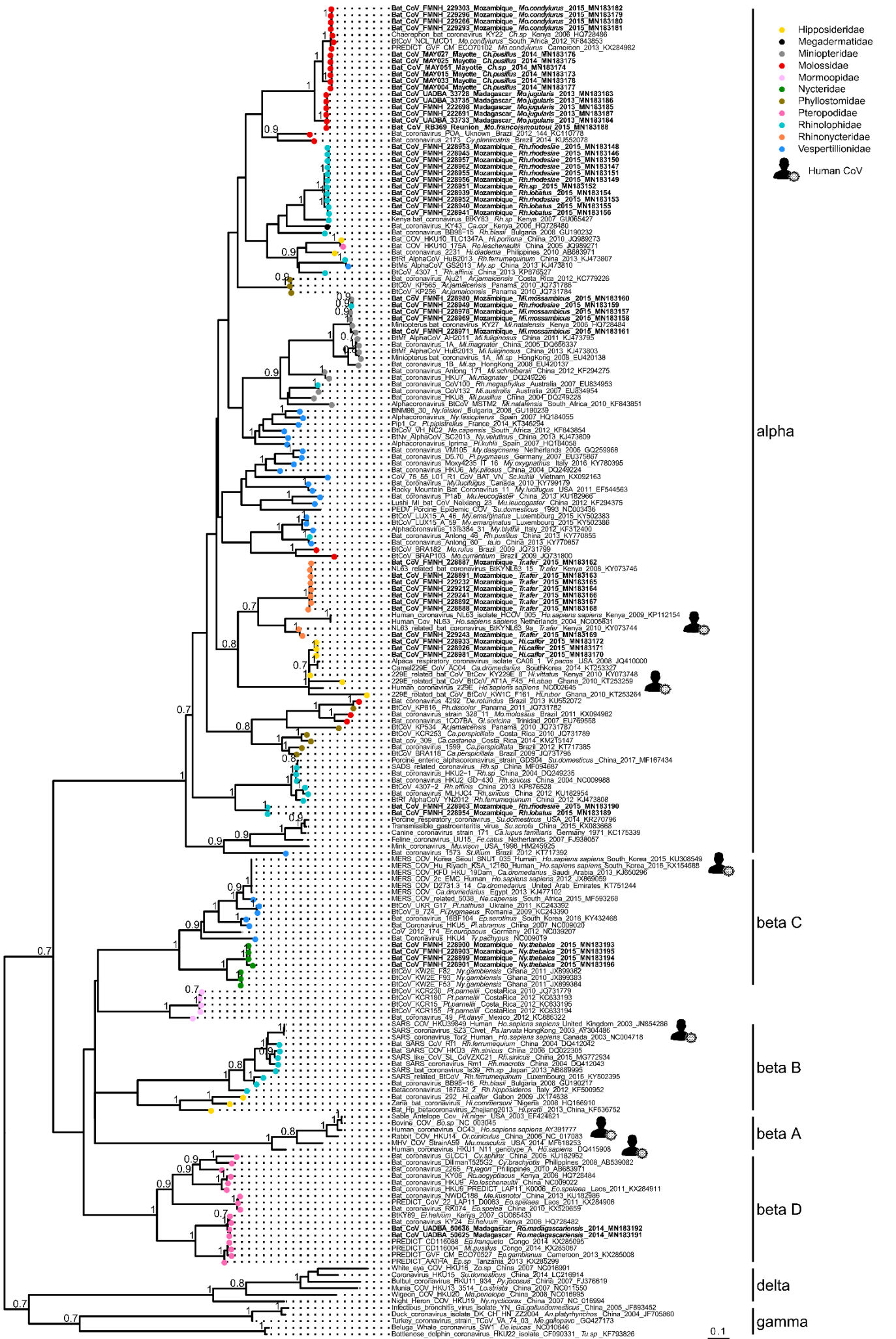


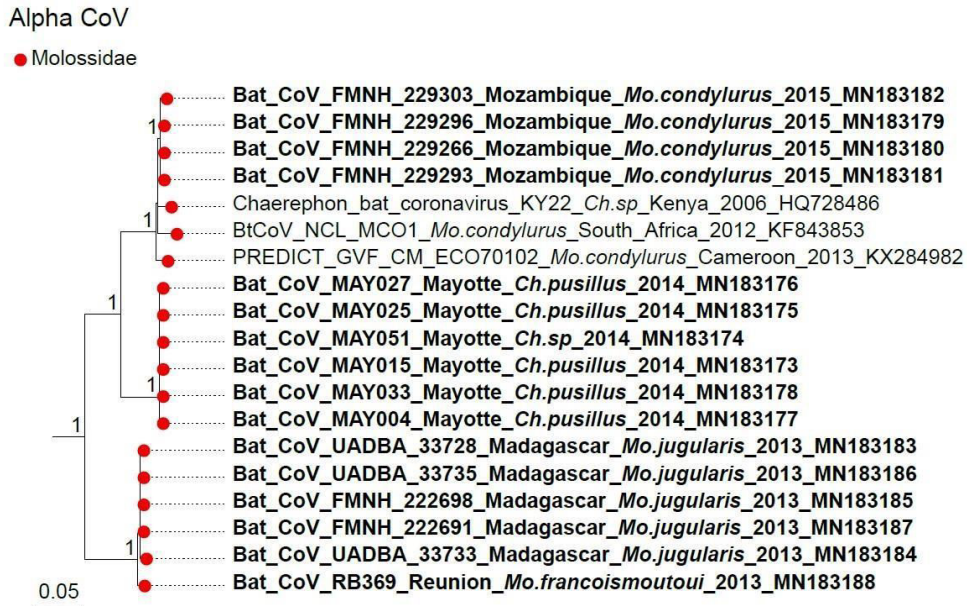
1028
1029

1030 **Figure 3.** Mean CoV prevalence (\pm 95% confidence interval) as function of the type of roosting
1031 habitat. Pairwise test; ***: $p < 0.001$; **: $p < 0.01$; NS: $p > 0.05$, not significant.

1032
1033
1034
1035
1036
1037
1038
1039
1040
1041
1042
1043
1044

1045 **Figure 4.** Maximum Likelihood (ML) consensus tree derived from 202 coronavirus (CoV)
1046 RNA-dependent RNA-polymerase partial nucleotide sequences (393 bp). Colored circles at
1047 the end of branches indicate bat family origin. Sequences in bold refer to bat CoVs detected in
1048 this study. Only bootstrap values > 0.7 are indicated on the tree. Scale bar indicates mean
1049 number of nucleotide substitutions per site. The tree was generated with the General Time
1050 Reversible evolutionary model (GTR+I+ Γ , I = 0.18, $\alpha = 0.64$) and 1000 bootstrap replicates





1051
 1052 **Figure 5.** Detail of the alpha CoV clade. Molossidae CoVs generated in the study are
 1053 indicated in bold. This sub-tree is a zoom on Molossidae CoV clade from the tree depicted in
 1054 Figure 4. Only bootstrap values >0.7 are indicated on the tree. Scale bar indicates mean
 1055 number of nucleotide substitutions per site.

1056



1057
 1058
 1059 **Figure 6.** Detail of the alpha CoV clade. NL63-like CoVs generated in the study are
 1060 indicated in bold. This sub-tree is a zoom on NL63 CoV clade from the tree depicted in Figure 4. Only
 1061 bootstrap values >0.7 are indicated on the tree. Scale bar indicates mean number of nucleotide
 1062 substitutions per site.



1063
 1064 **Figure 7.** Detail of the alpha CoV clade. 229E-like CoVs generated in the study are indicated
 1065 in bold. This sub-tree is a zoom on NL63 CoV clade from the tree depicted in Figure 4. Only
 1066 bootstrap values >0.7 are indicated on the tree. Scale bar indicates mean number of nucleotide
 1067 substitutions per site.



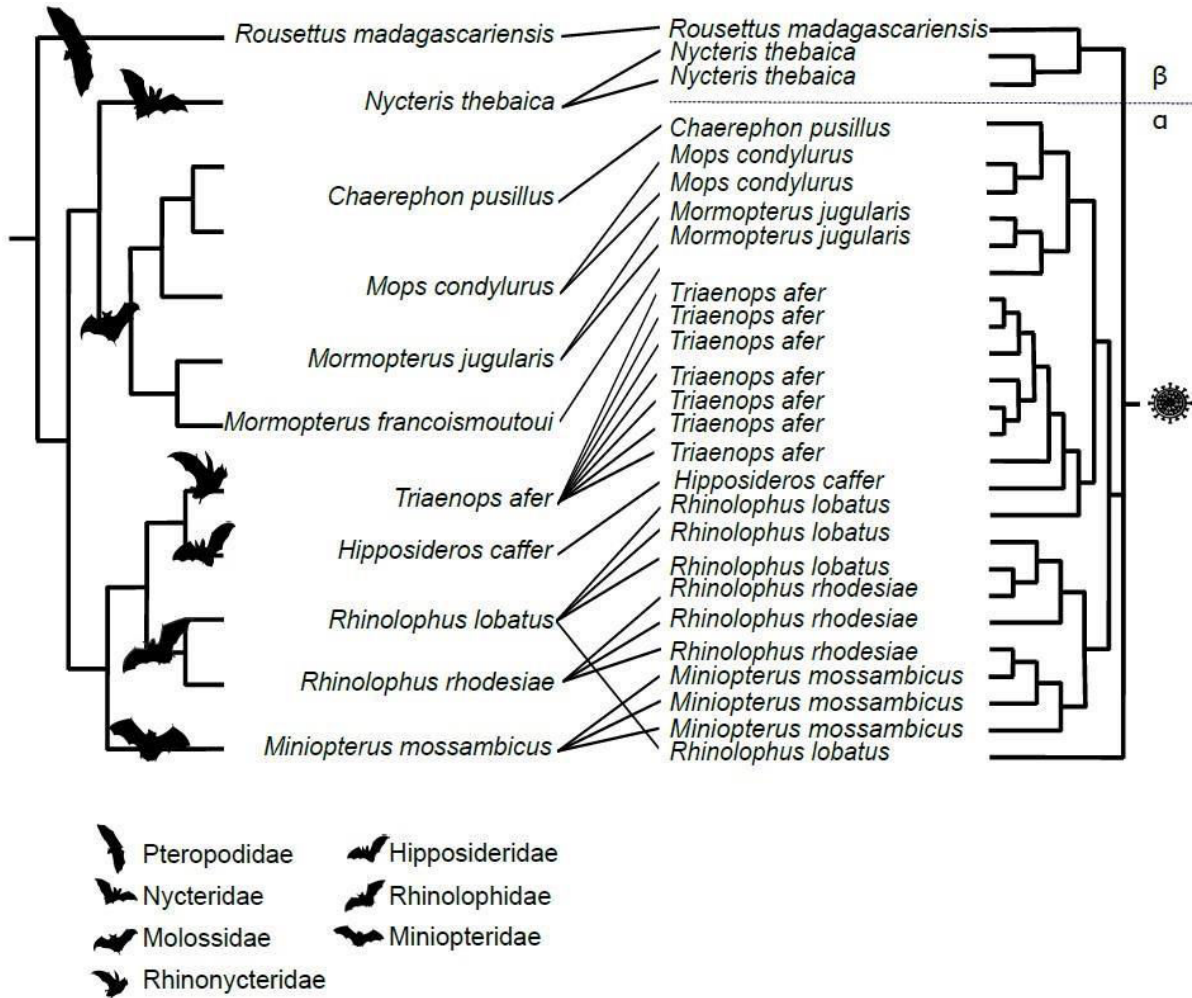
1068
 1069
 1070 **Figure 8.** Detail of the beta-C CoV clade. CoVs generated in the study are indicated in bold.
 1071 This sub-tree is a zoom on beta-C CoV clade from the tree depicted in Figure 4. Only
 1072 bootstrap values >0.7 are indicated on the tree. Scale bar indicates mean number of nucleotide
 1073 substitutions per site.



1074
1075

1076 **Figure 9.** Detail of the beta-D CoV. CoVs generated in the study are indicated in bold. This
1077 sub-tree is a zoom on beta-D CoV clade from the tree depicted in Figure 4. Only bootstrap
1078 values >0.7 are indicated on the tree. Scale bar indicates mean number of nucleotide
1079 substitutions per site.

1080



1081
 1082 **Figure 10.** Tanglegram representing host-virus co-evolution between bats of the western Indian
 1083 Ocean and their associated CoVs. Phylogeny of bats (left) was constructed with an alignment of
 1084 11 Cyt *b* sequences of 1,030 bp by Neighbor-Joining with 1,000 bootstrap iterations. Pruned
 1085 phylogeny of SWIO bats CoVs (right) was constructed with an alignment of 27 unique
 1086 sequences of 393 bp from SWIO bats CoVs, by Neighbor-Joining with 1,000 bootstrap
 1087 iterations.

Bat coronavirus phylogeography in the western Indian Ocean

Technical Appendix

Ethic statement and research permits

Reunion Island

Samples were collected as part of a previous study on lyssavirus infection in bats in the Indian Ocean (1), under a following research permit delivered by the Préfecture de La Réunion: Arrêté préfectoral du 11 Février 2013 and Arrêté préfectoral du 11 Septembre 2014 (N°2014-07).

Mauritius

Samples were collected as part of a previous study on lyssavirus infection in bats in the Indian Ocean (1), under a research permit delivered by the National Park and Conservation Service for authorization of Mauritius: Memorandum of agreement for the supply of biological material by Government of Mauritius, signed 17 December 2010 and 09 January 2013. CITES permit from the Mauritian national authority was issued for tissue export (permit MU120933) to the “Centre de Recherche et de Veille sanitaire de l’Océan Indien” on Reunion island.

Mayotte

Samples were collected as part of a previous study on lyssavirus infection in bats in the Indian Ocean (1), under a research permit delivered by the Préfecture de Mayotte: Arrêté N°158/DEAL/SEPR/2014.

Madagascar

Samples were collected as part of previous studies on infectious agents in Malagasy wildlife (1–4), under the following research permits and ethic approval delivered by Direction du Système des Aires Protégées and Direction Générale de l’Environnement et des Forêts; Madagascar National Parks: 350/10/MEF/SG/DGF/DCB.SAP/SCB, 032/12/MEF/SG/DGF/DCB.SAP/SCBSE, 067/12/MEF/SG/DGF/DCB.SAP/SCBSE, 194/12/MEF/SG/DGF/DCB.SAP/SCB, N°283/11/MEF/SG/DGF/DCB.SAP/SCB, N°077/12/MEF/SG/DGF/DCB.SAP/SCBSE, 238/14/MEEF/SG/ DGF/DCB.SAP/SCB and 268/14/MEEF/SG/DGF/DCB.SAP/SCB. A CITES permit from the Malagasy national authority was issued for tissue export (permit 243C-EA06/MG12) to CRVOI on Reunion island.

Mahe (Seychelles)

Samples were collected as part of a previous study on lyssavirus infection in bats in the Indian Ocean (1), under the following research permit and ethic approval delivered by the Direction of Wildlife, Trade and Conservation Section and the Ministry of Environment and Energy of Republic of Seychelles: Export permits Agreement of 5 March 2014. CITES permit from the Republic of Seychelles was issued for export (permit N°1772) to CRVOI on Reunion island.

Mozambique (Inhassoro district, Inhambane province)

Samples were collected as part of a previous study on astrovirus infection in bats in the Indian Ocean (5), under the following research permit and ethic approval delivered by the Museum of Natural History (Ref. 01/MHN/E.27/2015) and the Ministry of Health (N°S/N/SDI/0233/15).

Type of collected samples

All samples collected before 2014 were organs stored in liquid nitrogen in the field and then at -80°C upon arrival at the laboratory (Appendix Table 1). From 2014 onwards, feces, rectal, and oral swabs were collected from each individual bat (Appendix Table 1) and pooled in a 1.5 mL tube containing brain heart infusion medium (Conda, Madrid, Spain) supplemented with penicillin G (1,000 units/mL), streptomycin (1 mg/mL), kanamycin (0.5 mg/mL), gentamicin (0.25 mg/mL) and amphotericin B (0.025 mg/mL). Tubes were stored in liquid nitrogen in the field and at -80°C upon arrival at the laboratory.

REFERENCES

1. Mélade J, McCulloch S, Ramasindrazana B, Lagadec E, Turpin M, Pascalis H, et al. Serological Evidence of Lyssaviruses among Bats on Southwestern Indian Ocean Islands. Roques P, editor. PLoS One. 2016 ; 11: e0160553.
2. Wilkinson DA, Mélade J, Dietrich M, Ramasindrazana B, Soarimalala V, Lagadec E, et al. Highly Diverse Morbillivirus-Related Paramyxoviruses in Wild Fauna of the Southwestern Indian Ocean Islands: Evidence of Exchange between Introduced and Endemic Small Mammals. J Virol. 2014 ; 88 : 8268–77.
3. Gomard Y, Dietrich M, Wieseke N, Ramasindrazana B, Lagadec E, Goodman SM, et al. Malagasy bats shelter a considerable genetic diversity of pathogenic *Leptospira* suggesting notable host-specificity patterns. FEMS Microbiol Ecol. 2016 ; 92 : fiw037.
4. Mélade J, Wieseke N, Ramasindrazana B, Flores O, Lagadec E, Gomard Y, et al. An eco-epidemiological study of Morbilli-related paramyxovirus infection in Madagascar bats reveals host-switching as the dominant macro-evolutionary mechanism. Sci Rep. 2016 ;6 : 23752.
5. Hoarau F, Minter G Le, Joffrin L, Schoeman MC, Lagadec E, Ramasindrazana B, et al. Bat Astrovirus in Mozambique. Virol J. 2018 ; 15 : 104.

Appendix

Appendix tables

Table S1. Number of tested and positive samples, per location, bat family, species, samples types, and collection year.

Location	Bat family	Bat species	Collection Year	N tested	N tested per type of samples			N positive (%)				
					Organs		Feces	Swabs	Organs		Feces	Swabs
					Lung	Intestine			Lung	Intestine		
Madagascar	Hipposideridae	<i>Macronycteris commersoni</i>	2012	21		21						
	Miniopteridae	<i>Miniopterus manavi</i>	2012	21		21						
		<i>Miniopterus gleni</i>	2012	18		18						
			2014	2				2				
		<i>Miniopterus griveaudi</i>	2014	28				28				
		<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	2012	23		23						
		<i>Miniopterus sororculus</i>	2012	16		16						
		Molossidae	<i>Chaerephon atsinanana</i>	2013	34		34					
	<i>Chaerephon leucogaster</i>		2018	45				45				
	<i>Mops leucostigma</i>		2018	94				94				
	<i>Mops midas</i>		2012	19		19			4 (21.1)			
			2018	2				2				
	<i>Mormopterus jugularis</i>		2013	25		25			10 (40.0)			
			2014	41				41				
	<i>Otomops madagascariensis</i>		2012	12		12						
			2014	6				6				
	Pteropodidae		<i>Eidolon dupreanum</i>	2012	11		11					
		<i>Pteropus rufus</i>	2012	20		20						
		<i>Rousettus madagascariensis</i>	2014	45				45			6 (13.3)	
		Rhinonycteridae	<i>Paratriaenops furculus</i>	2014	32				32			
	<i>Triaenops menamena</i>		2012	25		25			2 (8.0)			
	2014		13				13			2 (15.4)		
Vespertilionidae	<i>Myotis goudoti</i>	2014	17				17					

		<i>Neoromicia malagasyensis</i>	2013	2		2						
		<i>Neoromicia matroka</i>	2013	4		4						
		<i>Neoromicia robertsi</i>	2013	1		1						
		<i>Pipistrellus hesperidus</i>	2014	5				5				
Mauritius	Molossidae	<i>Momopterus acetabulosus</i>	2012	6		6						
	Pteropodidae	<i>Pteropus niger</i>	2012	48	48							
	Emballonuridae	<i>Taphosius mauritianus</i>	2014	2				1				
Mayotte	Molossidae	<i>Chaerephon sp</i>	2014	4			4			1 (25.0) 7 (11.6)		
		<i>Chaerephon pusillus</i>	2014	60			60					
	Pteropodidae	<i>Pteropus seychellensis comorensis</i>	2014	22				22				
Mozambique	Hipposideridae	<i>Hipposideros caffer</i>	2015	63				63			10 (15.9)	
	Miniopteridae	<i>Miniopterus mossambicus</i>	2015	21				21			4 (19.0)	
	Molossidae	<i>Mops condylurus</i>	2015	57				57			11 (19.3)	
	Nycteridae	<i>Nycteris thebaica</i>	2015	14				14			4 (28.6)	
	Rhinolophidae	<i>Rhinolophus lobatus</i>	2015	9				9				6 (66.7)
		<i>Rhinolophus mossambicus</i>	2015	20				20				
		<i>Rhinolophus rhodesiae</i>	2015	35				35				9 (25.7)
		<i>Rhinolophus sp</i>	2015	1				1				1 (100)
	Rhinonycteridae	<i>Triaenops afer</i>	2015	51				51				9 (17.7)
	Vespertilionidae	<i>Neoromicia nana</i>	2015	3					3			
<i>Scotophilus viridis</i>		2015	2					2				
Reunion	Molossidae	<i>Mormopterus francoismoutoui</i>	2015	50				50			2 (4.0)	
Seychelles	Pteropodidae	<i>Pteropus seychellensis seychellensis</i>	2014	50	50	227	64	679	16	8	64	
		TOTAL										1099

Table S2. Cytochrome b gene sequences accession numbers from western Indian Ocean bats.
*: sequences generated for this study.

Bat family	Bat species	Cytb GenBank accession ID
Hipposideridae	<i>Hipposideros caffer</i>	FJ347980
Miniopteridae	<i>Miniopterus mossambicus</i>	MN273501*
Molossidae	<i>Chaerephon pusillus</i>	GQ489154
	<i>Mops condylurus</i>	GQ489181
	<i>Mormopterus francoismoutoui</i>	MN273499*
	<i>Mormopterus jugularis</i>	KR606332
Nycteridae	<i>Nycteris thebaica</i>	MN273500*
Pteropodidae	<i>Rousettus madagascariensis</i>	GU228727
Rhinolophidae	<i>Rhinolophus lobatus</i>	MN273497*
	<i>Rhinolophus rhodesiae</i>	MN273498*
Rhinonycteridae	<i>Triaenops afer</i>	EU798748

Table S3. Comparison of detection and sequencing PCR system of CoV positive bat species.

Location	Sampling year	Bat family	bat species	Detection system			Phylogeny system	
				N tested	N detected	N sequences	N tested	N sequences
Madagascar	2012	Molossidae	<i>Mops midas</i>	19	4	4	4	0
		Rhinonycteridae	<i>Triaenops menamena</i>	25	2	0	2	0
	2013	Molossidae	<i>Mormopterus jugularis</i>	25	10	7	10	5
		Pteropodidae	<i>Rousettus madagascariensis</i>	45	6	6	6	2
	2014	Rhinonycteridae	<i>Triaenops menamena</i>	13	2	2	2	0
Mayotte	2014	Molossidae	<i>Chaerephon sp</i>	5	1	1	1	1
			<i>Chaerephon pusillus</i>	73	7	7	7	5
Mozambique	2015	Hipposideridae	<i>Hipposideros caffer</i>	63	10	6	10	3
		Miniopteridae	<i>Miniopterus mossambicus</i>	21	4	4	4	4
		Molossidae	<i>Mops condylurus</i>	57	11	11	11	4
		Nycteridae	<i>Nycteris thebaica</i>	14	4	3	4	4
		Rhinolophidae	<i>Rhinolophus lobatus</i>	9	6	6	6	4
			<i>Rhinolophus rhodesiae</i>	35	9	9	9	9
			<i>Rhinolophus sp</i>	1	1	1	1	1
Rhinonycteridae	<i>Triaenops afer</i>	51	9	8	9	8		
Reunion	2015	Molossidae	<i>Mormopterus francoismoutoui</i>	50	2	2	2	1
					88	77	88	51

Table S4. Nucleotide sequence similarity obtained with BLAST.

ID	species	% identity	GENBANK Sequence	Accession GENBANK ID
MAY004	<i>Chaerephon pusillus</i>	92%	Chaerephon bat coronavirus/Kenya/KY22/2006 polyprotein (ORF1ab) gene	HQ728486
MAY015	<i>Chaerephon pusillus</i>	92%	Chaerephon bat coronavirus/Kenya/KY22/2006 polyprotein (ORF1ab) gene	HQ728486
MAY025	<i>Chaerephon pusillus</i>	92%	Chaerephon bat coronavirus/Kenya/KY22/2006 polyprotein (ORF1ab) gene	HQ728486
MAY027	<i>Chaerephon pusillus</i>	92%	Chaerephon bat coronavirus/Kenya/KY22/2006 polyprotein (ORF1ab) gene	HQ728486
MAY033	<i>Chaerephon pusillus</i>	92%	Chaerephon bat coronavirus/Kenya/KY22/2006 polyprotein (ORF1ab) gene	HQ728486
MAY051	<i>Chaerephon sp</i>	92%	Chaerephon bat coronavirus/Kenya/KY22/2006 polyprotein (ORF1ab) gene	HQ728486
RB369	<i>Mormopterus francoismoutoui</i>	90%	Chaerephon bat coronavirus/Kenya/KY22/2006 polyprotein (ORF1ab) gene	HQ728486
SMG18218	<i>Mormopterus jugularis</i>	90%	Chaerephon bat coronavirus/Kenya/KY22/2006 polyprotein (ORF1ab) gene	HQ728486
SMG18223	<i>Mormopterus jugularis</i>	90%	Chaerephon bat coronavirus/Kenya/KY22/2006 polyprotein (ORF1ab) gene	HQ728486
SMG18225	<i>Mormopterus jugularis</i>	90%	Chaerephon bat coronavirus/Kenya/KY22/2006 polyprotein (ORF1ab) gene	HQ728486
SMG18231	<i>Mormopterus jugularis</i>	90%	Chaerephon bat coronavirus/Kenya/KY22/2006 polyprotein (ORF1ab) gene	HQ728486
SMG18238	<i>Mormopterus jugularis</i>	90%	Chaerephon bat coronavirus/Kenya/KY22/2006 polyprotein (ORF1ab) gene	HQ728486
SMG18866	<i>Rousettus madagascariensis</i>	98%	Kenya bat coronavirus BtKY89 RNA-dependent RNA polymerase gene, partial cds	GU065433

SMG18930	<i>Rousettus madagascariensis</i>	98%	Kenya bat coronavirus BtKY89 RNA-dependent RNA polymerase gene, partial cds	<u>GU065433</u>
SMG18951	<i>Hipposideros caffer</i>	96%	229E-related bat coronavirus strain BtKY229E-8	<u>KY073748</u>
SMG18958	<i>Triaenops afer</i>	98%	NL63-related bat coronavirus strain BtKYNL63-15, complete genome	<u>KY073746</u>
SMG18970	<i>Nycteris thebaica</i>	88%	Betacoronavirus BtCoV/KW2E-F93/Nyc_spec/GHA/2010 RNAdependent RNA polymerase gene, partial cds; and spike glycoprotein gene, complete cds	<u>JX899383</u>
SMG18971	<i>Nycteris thebaica</i>	88%	Betacoronavirus BtCoV/KW2E-F93/Nyc_spec/GHA/2010 RNAdependent RNA polymerase gene, partial cds; and spike glycoprotein gene, complete cds	<u>JX899383</u>
SMG18972	<i>Nycteris thebaica</i>	88%	Betacoronavirus BtCoV/KW2E-F93/Nyc_spec/GHA/2010 RNAdependent RNA polymerase gene, partial cds; and spike glycoprotein gene, complete cds	<u>JX899383</u>
SMG18987	<i>Hipposideros caffer</i>	96%	229E-related bat coronavirus strain BtKY229E-8, complete genome	<u>KY073748</u>
SMG18990	<i>Rhinolophus lobatus</i>	87%	Kenya bat coronavirus BtKY83 RNA-dependent RNA polymerase gene, partial cds	<u>GU065427</u>
SMG18991	<i>Rhinolophus lobatus</i>	87%	Kenya bat coronavirus BtKY83 RNA-dependent RNA polymerase gene, partial cds	<u>GU065427</u>
SMG18992	<i>Rhinolophus lobatus</i>	87%	Kenya bat coronavirus BtKY83 RNA-dependent RNA polymerase gene, partial cds	<u>GU065427</u>
SMG18993	<i>Triaenops afer</i>	98%	NL63-related bat coronavirus strain BtKYNL63-15, complete genome	<u>KY073746</u>
SMG18996	<i>Triaenops afer</i>	98%	NL63-related bat coronavirus strain BtKYNL63-15, complete genome	<u>KY073746</u>

SMG18997	<i>Triaenops afer</i>	98%	NL63-related bat coronavirus strain BtKYNL63-15, complete genome	KY073746
SMG19002	<i>Hipposideros caffer</i>	96%	229E-related bat coronavirus strain BtKY229E-8, complete genome	KY073748
SMG19004	<i>Miniopterus mossambicus</i>	98%	Miniopterus bat coronavirus/Kenya/KY27/2006 polyprotein (ORF1ab) gene	HQ728484
SMG19006	<i>Miniopterus mossambicus</i>	97%	Miniopterus bat coronavirus/Kenya/KY27/2006 polyprotein (ORF1ab) gene	HQ728484
SMG19013	<i>Miniopterus mossambicus</i>	98%	Miniopterus bat coronavirus/Kenya/KY27/2006 polyprotein (ORF1ab) gene	HQ728484
SMG19015	<i>Miniopterus mossambicus</i>	98%	Miniopterus bat coronavirus/Kenya/KY27/2006 polyprotein (ORF1ab) gene	HQ728484
SMG19020	<i>Rhinolophus rhodesiae</i>	87%	Kenya bat coronavirus BtKY83 RNA-dependent RNA polymerase gene, partial cds	GU065427
SMG19024	<i>Rhinolophus rhodesiae</i>	98%	Miniopterus bat coronavirus/Kenya/KY27/2006 polyprotein (ORF1ab) gene	HQ728484
SMG19026	<i>Rhinolophus sp</i>	87%	Kenya bat coronavirus BtKY83 RNA-dependent RNA polymerase gene, partial cds	GU065427
SMG19027	<i>Rhinolophus rhodesiae</i>	87%	Kenya bat coronavirus BtKY83 RNA-dependent RNA polymerase gene, partial cds	GU065427
SMG19028	<i>Rhinolophus rhodesiae</i>	87%	Kenya bat coronavirus BtKY83 RNA-dependent RNA polymerase gene, partial cds	GU065427
SMG19029	<i>Rhinolophus lobatus</i>	82%	Rhinolophus bat coronavirus BtCoV/4307-2 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene, partial cds	KP876528
SMG19030	<i>Rhinolophus rhodesiae</i>	87%	Kenya bat coronavirus BtKY83 RNA-dependent RNA polymerase gene, partial cds	GU065427
SMG19031	<i>Rhinolophus rhodesiae</i>	87%	Kenya bat coronavirus BtKY83 RNA-dependent RNA polymerase gene, partial cds	GU065427

SMG19032	<i>Rhinolophus rhodesiae</i>	87%	Kenya bat coronavirus BtKY83 RNA-dependent RNA polymerase gene, partial cds	<u>GU065427</u>
SMG19037	<i>Rhinolophus rhodesiae</i>	87%	Kenya bat coronavirus BtKY83 RNA-dependent RNA polymerase gene, partial cds	<u>GU065427</u>
SMG19038	<i>Rhinolophus rhodesiae</i>	82%	Rhinolophus bat coronavirus BtCoV/4307-2 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene, partial cds	<u>KP876528</u>
SMG19141	<i>Mops condylurus</i>	98%	Chaerephon bat coronavirus/Kenya/KY22/2006 polyprotein (ORF1ab) gene	<u>HQ728486</u>
SMG19154	<i>Triaenops afer</i>	98%	NL63-related bat coronavirus strain BtKYNL63-15, complete genome	<u>KY073746</u>
SMG19174	<i>Triaenops afer</i>	98%	NL63-related bat coronavirus strain BtKYNL63-15, complete genome	<u>KY073746</u>
SMG19183	<i>Triaenops afer</i>	98%	NL63-related bat coronavirus strain BtKYNL63-15, complete genome	<u>KY073746</u>
SMG19185	<i>Triaenops afer</i>	98%	NL63-related bat coronavirus strain BtKYNL63-9a	<u>KY073744</u>
SMG19207	<i>Mops condylurus</i>	98%	Chaerephon bat coronavirus/Kenya/KY22/2006 polyprotein (ORF1ab) gene	<u>HQ728486</u>
SMG19210	<i>Mops condylurus</i>	98%	Chaerephon bat coronavirus/Kenya/KY22/2006 polyprotein (ORF1ab) gene	<u>HQ728486</u>
SMG19217	<i>Mops condylurus</i>	98%	Chaerephon bat coronavirus/Kenya/KY22/2006 polyprotein (ORF1ab) gene	<u>HQ728486</u>

Appendix Figure.

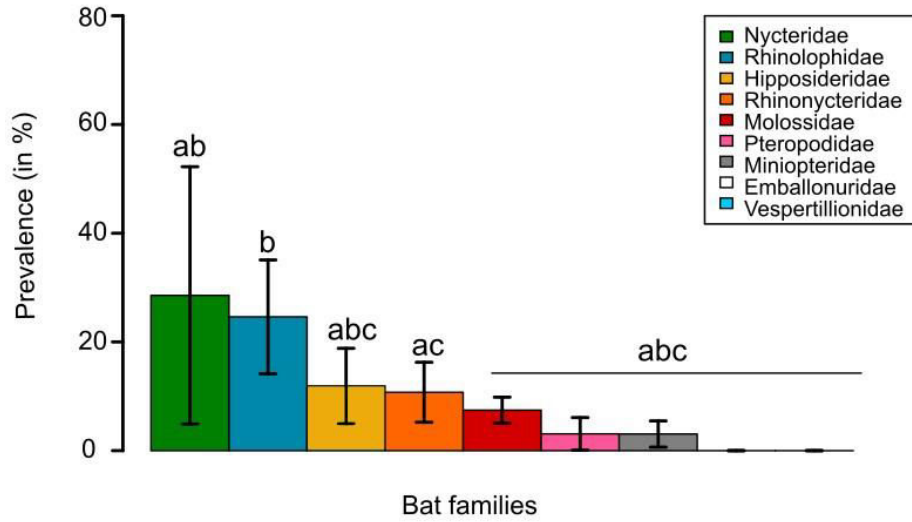


Figure S1. Mean CoV prevalence (\pm 95% confidence interval) as function of the bat family. Letters a–c above the bars refer to significantly different averages based upon a Pairwise test. Bars can have more than one letter to reflect the “overlap” between them.

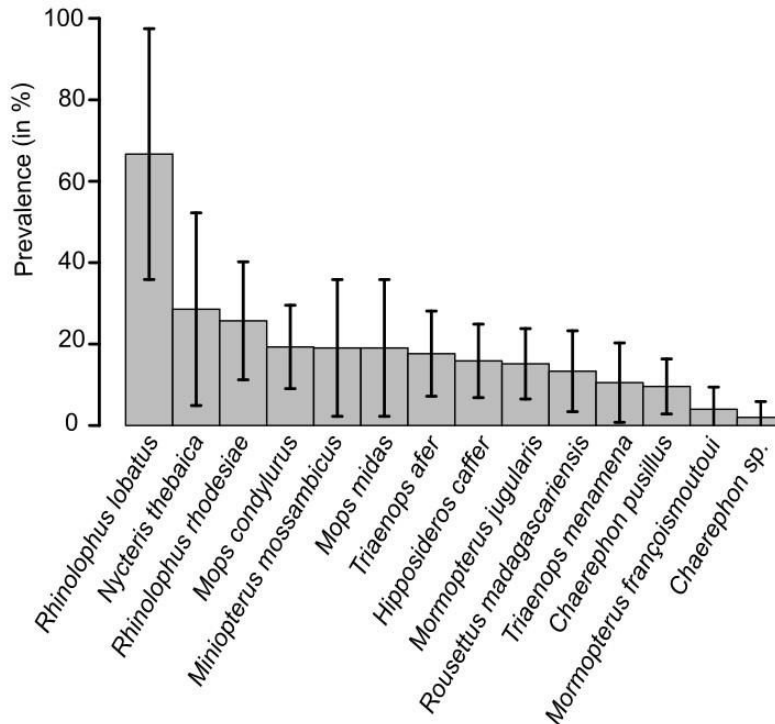


Figure S2. Mean CoV prevalence (mean \pm 95% confidence interval) as function of the bat species.

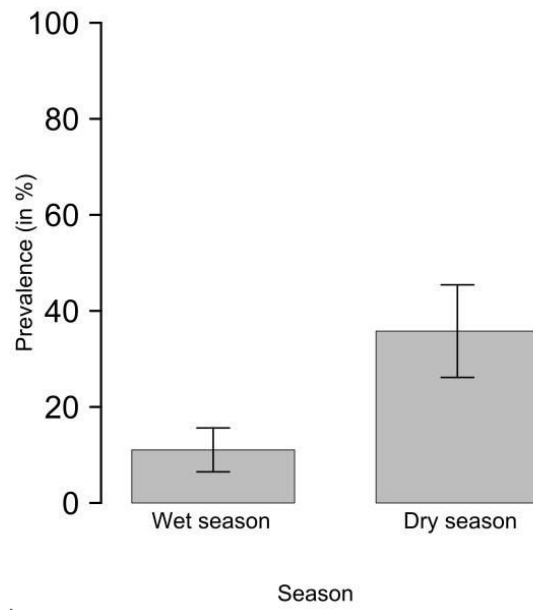


Figure S3. Mean CoV prevalence (mean \pm 95% confidence interval) as function of the bat season sampling in Mozambique.

II.4. Conclusion

Le but de ce chapitre était de mettre en avant le rôle des mécanismes évolutifs et des facteurs écologiques dans la structure génétique des coronavirus dans un système insulaire. Notre étude démontre la circulation de coronavirus dans les communautés de chauves-souris insectivores du Mozambique, de Mayotte, de La Réunion et de Madagascar. La prévalence globale de chauves-souris positives aux coronavirus (8%) est comparable avec les autres études menées en Afrique continentale (8%) et dans la région Australasienne (8%). Des variations de prévalences d'infections aux coronavirus ont été détectées, en fonction de la famille et des espèces hôtes, des types de gîtes exploités, des territoires et de la saison d'échantillonnage. Par ailleurs, notre étude a pu mettre en évidence chez les chauves-souris de la région une grande diversité de coronavirus, certains génétiquement liés à des coronavirus humains (*e.g.* HCoV-NL63, HCoV-229E, MERS-CoV) et formant des clusters en fonction des familles de chauves-souris.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux événements évolutifs qui pouvaient expliquer ces associations entre chauves-souris et coronavirus. Dans le contexte des îles de l'Océan Indien, la congruence observée entre les phylogénies des espèces hôtes et de leurs coronavirus est évidemment dépendante d'évènements de co-spéciation dû à l'isolement géographique des espèces de chauves-souris sur chaque île. Le test de la co-phylogénie entre les phylogénies des chauves-souris et la phylogénie des coronavirus a révélé une forte congruence, suggérant que cette coévolution étroite entre les chauves-souris de la région et les coronavirus qui leur sont associés. Cependant, nous avons également pu mettre en évidence l'influence de l'isolement géographique qui favoriserait la diversification virale au sein de chaque famille de chauves-souris, sur chaque île. Ainsi, la diversité et la structure phylogénétique des coronavirus détectés dans les îles de la région de l'ouest de l'Océan Indien dépendraient de mécanismes de coévolution entre les hôtes et ces coronavirus. Cependant, l'endémisme de ces chauves-souris sur certaines îles et la faible diversité spécifique en chauves-souris permet d'observer des mécanismes de spéciation qui conduisent à une évolution des coronavirus indépendante sur chaque île.

Chapitre III : Dynamiques d'infection chez les chauves-souris

III.1. Dynamiques d'infection chez les chauves-souris et risques de transmission, généralités

III.1.1. Rôle des déplacements des hôtes

Les variations saisonnières dans les prévalences d'infection d'agents infectieux et dans les risques d'émergences chez l'Homme pourraient dépendre des changements dans les densités de chauves-souris au cours de la formation de colonies, par exemple lors de migrations saisonnières pour la reproduction ou pour la recherche de ressources alimentaires (Altizer et al. 2006; Altizer et al. 2011). L'étude de l'épidémie au virus Ebola en République Démocratique du Congo en 2007 a mis en évidence le rôle des migrations saisonnières de chauves-souris dans les risques de transmission de ce virus aux populations humaines alentours (Leroy et al. 2009). Chaque année au mois d'avril, des dizaines de milliers de chauves-souris frugivores (*Epomops franqueti* et *Hypsignathus monstrosus*), suspectées comme réservoir du virus Ebola, migrent massivement au sud-est de la rivière Lula sur les îles de Ndongo et Koumulele (Leroy et al. 2009). L'abondance d'arbres fruitiers dans cette région ainsi que la présence depuis 1925 d'une plantation de palmiers à huile favoriseraient le choix de ce site par les chauves-souris à cette période de l'année (Leroy et al. 2009). De plus, les chauves-souris représentent une part importante de l'alimentation des habitants de la zone à cette période de l'année, augmentant ainsi les risques de transmission de virus lors de la chasse, de la préparation et de la consommation de ces animaux (Leroy et al. 2009).

Les migrations surviennent également en réponse à des perturbations de l'écologie des espèces, soit d'origines anthropique ou climatique extrême (Chua et al. 2002; Pulliam et al. 2012; Streicker et al. 2016; Buceta et Johnson 2017; Seltsmann et al. 2017; Afelt et al. 2018). Le couplage de perturbations anthropiques et de phénomènes climatiques extrêmes serait notamment à l'origine de l'épidémie humaine de virus Nipah en Malaisie en 1998 (Chua et al. 2002). Selon les auteurs de ces travaux, la déforestation importante de certaines régions d'Asie du sud-est en 1997 aurait diminué la disponibilité des ressources alimentaires pour certaines espèces de chauves-souris frugivores, et notamment pour *Pteropus vampyrus* identifiée comme réservoir du virus Nipah (Chua et al. 2002). À la même période, un événement climatique extrême (*El Niño Southern Oscillation*) aurait provoqué une sécheresse dans la région, réduisant la floraison et la fructification des arbres forestiers compris dans le régime alimentaire des chauves-souris frugivores. La conjonction de ces deux facteurs aurait contraint ces chauves-

souris à se déplacer en direction de vergers installés près des fermes porcines. Cependant, Pulliam et collaborateurs (2011) réfutent le rôle d'*El Niño Southern Oscillation* étant donné que ce phénomène a commencé à la fin de l'année 1997 alors que quelques cas de Nipah avaient déjà été détectés chez l'Homme en Malaisie au début de cette même année (Pulliam et al. 2012).

III.1.2. Influence du sexe

Chez les animaux, les dynamiques d'infection sont également influencées par des différences comportementales et physiologiques (*e.g.* hormonales) associées au sexe (Zuk et McKean 1996). Les Nycteribiidae et les Streblidae sont deux familles de diptères ectoparasites hématophages qui peuvent être porteurs d'agents infectieux, notamment de bactéries des genres *Bartonella* et *Rickettsia*, mais aussi de parasites comme les filaires nématodes du genre *Polychromophilus* sp. Le rôle de ces ectoparasites dans la transmission de ces agents infectieux entre chauves-souris ou à d'autres animaux demeure cependant incertain (Morse et al. 2012a; Brook et al. 2015; Ramasindrazana et al. 2016; Wilkinson et al. 2016; Obame-Nkoghe et al. 2016; Beltz 2018; Do Amaral et al. 2018). Un exemple révélateur est l'espèce *Rousettus madagascariensis*, naturellement parasitée par deux espèces de diptères hématophages: *Eucampsipoda madagascariensis* et *Megastrebla wenzeli* (Rajemison et al. 2017). En effet, Rajemison et collaborateurs ont échantillonné plus de 3 500 diptères hématophages sur 639 chauves-souris d'une colonie située à l'extrémité nord du parc national d'Ankarana à Madagascar. Les résultats ont montré que les mâles adultes *R. madagascariensis* sont significativement plus parasités par *Eucampsipoda madagascariensis* que les femelles adultes. Cependant, aucune différence de la charge parasitaire liée au sexe de l'hôte n'a pu être trouvée pour l'espèce *Megastrebla wenzeli*. L'influence du sexe sur la charge parasitaire pourrait être liée à la morphologie de l'abdomen des chauves-souris femelles qui serait plus large et plus volumineux que celui des mâles, augmentant le succès de nettoyage de leurs ectoparasites pendant le toilettage par rapport aux mâles (Rajemison et al. 2017).

Les différences de dynamiques d'infection liées au sexe peuvent également influencer la dispersion des agents infectieux (Streicker et al. 2016). En 2016, Streicker et collaborateurs ont étudié la dispersion spatiale de lyssavirus transmis par les chauves-souris vampires *Desmodus rotundus* en Amérique du sud (Streicker et al. 2016). L'analyse phylogéographique a été réalisée sur 352 chauves-souris par criblage et séquençage à la fois de marqueurs mitochondriaux (Cytochrome *b*) et nucléaires (microsatellites) ainsi que du gène de la

nucléoprotéine de 264 virus isolés chez le bétail péruvien entre 1997 et 2012 (Streicker et al. 2016). Les résultats ont révélé la circulation de 3 lignées L1, L2 et L3 dans des régions géographiques distinctes (Streicker et al. 2016). La comparaison des différentes phylogénies selon les marqueurs a pu confirmer l'existence de philopatrie des femelles *Desmodus rotundus*, et une dispersion plus importante des mâles (Streicker et al. 2016). La congruence observée entre la phylogénie des marqueurs nucléaires des hôtes et la phylogénie virale a ainsi permis de mettre en évidence le rôle des mâles dans la dispersion des lyssavirus dans cette région d'Amérique du sud (Streicker et al. 2016).

III.1.3. Saisonnalité de la reproduction

Les dynamiques d'infection sont également associées aux cycles de reproduction des hôtes, et en particulier à la formation de colonies de maternités où plusieurs milliers d'individus peuvent se regrouper pour la mise bas (Wacharapluesadee et al. 2010; Turmelle et al. 2010; Amman et al. 2012; Peel et al. 2014; Dietrich et al. 2015). La majorité des espèces de chauves-souris en milieu tempéré, subtropical et tropical mettent bas de manière plus ou moins synchronisée dans des gîtes communs, à fréquence annuelle ou biannuelle selon les espèces (Kunz 1982). La circulation d'agents infectieux dans les colonies pourrait dépendre du nombre de saisons de reproduction par an et de la synchronie de la parturition (Peel et al. 2014; Hayman 2015).

La rousette d'Égypte (*Rousettus aegyptiacus*) est identifiée comme le réservoir du virus Marburg (Swanepoel et al. 2007; Towner et al. 2009). En 2012, Amman et collaborateurs ont réalisé un suivi temporel de la dynamique d'infection de ce virus chez les chauves-souris en Ouganda pour étudier les facteurs écologiques impliqués dans la transmission à l'Homme (Amman et al. 2012). La détection du génome viral dans les organes (foie et rate) de 1 622 *Rousettus aegyptiacus* a révélé la présence du virus Marburg chez 40 individus (2,5 % des chauves-souris testées (Amman et al. 2012). Cependant, les analyses sérologiques ont mis en évidence la présence de anticorps dirigés contre le virus Marburg dans le sérum de 15 % des individus échantillonnés, suggérant un maintien de la transmission dans ces colonies (Amman et al. 2012). La probabilité de détection du virus en fonction de l'âge est par ailleurs significativement plus élevée chez les juvéniles (5%) que chez les adultes (1%) (Amman et al. 2012). La probabilité de détection du virus au cours de la saison de maternité semble

également dépendre de l'âge des juvéniles, puisque seuls 3% des juvéniles âgés de 3 mois sont détectés positifs au virus Marburg contre 10 à 15% des juvéniles âgés de 6 mois (Amman et al. 2012). Chez les adultes en revanche, la probabilité de détection ne varie pas au cours de la saison, suggérant un lien entre la structure de la population et la dynamique d'infection, avec une augmentation de la prévalence d'infection quelques mois après la parturition (Amman et al. 2012).

III.1.4. Rôle des anticorps maternels

Le décalage observé entre la mise bas et les pics d'infection de certains agents infectieux pourrait être expliqué par la protection assurée par les anticorps maternels prénataux *via* le placenta, ou par les anticorps maternels postnataux *via* l'ingestion du colostrum et par l'allaitement (Boulinier et Staszewski 2008). Les immunoglobulines (Ig) G sont la seule classe d'immunoglobulines à traverser le placenta, et pourraient alors jouer un rôle important dans la protection des fœtus et nouveaux nés contre des infections systémiques (Boulinier et Staszewski 2008). Cependant, d'autres immunoglobulines comme les IgA, IgE et IgM transmissibles pendant l'allaitement pourraient également être impliquées, notamment dans la protection des infections intestinales chez les nouveaux nés (Boulinier et Staszewski 2008). Chez les chauves-souris, plusieurs études ont exploré l'influence des anticorps maternels (dont les IgG) sur les dynamiques d'infection de différents virus comme les lyssavirus avec le « Lagos bat virus » (Hayman et al. 2018; Peel et al. 2018), les paramyxovirus avec les virus Nipah et Hendra (Sohayati et al. 2011; Epstein et al. 2013; Baker et al. 2014; Peel et al. 2018; Jeong et al. 2019) ou les filovirus avec le virus Marburg (Hayman 2015; Storm et al. 2018). Le suivi du statut sérologique de 12 *Pteropus vampyrus* en captivité (nouveaux nés, juvéniles et adultes) a permis de déterminer que les anticorps maternels contre le virus Nipah pouvait être détectés 9 à 14 mois après la naissance (Sohayati et al. 2011). Cependant, la modélisation de la dynamique des anticorps maternels contre les henipavirus chez *Eidolon helvum* a permis d'estimer une durée moyenne de la persistance des anticorps maternels à 6,7 mois (Peel et al. 2018).

III.2. Dynamiques d'infection de coronavirus

III.2.1. Influence de l'âge

Les dynamiques d'infection de coronavirus chez les chauves-souris dépendent également de la structure des populations dans les colonies, et notamment de l'âge des individus, avec une probabilité de détection de coronavirus significativement plus élevée chez les individus juvéniles que chez les adultes chez plusieurs espèces (Gloza-Rausch et al. 2008; Drexler et al. 2011; Osborne et al. 2011; Annan et al. 2013; Wacharapluesadee et al. 2018). Annan et collaborateurs (2013) ont analysé les fèces de 4 758 chauves-souris du Ghana et 272 chauves-souris d'Europe pour rechercher la présence de β -CoV par RT-PCR (Annan et al. 2013). La présence de β -CoV a été confirmée chez 25% des 185 chauves-souris du genre *Nycteris* (Annan et al. 2013). La détection de coronavirus chez *Nycteris cf. gambiensis* au Ghana variait selon l'âge des individus, avec 45% (10/22) des juvéniles positifs aux coronavirus contre 22 % des adultes (36/161) (Annan et al. 2013). Wacharapluesadee et collaborateurs ont réalisé une étude longitudinale pendant 1 an sur 3 sites pour investiguer la circulation de coronavirus chez l'espèce *Pteropus lylei*, en Thaïlande (Wacharapluesadee et al. 2018). Cette étude a également démontré une prévalence d'infection plus élevée chez les juvéniles que chez les adultes (Wacharapluesadee et al. 2018).

III.2.2. Influence de la saison de maternité

En plus de l'influence de l'âge, le statut reproducteur des femelles pourrait également avoir un effet sur les dynamiques d'infection des coronavirus (Gloza-Rausch et al. 2008; Annan et al. 2013). En effet, comme vu précédemment, les femelles allaitantes auraient une probabilité plus élevée d'être infectées par des coronavirus que les femelles non-allaitantes ; cependant, il n'y aurait pas d'effet de la grossesse sur la probabilité de détection de coronavirus (Gloza-Rausch et al. 2008; Annan et al. 2013). Afin d'investiguer le lien entre les dynamiques d'infection de coronavirus et la structure de la population, des études longitudinales de suivi de prévalences d'infection dans les colonies ont été réalisées (Drexler et al. 2011 ; Baldwin et al. 2015 ; Wacharapluesadee et al. 2018). En 2011, Drexler et collaborateurs ont suivi la dynamique d'infection de coronavirus dans une colonie de maternité de *Myotis myotis* en Allemagne (Drexler et al. 2011). En 2008 et 2010, 5 sessions par saison ont permis d'échantillonner 975 et 935 fèces (Drexler et al. 2011). La proportion de détection de

coronavirus dans les fèces variait de 10% à 100% en fonction des sessions d'échantillonnages (Drexler et al. 2011). Des dynamiques d'infection similaires ont pu être observées entre les deux saisons, avec la présence de 2 pics d'infection: un premier pic à l'établissement de la colonie de maternité, et un second plus important environ 1 mois après la parturition (Drexler et al. 2011).

En 2015 au Ghana, Baldwin et collaborateurs ont réalisé une étude longitudinale sur le rôle de facteurs écologiques et démographiques (âge, statut reproducteur, sexe, condition corporelle et date d'échantillonnage) sur le risque d'infection de chauves-souris aux coronavirus (Baldwin et al. 2015). Pour ce faire, plus de 7 000 fèces de 17 espèces de chauves-souris réparties en 10 colonies ont été échantillonnées pendant 2 ans (2010 à 2012) et testés par RT-PCR (Baldwin et al. 2015). L'exploration des facteurs par l'utilisation de GLMM binomiaux sur 3 espèces (*Hipposideros abae*, *Hipposideros ruber* et *Nycteris cf. gambiensis*) a pu mettre en évidence l'influence du mois de capture sur les taux de détection de coronavirus chez ces chauves-souris, avec les prévalences les plus fortes entre avril et mai, correspondant au début de la période de mise bas et de la période de nurserie pour les 3 espèces (Baldwin et al. 2015).

III.3. Dynamique d'infection de coronavirus dans une colonie de maternité à La Réunion

III.3.1. Modèle d'étude

Le Petit Molosse de La Réunion (*Mormopterus francoismoutoui*) est l'espèce de chauves-souris la plus abondante à La Réunion et la seule espèce de mammifère endémique de l'île. Bien que d'autres espèces de chauves-souris vivent sur l'île (*Taphozous mauritanus* et *Pteropus niger*), les colonies de *M. francoismoutoui* connues à ce jour sont monospécifiques, limitant les possibilités de transmission d'agents infectieux entre espèces. La colonie du site de Trois Bassins est la plus grande colonie identifiée à ce jour, et compte plus de 35 000 individus volants lors de la saison de reproduction (Dietrich et al. 2015). Dans le cadre de cette thèse, nous avons réalisé une étude longitudinale sur la circulation de CoVs dans cette colonie afin (i) d'estimer les variations de prévalences d'infections associées aux changements de structure de la population hôte et (ii) d'explorer la persistance des CoVs dans l'environnement pendant et hors saison de maternité.

III.3.2. Méthodologie

Échantillonnage

Une stratégie d'échantillonnage non invasive a été mise en place pour éviter la manipulation directe des chauves-souris et limiter les perturbations dans la colonie. Afin de suivre à une échelle fine la dynamique d'infection de chauves-souris et la persistance environnementale de coronavirus dans cette colonie de maternité, les échantillons ont été collectés toutes les deux à trois semaines entre juin 2016 et juin 2018 (**Figure 17**).

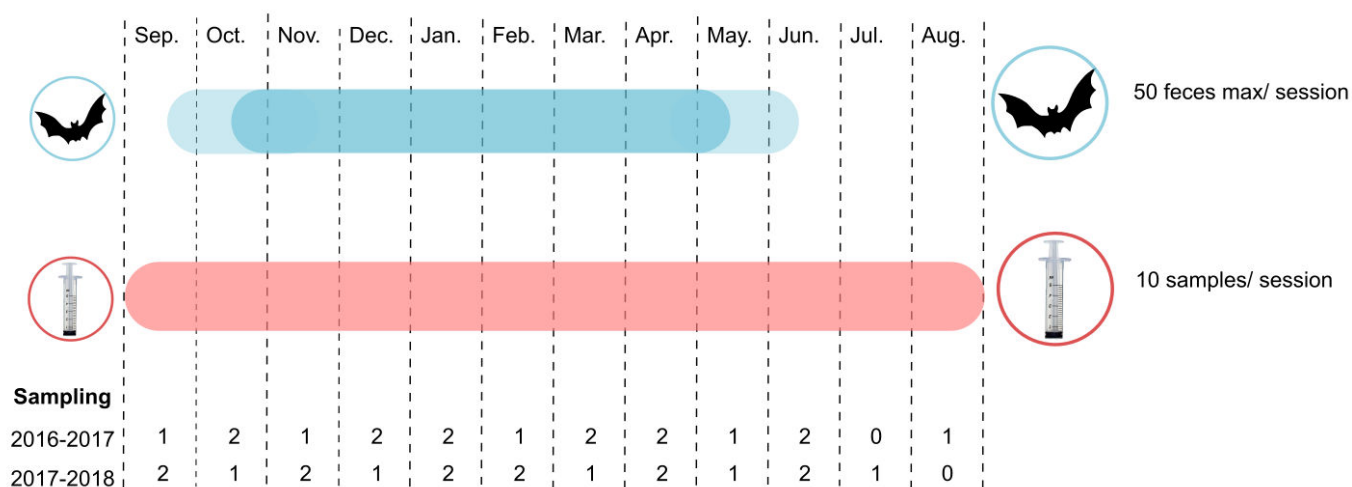


Figure 17. Fréquence d'échantillonnage de fèces et de guano entre juin 2016 et juin 2018.

Des fèces fraîches ont été collectées à l'intérieur de la grotte en plaçant des feuilles de benchguard® sous des groupes de chauves-souris (**Figure 18a et 18b**). Cinq feuilles de benchguard® ont été placées dans sept zones différentes de la grotte, afin d'évaluer s'il existait une variation spatiale potentielle d'excrétion des CoVs au sein de la colonie. Le placement des cinq feuilles de benchguard® sur les sept zones de la grotte dépendait de l'emplacement de la colonie de chauves-souris et était également dépendant de l'accès aux différentes zones en période de mise bas, afin de limiter le dérangement de la colonie. Entre 12 et 50 fèces fraîches ont été collectées sur chaque feuille benchguard® lors de chaque séance d'échantillonnage et placées dans 1,5 mL de milieu de transport de virus (VTM ; Lebarbenchon et al. 2017). Les échantillons ont été placés dans une glacière avec des blocs de glace sur le terrain puis conservés dans un congélateur à -80 °C de retour au laboratoire. Au total, 1 080 échantillons ont été collectés sur les deux années de l'étude.

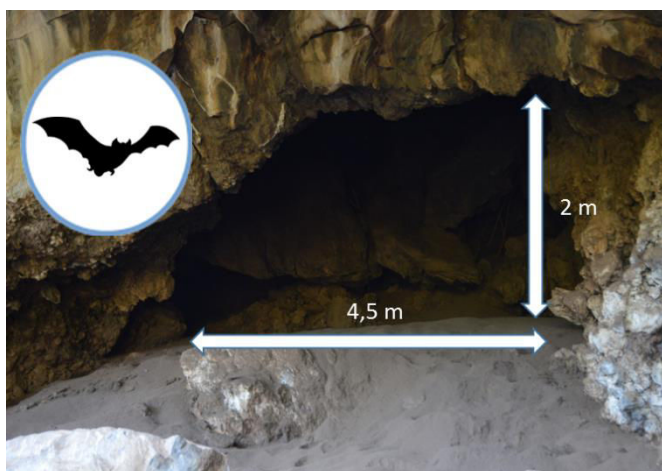


Figure 18a. Entrée de la grotte de Trois Bassin

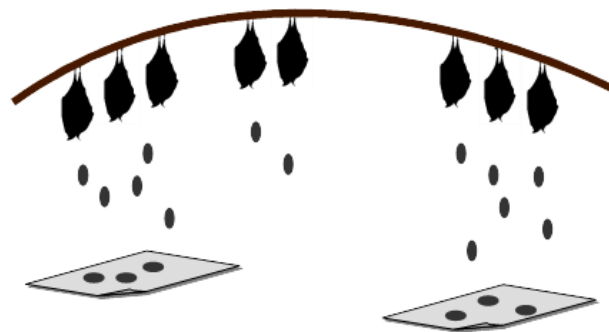


Figure 18b. Représentation schématique de l'échantillonnage des fèces.

Au cours de chaque séance, nous avons également prélevé des échantillons de guano dans la partie la plus étroite de l'entrée de la grotte, en dix points différents séparés de 50 cm le long d'un transect de 4,5 m (Joffrin et al. 2019b) (**Figure 19**). Des seringues stériles de 2 ml à bouts préalablement coupés ont été utilisées pour prélever un échantillon de guano d'environ 130 mg. Chaque échantillon a été immédiatement mélangé dans 1,5 ml de VTM, placé dans une glacière avec des blocs de glace sur le terrain et stocké dans un congélateur à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ au laboratoire. Au total, 380 échantillons ont été collectés sur les deux années de l'étude.



Figure 19. Échantillonnage de guano à l'entrée de la grotte.

Préparation des échantillons

Les échantillons de fèces ont été brièvement vortexés puis centrifugés à 1 500 g pendant 15 min. L'ARN a été extrait à partir de 140 µL de surnageant de chaque échantillon avec le mini kit QIAamp Viral RNA (QIAGEN, Valencia, Californie, USA) et élué dans 60 µL de tampon AVE. Une transcription inverse a été réalisée sur 10 µL d'ARN en utilisant la transcriptase inverse ProtoScript II et le Random Primer 6 (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) dans les conditions suivantes : 70 °C pendant 5 min, 25 °C pendant 10 min, 42 °C pendant 50 minutes et 65 °C pendant 20 minutes (Lebarbenchon et al. 2017). Les ADNc ont été testés pour la présence du gène codant l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) en utilisant une PCR multi-sonde en temps réel (RT) ciblant un fragment de 179 pb (Muradrasoli et al. 2009). La RT-PCR a été réalisée dans un mélange réactionnel contenant 12,5µL d'Absolute Blue QPCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis), 0,8 µM de chaque amorce, 0,2 µM de chaque sonde, et 2,5 µL d'ADNc, dans un thermocycleur CFX96 Touch™ (Bio-Rad, Hercules, CA, États-Unis) (Joffrin et al 2019a).

Les échantillons de guano ont été brièvement vortexés puis centrifugés à 1 500 g pendant 15 min. Pour chaque séance d'échantillonnage, 20µL de chacun des 10 échantillons de guano ont été mélangés dans un tube Eppendroff de 1,5mL. L'extraction de l'ARN de chaque mélange a été extrait à partir de 140 µL de surnageant selon le même protocole que pour les fèces. Une transcription inverse a été réalisée sur 10 µL d'ARN en utilisant le protocole décrit précédemment (Lebarbenchon et al. 2017).

Quantification absolue de coronavirus dans le guano

La PCR quantitative (qPCR) est utilisée pour détecter et quantifier les acides nucléiques dans des échantillons biologiques et environnementaux. La PCR digitale (ddPCR : « digital droplet PCR ») est apparue ces dernières années et permet la quantification absolue des acides nucléiques (Quan, Sauzade et Brouzes, 2019 ; Hoshino et Ignazaki, 2012). À ce jour, peu d'études ont utilisé cette technologie pour la détection d'agents infectieux dans des échantillons environnementaux (*i.e.* sol, eau) (Li et al. 2018). Comme la ddPCR peut être utilisée pour la quantification absolue de la charge virale, nous avons décidé d'appliquer cette méthodologie afin de (i) quantifier l'accumulation de coronavirus dans des échantillons de guano de chauve-souris tout au long de la saison de maternité et (ii) évaluer le potentiel de persistance des

coronavirus dans l'environnement après la saison de maternité. Cette technique ciblant les ARN viraux, le résultat est exprimé en nombre de copies de génome viral et ne représente pas nécessairement la quantité de particules virales infectieuses dans l'environnement.

Principe de la PCR digitale

La PCR digitale est un outil d'amplification de matériel génétique qui permet de quantifier de manière absolue la charge virale d'un échantillon. Comparé à la PCR quantitative, la ddPCR ne se réfère pas à une courbe standard et serait plus sensible tout en étant tolérante aux inhibiteurs présents dans les échantillons (Li et al. 2018). L'échantillon est partitionné de manière automatisée en plusieurs sous-réactions de PCR indépendantes sur une puce composée de 20 000 puits, de sorte que chaque partition ne contienne que quelques séquences cibles, voire une seule ou encore aucune (Quan, Sauzade et Brouzes, 2018). Un fluide d'immersion est déposé sur la puce pour empêcher l'évaporation du mélange réactionnel. La puce est ensuite scellée puis disposée dans l'appareil de ddPCR. Chaque puits contient alors une réaction individuelle de PCR et les partitions contenant des séquences cibles amplifiées sont détectées par fluorescence (**Figure 20, ThermoFisher**). Au terme de l'amplification, la puce doit être sortie de la machine, laissée à température ambiante quelques minutes avant d'être lue par un lecteur approprié. L'ensemble des données générées peut ensuite être analysé par un logiciel dédié. La fraction des partitions positives pour l'amplification est utilisée pour quantifier la concentration de la séquence cible avec une précision statistiquement définie à l'aide des statistiques de Poisson (Quan, Sauzade et Brouzes, 2018). Le rapport entre le nombre de partitions positives (présence de fluorescence) et le nombre de partitions totales permet de déterminer la concentration de la cible dans l'échantillon (Quan, Sauzade et Brouzes, 2018).

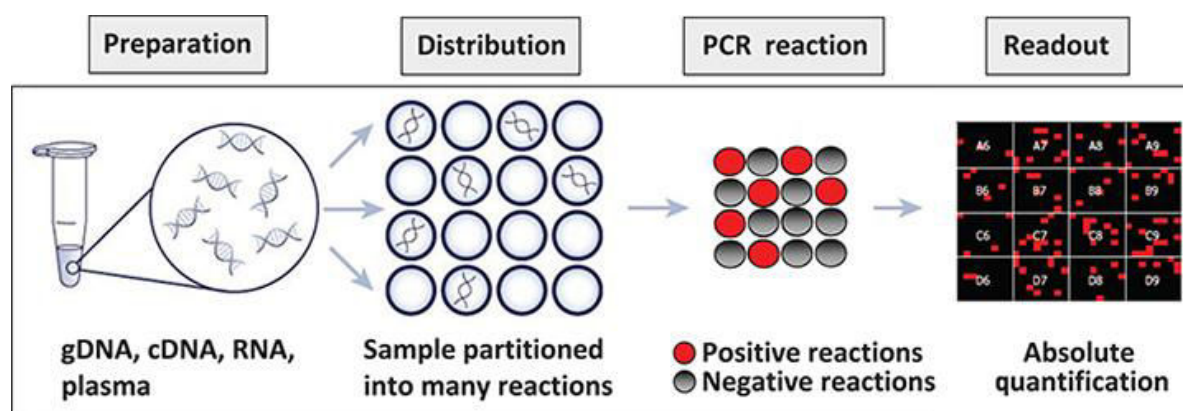


Figure 20. Principe de la ddPCR (ThermoFisher, 2015)

Mise au point du protocole pour la quantification absolue dans le guano

Des étapes de quantification préalable de l'ADN sont nécessaires avant d'utiliser la ddPCR. En effet, la qualité du résultat de la ddPCR n'est garantie que si le nombre de copie de la matrice est compris entre 200 copies/ μ L et 2 000 copies/ μ L (ThermoFisher). Nous avons donc réalisé des étapes de quantification des ADNc contenus dans les échantillons pour estimer le nombre de copie du génome viral. En fonction des résultats obtenus pour chaque échantillon, nous avons ensuite dilué les échantillons avant de réaliser la ddPCR (Dodd, Gagnon et Corey, 2013). Dans un premier temps, nous avons réalisé des tests de quantification de la charge virale par qPCR à l'aide d'un thermocycleur CFX96™ (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) en utilisant deux couples d'amorces différents. Le premier couple d'amorces est composé d'amorces dégénérées spécifiques d'une partie de l'ORF1b codant le gène de l'ARN polymérase ARN-dépendante que nous avons utilisées en routine pour la détection des coronavirus (Joffrin et al. 2019b). Le second couple d'amorces a été désigné pour l'utilisation de la ddPCR, et est composé d'oligonucléotides non dégénérées spécifiques de la partie de l'ORF1b codant le gène de l'ARN polymérase ARN-dépendante de l'unique variant génétique que nous avons détecté chez le Petit Molosse de La Réunion : CoV-DGT_F : 5'- ACTACGCTGATTTGGGTTATGTGGC- 3' ; CoV-DGT_R : 5'- CGTGCGGGCCTTTACTAATGT -3' ; CoV-DGT_P : 5'- CAGAACAATGTCTTTATGAGCACTGCT-3'.

Nous avons réalisé plusieurs tests préliminaires sur le système de ddPCR QuantStudio® 3D. Le mélange réactionnel contenait 7,5 μ L de QuantStudio® 3D Digital PCR Master Mix v2, 1,2 μ L de chaque amorce DGT-F et DGT-R, 0,6 μ L de sonde DGT-P et 1,5 μ L d'échantillon d'ADNc. Le mélange réactionnel a été chargé sur une puce PCR 20K QuantStudio® 3D Digital (ThermoFisher) en utilisant un chargeur automatique de puces. L'amplification a été réalisée dans les conditions suivantes : 96 °C pendant 10 min, puis 45 cycles à 50 °C pendant 1 min et 98 °C pendant 30 s, suivies de 50 °C pendant 1 min. Après amplification, les puces ont été laissées à température ambiante pendant 10 min puis lues sur le lecteur de puce QuantStudio® 3D Instrument (ThermoFisher). Les données ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel QuantStudio 3D AnalysisSuite® Cloud (ThermoFisher).

Analyse des sorties du logiciel QuantStudio 3D AnalysisSuite® Cloud

Nous avons testé un total de 35 échantillons avec la ddPCR. Cependant, l'analyse des résultats nécessite de prendre en compte un ensemble de paramètres qualitatifs et quantitatifs (**Annexe 5**) afin de juger de la qualité de la manipulation.

Au niveau des paramètres qualitatifs, le logiciel QuantStudio 3D AnalysisSuite® Cloud (ThermoFisher) analyse la qualité du chargement, déterminée par l'aspect visuel de la puce sur le logiciel. Le logiciel permet d'évaluer le succès de chargement qui correspond au pourcentage de puits remplis avec succès sur un total de 20 000 puits. Ce critère est dépendant de l'appareil mais aussi du manipulateur (dépôt sur la lame de chargement, enclenchement de la lame de chargement). Le logiciel permet également d'observer la distribution spatiale du remplissage des puits et de la fluorescence sur la puce, et donc de confirmer que la répartition de l'échantillon et des puits positifs et négatifs est bien aléatoire. Il permet d'autre part de contrôler l'absence d'anomalies qui peuvent être dues à des erreurs de manipulations (*e.g.* impact de pipette sur la puce, bulles d'airs, séchage dû à un manque de liquide d'immersion, mauvaise installation de la lame). Des exemples d'anomalies obtenues lors de la lecture de certaines puces sont présentés dans l'**annexe 6**. À ce jour, nous avons réussi à dépasser les problèmes liés à ces paramètres qualitatifs, avec une augmentation du succès de chargement et une diminution nette des anomalies au fur et à mesure de nos essais.

Le logiciel QuantStudio 3D AnalysisSuite® Cloud (ThermoFisher) permet de quantifier de façon absolue le nombre de copie d'une matrice d'ADN par microlitre. Lors de manipulations préliminaires, nous avons obtenu différents cas de figure : des puces avec un nombre de copies par microlitre trop faible (<200 copies/ μL) (**Figure 21A**), des puces avec un nombre de copies par microlitre trop important ($>2\ 000$ copies/ μL) (**Figure 21B**), et des puces avec un nombre de copies par microlitre compris dans la gamme recommandée par le fabricant (200 copies/ $\mu\text{L} < X$ copies/ $\mu\text{L} < 2\ 000$ copies/ μL) (**Figure 21C**). Dans l'exemple A, l'observation de la puce (« Chip view ») montre une répartition spatiale uniforme d'une absence de fluorescence avec peu d'anomalies. La répartition de la fluorescence est unimodale. Les résultats quantitatifs semblent indiquer que la quantification absolue est interprétable, avec 18 221 puits remplis sur 20 000 puits et 17 791 puits sur 20 000 puits exploitables. Le nombre de copies par microlitre est de 1,57 copies/ μL ce qui est nettement inférieur à la gamme de 200 copies/ μL à 2 000 copies/ μL recommandée par le fabricant. Ce dernier résultat indique que le nombre de copie d'ARN viral contenu dans l'échantillon est très faible, et il est nécessaire de réitérer l'expérience en ajustant le facteur de dilution pour respecter les conditions d'utilisation de la ddPCR, afin de vérifier si ce résultat est bien représentatif d'une faible charge virale dans l'environnement durant l'échantillonnage. Dans l'exemple B, l'observation de la puce (« Chip view ») montre une répartition spatiale homogène de la fluorescence avec peu d'anomalies. La répartition de la fluorescence est bimodale. Les résultats quantitatifs semblent indiquer que la quantification

absolue est interprétable, avec 16 608 puits remplis sur 20 000 puits et 14 308 puits sur 20 000 puits exploitables (mais inférieur à 75% de puits exploitables). Le nombre de copies par microlitre est de 2 175,7 copies / μ L ce qui est légèrement supérieur à la gamme recommandée. L'ensemble de ces résultats pourrait signifier que les données de cette puce sont exploitables, même si le nombre de copies par microlitre suggère qu'il faudrait réitérer l'expérience en diluant l'échantillon. Dans l'exemple C, l'observation de la puce (« Chip view ») montre une répartition spatiale homogène de la fluorescence, avec peu d'anomalies. La répartition de la fluorescence est bimodale. Les résultats quantitatifs semblent indiquer que la quantification absolue est interprétable, avec 17 247 puits remplis sur 20 000 puits et 16 620 puits sur 20 000 puits exploitables (mais inférieur à 75% de puits exploitables). Le nombre de copies par microlitre est de 492,94 copies / μ L ce qui est compris dans la gamme recommandée. L'ensemble de ces résultats indique que les données sont exploitables.

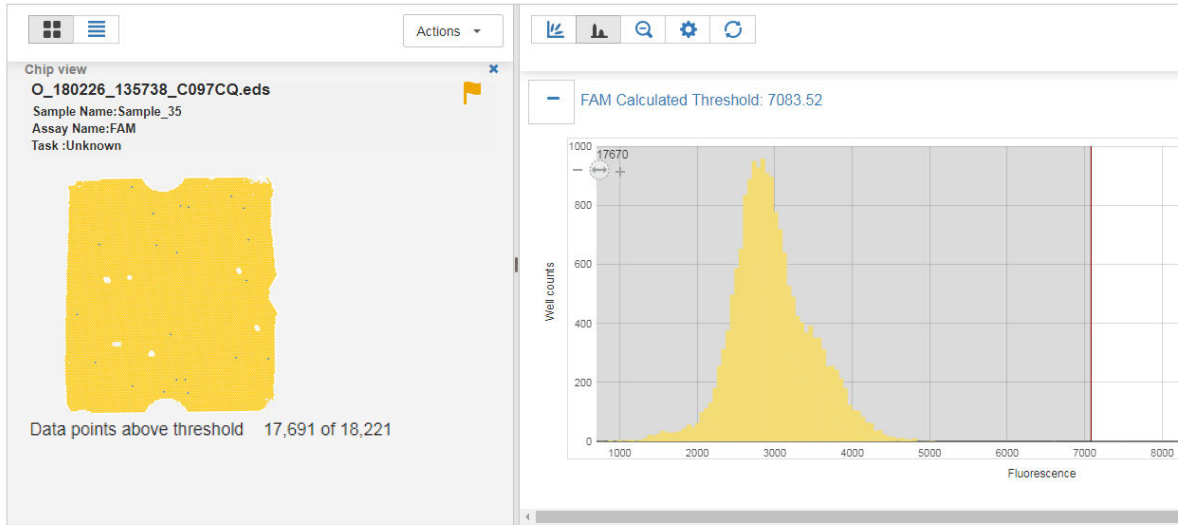
Dans notre étude, nous avons ainsi fixé des seuils pour interpréter nos résultats et s'assurer de la qualité de nos expérimentations. Pour être inclus dans cette étude, chaque puce devrait (i) avoir au moins 75% de puits remplis, (ii) être exempte de toute anomalie importante (plus de 10% de la surface de la puce) et non aléatoire (bulle dans la lame de chargement de l'échantillon ou dans le mélange réactionnel, fuites majeures), lame de chargement non rincée ou impact de pipette) et (iii) avoir une distribution bimodale de fluorescence. Si une puce ne correspond pas à ces critères, l'échantillon sera alors rechargé sur une nouvelle puce.

En théorie, la PCR digitale apparaît comme un outil puissant et performant pour quantifier la charge virale de CoV dans le guano. Néanmoins, les tests réalisés lors de la mise au point du protocole de la ddPCR ne sont pas encore assez concluants notamment dus aux nombreux biais qui rendent difficile l'interprétation des résultats.

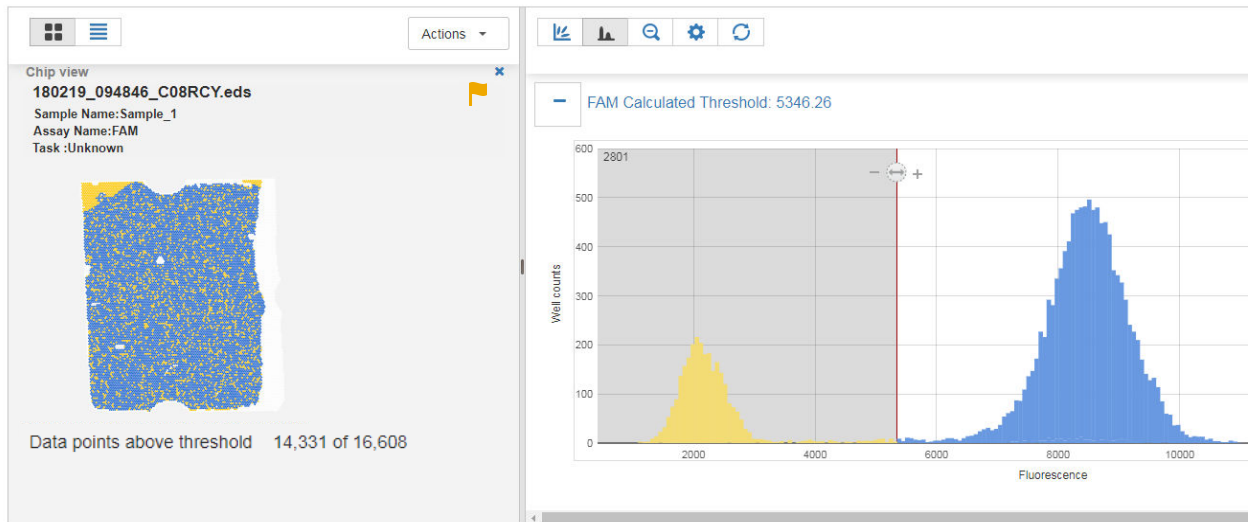
L'article suivant présente la majorité des résultats issus de ce travail. Cependant, les résultats des analyses réalisées avec la ddPCR nécessitant d'être consolidés, seule la méthodologie est présentée dans le manuscrit. À ce stade l'article n'a pas été relu par les co-auteurs de cette étude (excepté C. Lebarbenchon et P. Mavingui).

Review Quality and Calls Double click a chip to view and adjust the quality threshold until you have an acceptable balance of data quantity and quality.

A



B



C

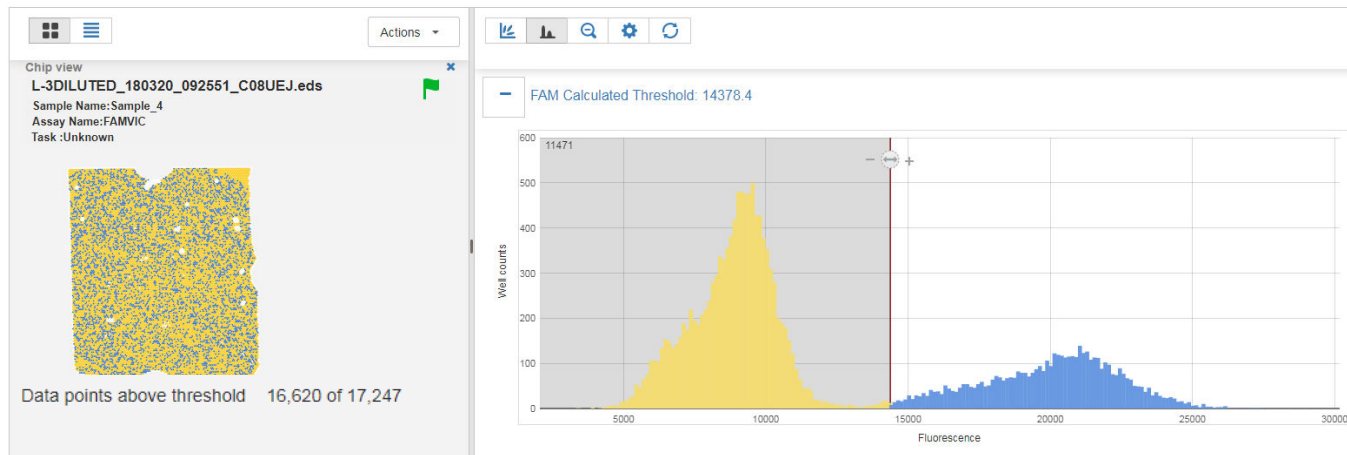


Figure 21. Exemples de résultats de puces de PCR digitale obtenues lors des essais de mise au point.

III.3.3. Article 3: Longitudinal study of coronavirus infection dynamics in a bat maternity colony

Longitudinal study of coronavirus infection dynamics in a bat maternity colony

Léa Joffrin*, Axel O.G. Hoarau, Erwan Lagadec, Olalla Torrontegui, Gildas Le Minter, Muriel Dietrich, Patrick Mavingui and Camille Lebarbenchon

Université de La Réunion, UMR Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT), INSERM 1187, CNRS 9192, IRD 249, GIP CYROI, 2 rue Maxime Rivière, Saint Denis, La Réunion, France.

1 INTRODUCTION

2 Seasonal environmental changes have major effects on the life cycle of many organisms,
3 influencing a large diversity of physiological and behavioral processes such as migration,
4 hibernation, and reproduction (Altizer et al. 2006). Seasonal changes also affect host-parasite
5 interactions (Hosseini et al. 2004; Altizer et al. 2006; Plowright et al. 2016); the breeding period
6 can for instance favor parasite transmission opportunities in animal populations (Hosseini et al.
7 2004; Altizer et al. 2006; Drexler et al. 2011; Amman et al. 2012).

8 Virus transmission dynamics in bats is strongly related to their ecology and breeding
9 seasonality (Plowright et al. 2008; George et al. 2011; Amman et al. 2012; Peel et al. 2014;
10 Hayman 2015; Streicker et al. 2016; Peel et al. 2018). Most of bat species give birth in a more
11 or less synchronized manner in maternity roosting sites (Tuttle and Stevenson 1982). Bat
12 reproduction and parturition can be either annual or biannual depending on species, in
13 temperate, subtropical and tropical environment (Tuttle and Stevenson 1982). These
14 reproductive patterns can have significant consequences on virus transmission dynamics in their
15 host. For instance, in the Egyptian fruit bat (*Rousettus aegyptiacus*) significant variation in the
16 prevalence of bats infected with Marburg virus have been detected over breeding and birthing
17 seasons, associated to the presence of juvenile bats (Amman et al. 2012). The increase of
18 Marburg virus prevalence after the parturition suggest a major role of the bat population
19 structure on the virus transmission dynamics in its natural host. It also highlights that the risk
20 of transmission to other hosts, including human, could be enhanced during the reproductive
21 period, from late December to late March and from late June to late October, in East Africa
22 (Amman et al. 2012) (Amman et al. 2012). Overall, identifying seasonal infection dynamics in
23 natural host populations provides major information that can be used to assess the risk of
24 spillover and emergence of zoonotic viruses.

25 Bat-borne coronaviruses (CoVs) have emerged in humans and livestock and are responsible
26 for sever diseases, such as the Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS), the Middle East
27 Respiratory Syndrome (MERS), and the Swine Acute Diarrhea Syndrome (SADS). Although
28 many studies have identified bat CoVs worldwide, current knowledge on the diversity and risk
29 associated to CoV emergence remains to be precisely assessed. Previous studies have shown a
30 link between bat population structure and infection dynamics in these hosts (Gloza-Rausch et
31 al. 2008; Drexler et al. 2011; Osborne et al. 2011; Annan et al. 2013; Baldwin et al. 2015;
32 Wacharapluesadee et al. 2018). In particular, bat age could be an important driver of CoV
33 infection dynamics, with generally higher detection rate in juveniles than in adult bats (Drexler
34 et al. 2011; Annan et al. 2013; Baldwin et al. 2015; Wacharapluesadee et al. 2018). In addition,

35 seasonal variations of coronavirus detection rate in bat colonies suggest an effect of the
36 parturition on coronavirus infection dynamics in these colonies (Drexler et al. 2011; Baldwin
37 et al. 2015; Wacharapluesadee et al. 2018).

38 In this study, we investigated CoV infection dynamics in Reunion free-tailed bats
39 (RFTB) (*Mormopterus francoismoutoui*), a tropical Molossid species endemic to Reunion
40 island (Goodman et al. 2008). This small insectivorous species roost in large colonies in natural
41 caves and synanthropic habitats such as bridges and houses (Moutou; Goodman et al. 2008).
42 We focused on the main RFTB colony known on Reunion Island and hypothesized that the
43 CoV infection dynamic could be strongly affected by the bat population structure within the
44 studied colony. To test this hypothesis, (i) we assessed the prevalence of CoV infected bats
45 during the two consecutive maternity seasons at a fine time-scale, and (ii) we investigated
46 potential environmental persistence of CoVs in bat guano, within and between maternity
47 seasons.

48

49 MATERIALS AND METHODS

50

51 Study site

52 The study was conducted in a natural cave (30 m³) in the West coast of the island (21,111°S,
53 55,259°E). The colony is monospecific and mostly composed of adult females during the early
54 stages of the breeding season (October to December), and of newborns and juveniles, after the
55 parturition period, from mid-December to mid-January onward (Dietrich et al. 2015; Joffrin et
56 al. 2019b). Between 40 000 and 50 000 flying adult bats have been estimated before parturition;
57 however, after the breeding season, the cave remains totally empty from bats (between May
58 and September) (Dietrich et al. 2015). During each sampling session, the colony was visually
59 monitored to estimate the relative population size (*i.e.* no bat, less than half of the cave covered
60 with bats, more than half of the cave covered), and to assess the population age structure and
61 timing of parturition based on the presence of adults, newborns, and juveniles (Joffrin et al.
62 2019b).

63

64 Collection of biological material

65 A non-invasive sampling strategy was setup to avoid direct manipulation of bats and to limit
66 colony disturbance. Samples were collected every two to three weeks between June 2016 and
67 June 2018. Fresh feces were collected inside the cave, by placing 5 benchguard® sheets (60cm
68 x 49cm) underneath roosting bats. Benchguard sheets were placed in seven different locations

69 in order to obtain samples from different areas inside the cave, during each sampling session.
70 The objective was to assess a potential spatial variation in bats shedding CoVs inside the colony.
71 During each sampling session, benchguard sheets were therefore placed in one to five of the
72 seven areas. Variation in sampled areas was dependent on the location of bat colony and was
73 also restricted during the parturition period in order to limit colony disturbance. Between 12
74 and 50 fresh droppings were collected in each benchguard sheet and placed in individual 1.5
75 mL of virus transport medium (VTM; as used in Lebarbenchon et al. 2017). Samples were
76 maintained in a cooler with ice packs in the field and stored in a -80°C freezer within two hours.
77 During each sampling session, we also collected guano samples in the narrowest part of the
78 cave entrance, in ten different points separated by 50 cm along a 4.5 m transect (Joffrin et al.
79 2019b for details). Sterile open-ended 2 mL syringes were used to collect a core sample, in
80 order to obtain *c.* 130 mg of guano. Each guano sample was immediately mixed in 1.5 mL of
81 VTM, placed in a cooler with ice packs in the field, and stored in a -80°C freezer within two
82 hours.

83

84 [Coronavirus detection in individual feces](#)

85 Samples were briefly vortexed and then centrifuged at 1500 g for 15 min. RNA was extracted
86 from 140 µL of supernatant of each sample with the QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN,
87 Valencia, California, USA) and eluted in 60 µL of AVE buffer. Reverse transcription was
88 performed on 10 µL of RNA using the ProtoScript II Reverse Transcriptase and Random Primer
89 6 (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) as previously described (Lebarbenchon et al.
90 2017). cDNAs were tested for the presence of the RNA-dependent RNA-polymerase (RdRp)
91 gene using a multi-probe Real-Time (RT) PCR targeting a 179 bp length fragment (Muradrasoli
92 et al. 2009). RT-PCR were performed with the ABsolute Blue QPCR Mix (Thermo Fisher
93 Scientific, Waltham, MA, USA) and 2.5 µL of cDNA in a CFX96 Touch™ Real-Time PCR
94 Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) (Joffrin et al. 2019a).

95

96 [Statistical analysis](#)

97 We explored the effect of the sampling collection date and of the sampling area inside the cave
98 on the probability of successful detection of CoV using χ^2 test. Analyses were conducted with
99 R software v3.5.1.

100

101 [Coronavirus quantification in bat guano](#)

102 Guano samples were centrifuged at 1500 g for 15 min. For each collection date, we pooled
103 20µL of each guano samples supernatant in a new 2 mL Eppendorf tube, in order to obtain one
104 environmental sample representative of each sampling session. After slow homogenization, 140
105 µL of each pool were eluted in 60 µL of Qiagen AVE elution buffer. RNA extraction was
106 conducted following the QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN, Valencia, California, USA).
107 Reverse transcription was performed as described above.

108

109 Absolute quantification in guano samples

110 We performed digital PCR (ddPCR) on guano samples using the QuantStudio™ 3D Digital
111 PCR System using sealed chip technology (ThermoFisher Scientific, USA). We designed non-
112 degenerated primers specific to the RNA-dependent RNA polymerase gene of the CoV
113 genotype detected on Reunion Island (Joffrin et al. 2019a): CoV-DGT_F: 5' '-
114 ACTACGCTGATTTGGGTTATGTGGC- 3'; CoV-DGT_R: 5'-
115 CGTGCGGGCCTTTACTAATGT -3 '; CoV-DGT_P: 5'-[FAM]-
116 CAGAACAATGTCTTTATGAGCACTGCT-[BHQ]-3 '. The 14.5µL mix contained 7.5 µL of
117 QuantStudio™ 3D Digital PCR Master Mix v2, 1.2 µL of the forward and reverse primers 0.6
118 µL of probe, and 1.5µL of cDNA. The reaction mixture was loaded onto a QuantStudio™ 3D
119 Digital PCR 20K Chip using an automatic chip loader. Amplification was carried out using the
120 following thermal cycling conditions: 96°C for 10 min, 45 cycles of 50°C for 1 min and 98°C
121 for 30 s followed by 50°C for 1 min. After amplification each chip was cooled at room
122 temperature for 15 min and then read on the QuantStudio™ 3D Instrument, as recommended
123 by the manufacturer for optimal quantification. The results were further analyzed using the
124 QuantStudio 3D AnalysisSuite™ Cloud Software.

125

126 Chips analysis

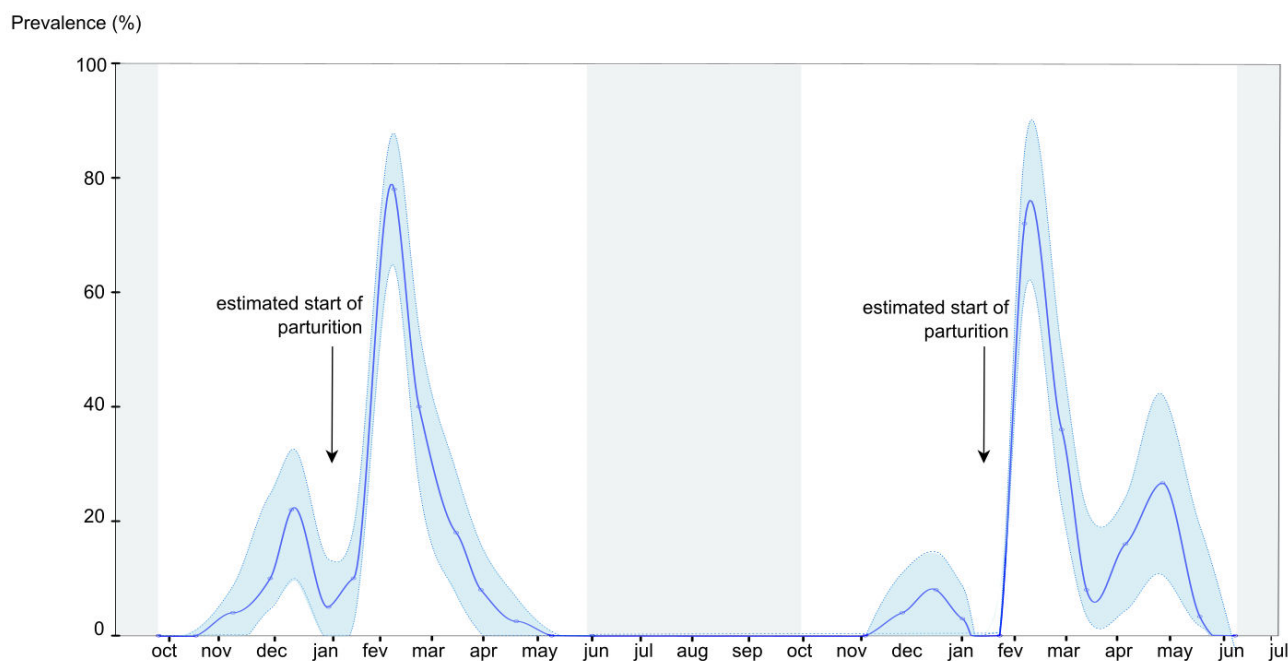
127 Load success (percentage of wells filled out of 20,000 wells), load quality (troubleshooting)
128 and binomial distribution of the probe signal were explored with the QuantStudio 3D
129 AnalysisSuite™ Cloud Software. To be included into this study, each chip had to (i) have at
130 least 75% of wells filled, (ii) be free of heavy and non-random troubleshooting (bubble in the
131 sample loading blade or in the reaction mix, major leakage, loading blade unflushed or pipet
132 impact) and (iii) have a bimodal distribution of fluorescence. For chips that did not
133 corresponded to these criteria, sample were re-tested on a new chip.

134

135 RESULTS

136 CoV shedding in fresh feces

137 Overall, 1080 individual feces were collected during two consecutive years. A total of 179
 138 samples tested positive for the presence of CoV ($16.6\% \pm 2.2\%$). The overall proportion of
 139 positive feces was not different between years ($\chi^2 = 0.001$; $df = 1$; $P = 0.97$); however, a
 140 significant variation was detected during the course of each season (2016-2017: $\chi^2 = 175.85$,
 141 $df = 13$, $P < 0.001$; 2017-2018: $\chi^2 = 133.54$, $df = 8$, $P < 0.001$; Supplementary Table 1). Similar
 142 patterns of CoV prevalence of positive bats were observed during the two seasons (**Figure 1**).
 143 None of the samples tested positives for coronavirus at the beginning and at the end of both
 144 seasons (*i.e.* during the first and the last sampling sessions). A first peak of infection occurred
 145 at the beginning of the breeding season around mid-December, with a prevalence of positive
 146 bats reaching $22.0\% \pm 11.5\%$ in 2016-2017 and $8.0\% \pm 7.5\%$ in 2017-2018 ($\chi^2 = 2.82$, $df = 1$,
 147 $P = 0.09$). From mid-December to mid-January, the prevalence strongly decreased for both years
 148 to $5.0\% \pm 6.8\%$ in 2016-2017 and to $0\% \pm 0\%$ in 2017-2018 ($\chi^2 = 0.21$, $df = 1$, $P = 0.64$). Then,
 149 a rapid increase in the prevalence of infected bats was detected, with a second peak in February,
 150 with $78.0\% \pm 11.5\%$ in 2016-2017 and $72\% \pm 12.4\%$ in 2017-2018. In 2016-2017 from March
 151 to the end of the maternity season, the prevalence of infected bats decreased until all bats left
 152 the cave. However, in 2017-2018, the prevalence decreased until April but a third peak was
 153 detected in May (infection rate: $26.7\% \pm 15.8\%$) before all bats left the cave.



154
 155 **Figure 1.** Prevalence of bats shedding coronavirus in feces during two consecutive maternity
 156 seasons from October 2016 to July 2018. The shaded area represents the 95% CI. Dots
 157 correspond to sample collection dates. Grey areas correspond to time of the year without bats
 158 in the colony.

159

160 **Spatial variation in CoV shedding within the bat colony**

161 Overall, we found a significant effect of the sampling area within the cave, on the probability
162 of CoV detection ($\chi^2 = 34.78$; $df = 6$; $P < 0.001$). This result likely reflected movements of the
163 bat colony inside the cave. Indeed, bats were sighted in different areas and the sampling
164 locations were selected accordingly during the course of the season. For instance, the area
165 located in the center of the colony was sampled 22 times out of the 26 sampling events, but
166 other sampling areas, in particular those located at the edge of the colony, were sampled less
167 frequently.

168 We did not find significant variation in CoV detection between sampling areas, for each
169 sampling session. For instance, during the second peak (on February 16th 2017 and February
170 7th 2018), the number of positive samples did not differ between the sampling areas (2016-
171 2017: $\chi^2 = 7.11$; $df = 4$; $P = 0.13$; 2017-2018: $\chi^2 = 5.40$; $df = 3$; $P = 0.15$). This result suggests
172 that shedding bats may be randomly located inside the colony. Although this aspect would
173 require a more precise evaluation, our results support that our estimate of the prevalence of
174 infected bats is not biased by the sampling location inside the colony.

175

176 **Absolute quantification in guano**

177 Overall, 380 guano samples were collected during two consecutive years, from June 2016 to
178 June 2018 (ten samples collected along the transect in 38 individual sampling sessions). As
179 *mentioned in this thesis, the application of the ddPCR requested preliminary analyses in*
180 *order to adjust our protocol and obtain consistent results. Analyses are pending and results*
181 *will be integrated in a revised version of this paper before submission for publication.*

182

183 **DISCUSSION**

184 We investigated the seasonal infection dynamics of bat coronavirus in a maternity colony in a
185 fine time scale, during two consecutive years. Our data provide evidence that coronavirus
186 infection rate significantly varies over the maternity season in RFTB bats, with a first peak of
187 infection occurring at the beginning of the maternity season when adult density seems
188 maximum, and a second peak occurring one month after the parturition. The same pattern was
189 observed during two consecutive years, although a third peak was observed at the end of the
190 second year. These findings are in accordance with previous studies on bat-borne pathogens
191 also reporting seasonal variations in the prevalence of infected bats, in particular during the

192 maternity season (Drexler et al. 2011; Amman et al. 2012; Baldwin et al. 2015; Dietrich et al.
193 2015).

194

195 Variations in CoV infection dynamics during the maternity season

196 We found a variation of the infection rate in bats over the maternity season, with similar
197 pattern for both seasons: a first peak of CoV infection occurring at the beginning of the
198 maternity season, and a second peak occurring one month after the parturition. This dynamic
199 of infection has previously been suggested for CoV infection in temperate regions (Drexler et
200 al. 2011), but also for other pathogens in the same bat population (Dietrich et al. 2015). Indeed,
201 a similar variation of *Leptospira* bacteria and paramyxovirus dynamic was previously detected
202 over the maternity season, in the same colony, with one peak at the beginning of the maternity
203 season, and a second peak about two months after the initial birth pulse (Dietrich et al. 2015).
204 Although a similar trend was observed for CoV in this study, paramyxovirus and *Leptospira*
205 intensity of infection peaks was different, with higher prevalence of infection with CoV after
206 the parturition than for paramyxovirus and *Leptospira*, and the opposite trend at the beginning
207 of the maternity season. These variations may however reflect differences associated to the
208 sampling design (feces vs urine) and the sensitivity of the PCR detection systems. Further
209 research on bat co-infections and interactions between infectious agents could provide
210 interesting information on pathogens-associated factors driving infection dynamics.

211 Seasonal breeding in high density colonies might introduces an increase in the number
212 of susceptible individuals enhancing viral transmission (Altizer et al. 2006; Plowright et al.
213 2015; Willoughby et al. 2017). Moreover, studies on circulation of viruses in bat colonies have
214 suggested that newborns might be protected from infections by maternal antibodies (Drexler et
215 al. 2011; Baker et al. 2013; Epstein et al. 2013; Dietrich et al. 2015). Duration of antibodies
216 waning seems to depend on virus, with a mean duration of maternal antibodies between 3 to 6
217 months for henipavirus and filovirus (Hayman 2015; Schuh et al. 2017; Peel et al. 2018). Even
218 if no studies have investigated duration of maternal antibodies to bat CoV, we could
219 hypothesize that the second infection peak might coincide with the waning of maternal
220 antibodies in juvenile's bats. We also identified inter-annual variation of CoV infection
221 dynamics, with a third peak of infection at the end of the second year. At least two hypotheses
222 may explain this increase in the prevalence of infected bats. First, it might correspond to a
223 desynchronization of the parturition which would have delayed parturition of pregnant females,
224 and introduce a second pool of susceptible individuals at the end of the maternity season.
225 However, the absence of newborns in the colony after March 2018 did not support this

226 hypothesis. Second, bats from other colonies might have prospected for other roost sites,
227 including the study site. This could have introduced susceptible individuals and favor viral
228 transmission to these bats.

229

230 [Island population structure](#)

231 In animals, infection dynamics may reflect ecological (behavioral) or physiological
232 differences by sex (Zuk and McKean 1996). In 2016, Streiker et al. studied mitochondrial and
233 nuclear DNA of 352 vampire bats (*Desmodus rotundus*) in Peru and found important dispersion
234 of male compare to female (Streicker et al. 2016). Moreover, they found congruence between
235 nuclear DNA-based phylogeny and vampire bat rabies virus phylogenies, and concluded that
236 males dispersion have an important role in the viral dispersion (Streicker et al. 2016). Philopatry
237 (*i.e.* fidelity to roost or maternity sites) is common in numerous bat species (Kunz and Lumsden
238 2006). Our study site is the most important roosting site in the Island and can host more than
239 30 000 RFTB during the maternity season (Dietrich et al. 2015) However, nothing is known
240 about the geographic origin of females at the beginning of the season, where mothers and
241 juveniles leave after the season and more globally, how RFTB populations are structured at the
242 island scale. Studies on population structure and population dynamics might provide more
243 information on RFTB seasonal movements and on viral dispersal between roosting sites. Given
244 the low RFTB weight (between 5 to 7 grams) and the Reunion Island topography, telemetry
245 surveys are not appropriate. However, population genetics with microsatellites markers and
246 capture-mark-recapture on other roosting sites might provide information on bats population
247 structure on Reunion Island.

248

249 **Acknowledgments**

250 We thank Nicolas Diotel, Maël Grondin, Karen McCoy, and Céline Toty, for their assistance
251 in the field.

252

253 **Fundings**

254 Léa Joffrin is supported by a “Région Réunion, European Regional Development Funds
255 (FEDER 2014-2020)” PhD fellowship, Axel Hoarau by a “Ministère de l’Enseignement
256 supérieur, de la Recherche et de l’Innovation” PhD fellowship, and Camille Lebarbenchon by
257 a “Chaire Mixte Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) –
258 Université de La Réunion”. This work was partially funded by CNRS, INSRERM and IRD.

259

260 **Author contribution**

261 LJ, CL and PM conceived and designed the study. LJ, AH, EL, OT, GLM, MD, and CL
 262 collected biological material. LJ, AH, OT, and CL performed the molecular analyses. LJ and
 263 CL analyzed the data and draft the manuscript. All authors edited, read, and approved the final
 264 manuscript.

265

266 **Conflicts of interests**

267

268 The authors have no conflict of interests.

269

270

271 **References**

272 Altizer S, Dobson A, Hosseini P, Hudson P, Pascual M, Rohani P (2006) Seasonality and the
 273 dynamics of infectious diseases. *Ecol. Lett.* 9:467–484.

274 Amman BR, Carroll SA, Reed ZD, Sealy TK, Balinandi S, Swanepoel R, Kemp A, Erickson
 275 BR, Comer JA, Campbell S, Cannon DL, Khristova ML, Atimmedi P, Paddock CD, Kent
 276 Crockett RJ, Flietstra TD, Warfield KL, Unfer R, Katongole-Mbidde E, Downing R,
 277 Tappero JW, Zaki SR, Rollin PE, Ksiazek TG, Nichol ST, Towner JS (2012) Seasonal
 278 pulses of Marburg virus circulation in juvenile *Rousettus aegyptiacus* bats coincide with
 279 periods of increased risk of human infection. *PLoS Pathog* 8:e1002877.

280 Annan A, Baldwin HJ, Corman VM, Klose SM, Owusu M, Nkrumah E, Kofi Badu E, Anti P,
 281 Agbenyega O, Meyer B, Oppong S, Sarkodie YA, Kalko EK V, Lina PHC, Godlevska E
 282 V, Reusken C, Seebens A, Gloza-Rausch F, Vallo P, Tschapka M, Drosten C, Drexler JF
 283 (2013) Human betacoronavirus 2c EMC/2012-related viruses in bats, Ghana and Europe.
 284 *Emerg Infect Dis* 19:456–459.

285 Baker KS, Suu-Ire R, Barr J, Hayman DTS, Broder CC, Horton DL, Durrant C, Murcia PR,
 286 Cunningham AA, Wood JLN (2014) Viral antibody dynamics in a chiropteran host. *J*
 287 *Anim Ecol* 83:415–428.

288 Baldwin HJ, Corman VM, Nkrumah EE, Badu EK, Anti P, Annan AA, Owusu M, Agbenyega
 289 O, Oppong SK, Klose SM, Adu-Sarkodie Y, Stow AJ, Vallo P, Kalko EK V., Drexler JF,
 290 Drosten C, Tschapka M (2015) Widespread coronavirus infection in Ghanaian bats:

- 291 seasonal, demographic and ecological factors influence infection risk. *in prep*
- 292 Dietrich M, Wilkinson DA, Benlali A, Lagadec E, Ramasindrazana B, Dellagi K, Tortosa P
293 (2015) *Leptospira* and paramyxovirus infection dynamics in a bat maternity enlightens
294 pathogen maintenance in wildlife. *Environ Microbiol* 17:4280–4289.
- 295 Drexler JF, Corman VM, Wegner T, Tateno AF, Zerbinati RM, Gloza-Rausch F, Seebens A,
296 Müller MA, Drosten C (2011) Amplification of emerging viruses in a bat colony. *Emerg*
297 *Infect Dis* 17:449–456.
- 298 Epstein JH, Baker ML, Zambrana-Torrel C, Middleton D, Barr JA, DuBovi E, Boyd V, Pope
299 B, Todd S, Cramer G, Walsh A, Pelican K, Fielder MD, Davies AJ, Wang LF, Daszak P
300 (2013) Duration of maternal antibodies against canine distemper virus and Hendra Virus
301 in pteropid bats. *PLoS One* 8:e67584.
- 302 George DB, Webb CT, Farnsworth ML, O’Shea TJ, Bowen RA, Smith DL, Stanley TR, Ellison
303 LE, Rupprecht CE (2011) Host and viral ecology determine bat rabies seasonality and
304 maintenance. *Proc Natl Acad Sci* 108:10208–10213.
- 305 Gloza-Rausch F, Anne Ipsen, Seebens A, Götsche M, Panning M, Drexler JF, Petersen N,
306 Annan A, Grywna K, Müller M, Pfefferle S, Drosten C (2008) Detection and prevalence
307 patterns of group I coronaviruses in bats, northern Germany. *Emerg Infect Dis* 14:626–
308 631.
- 309 Goodman SM, van Vuuren BJ, Ratrimomanarivo F, Probst J-M, Bowie RCK (2008) Specific
310 status of populations in the Mascarene Islands referred to *Mormopterus acetabulosus*
311 (Chiroptera: Molossidae), with description of a new species. *J Mammal* 89:1316–1327.
- 312 Hayman DTS (2015) Biannual birth pulses allow filoviruses to persist in bat populations. *Proc*
313 *R Soc B Biol Sci* 282: 20142591.
- 314 Hosseini PR, Dhondt AA, Dobson A (2004) Seasonality and wildlife disease: How seasonal
315 birth, aggregation and variation in immunity affect the dynamics of *Mycoplasma*
316 *gallisepticum* in house finches. *Proc R Soc B Biol Sci* 271:2569–2577.
- 317 Joffrin L, Goodman SM, Wilkinson DA, Ramasindrazana B, Lagadec E, Gomard Y, Minter G
318 Le, Santos A Dos, Schoeman MC, Sookharea R, Tortosa P, Julienne S, Gudo ES,
319 Mavingui P, Lebarbenchon C (2019a) Bat coronavirus phylogeography in the western
320 Indian Ocean. *bioRxiv* 742866.

- 321 Joffrin L, Hoarau AOG, Lagadec E, Mavingui P, Lebarbenchon C (2019) Astrovirus in Reunion
322 Free-tailed Bat (*Mormopterus francoismoutoui*). bioRxiv 774224.
- 323 Kunz TH, Lumsden L (2006) Roost fidelity. In: Kunz T, Fenton MB (eds) Bat Ecology.
324 University of Chicago Press, 2005, Chicago, USA, pp 54–60.
- 325 Lebarbenchon C, Ramasindrazana B, Joffrin L, Bos S, Lagadec E, Le Minter G, Gomard Y,
326 Tortosa P, Wilkinson DA, Goodman SM, Mavingui P (2017) Astroviruses in bats,
327 Madagascar. *Emerg Microbes Infect* 6:e58.
- 328 Moutou F (1982) Note sur les chiroptères de l’île de la Réunion (Océan Indien). *Mammalia*
329 46:35–51.
- 330 Osborne C, Cryan PM, O’Shea TJ, Oko LM, Ndaluka C, Calisher CH, Berglund AD, Klavetter
331 ML, Bowen RA, Holmes K V., Dominguez SR (2011) Alphacoronaviruses in New World
332 bats: Prevalence, persistence, phylogeny, and potential for interaction with humans. *PLoS*
333 *One* 6:e19156.
- 334 Peel AJ, Baker KS, Hayman DTSS, Broder CC, Cunningham AA, Fooks AR, Garnier R, Wood
335 JLNN, Restif O (2018) Support for viral persistence in bats from age-specific serology and
336 models of maternal immunity. *Sci. Rep.* 8:3859.
- 337 Peel AJ, Pulliam JRC, Luis AD, Plowright RK, O’Shea TJ, Hayman DTS, Wood JLN, Webb
338 CT, Restif O (2014) The effect of seasonal birth pulses on pathogen persistence in wild
339 mammal populations. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281:20132962.
- 340 Pinzon JE, Wilson JM, Tucker CJ, Arthur R, Jahrling PB, Formenty P (2004) Trigger events:
341 enviroclimatic coupling of Ebola hemorrhagic fever outbreaks. *Am J Trop Med Hyg*
342 71:664–74.
- 343 Plowright RK, Eby P, Hudson PJ, Smith IL, Westcott D, Bryden WL, Middleton D, Reid PA,
344 McFarlane RA, Martin G, Tabor GM, Skerratt LF, Anderson DL, Crameri G, Quammen
345 D, Jordan D, Freeman P, Wang L-F, Epstein JH, Marsh GA, Kung NY, McCallum H
346 (2015) Ecological dynamics of emerging bat virus spillover. *Proc R Soc B Biol Sci*
347 282:20142124.
- 348 Plowright RK, Peel AJ, Streicker DG, Gilbert AT, Mccallum H, Wood J, Baker ML, Restif O
349 (2016) Transmission or within-host dynamics driving pulses of zoonotic viruses in
350 reservoir–host populations. *PLoS Negl Trop Dis* 10:e0004796.

- 351 Plowright RK, Sokolow SH, Gorman ME, Daszak P, Foley JE (2008) Causal inference in
352 disease ecology: Investigating ecological drivers of disease emergence. *Front Ecol*
353 *Environ* 6:420–429.
- 354 Schuh AJ, Amman BR, Sealy TK, Spengler JR, Nichol ST, Towner JS (2017) Egyptian rousette
355 bats maintain long-term protective immunity against Marburg virus infection despite
356 diminished antibody levels. *Sci Rep* 7:8763.
- 357 Stephensen CB, Casebolt DB, Gangopadhyay NN (1999) Phylogenetic analysis of a highly
358 conserved region of the polymerase gene from 11 coronaviruses and development of a
359 consensus polymerase chain reaction assay. *Virus Res* 60:181–189.
- 360 Streicker DG, Winternitzc JC, Satterfield DA, Condori-Condori RE, Broos A, Tello C,
361 Recuenco S, Velasco-Villa A, Altizer S, Valderrama W (2016) Host-pathogen
362 evolutionary signatures reveal dynamics and future invasions of vampire bat rabies. *Proc*
363 *Natl Acad Sci* 113:10926–10931.
- 364 Tong S, Conrardy C, Ruone S, Kuzmin I V, Guo X, Tao Y, Niezgodá M, Haynes L, Agwanda
365 B, Breiman RF, Anderson LJ, Rupprecht CE (2009) Detection of novel SARS-like and
366 other coronaviruses in bats from Kenya. *Emerg Infect Dis* 15:482–5.
- 367 Towner JS, Amman BR, Sealy TK, Carroll SAR, Comer JA, Kemp A, Swanepoel R, Paddock
368 CD, Balinandi S, Khristova ML, Formenty PBH, Albarino CG, Miller DM, Reed ZD,
369 Kayiwa JT, Mills JN, Cannon DL, Greer PW, Byaruhanga E, Farnon EC, Atimnedi P,
370 Okware S, Katongole-Mbidde E, Downing R, Tappero JW, Zaki SR, Ksiazek TG, Nichol
371 ST, Rollin PE (2009) Isolation of genetically diverse Marburg viruses from Egyptian fruit
372 bats. *PLoS Pathog* 5:e1000536.
- 373 Tuttle MD, Stevenson D (1982) Time and synchrony of parturition. In: Kunz TH (ed) *Ecology*
374 *of Bats*. Plenum Press, New York, pp 107–111.
- 375 Wacharapluesadee S, Duengkae P, Chaiyes A, Kaewpom T, Rodpan A, Yingsakmongkon S,
376 Petcharat S, Phengsakul P, Maneeorn P, Hemachudha T (2018) Longitudinal study of age-
377 specific pattern of coronavirus infection in Lyle’s flying fox (*Pteropus lylei*) in Thailand.
378 *Virol J* 15:38.
- 379 Willoughby AR, Phelps KL, Olival KJ (2017) A comparative analysis of viral richness and
380 viral sharing in cave-roosting bats. *Diversity* 9:35.

381 Zuk M, McKean KA (1996) Sex differences in parasite infections: Patterns and processes. Int
382 J Parasitol 26:1009–1024.

383

384 **Supplementary material: Longitudinal study of coronavirus infection**
 385 **dynamics in a bat maternity colony**

386

387 **Table 1.** Details of the number of feces samples tested (n_{tested}) and positive samples (n_{pos}) for
 388 coronavirus in the RFTB maternity colony.

389

390

391

Sampling date	N_{tested}	N_{pos}
<i>2016-2017 season</i>		
06/10/2016	12	0
27/10/2016	39	0
17/11/2016	50	2
08/12/2016	40	4
20/12/2016	50	11
10/01/2017	40	2
24/01/2017	50	5
16/02/2017	50	39
02/03/2017	50	20
23/03/2017	50	9
06/04/2017	50	4
26/04/2017	40	1
16/05/2017	35	0
08/06/2017	25	0
<i>2017-2018 season</i>		
09/11/2017	30	0
30/11/2017	50	2
19/12/2017	50	4
03/01/2018	34	1
24/01/2018	45	0
07/02/2018	50	36
28/02/2018	50	18
14/03/2018	50	4
05/04/2018	50	8
26/04/2018	30	8
17/05/2018	30	1
06/06/2018	30	0

III.4. Conclusion

L'objectif de ce chapitre était d'explorer les facteurs écologiques pouvant expliquer les dynamiques d'infection observées chez les chauves-souris. Nous avons pu voir en introduction que certaines étapes du cycle de vie des chauves-souris, et notamment celles liées à la reproduction et à la parturition pouvaient avoir une influence majeure sur la dynamique d'infection. En complément, les modifications de la structure des populations pendant ces périodes, avec des différences de comportement en fonction du sexe et l'apparition d'individus susceptibles aux infections après la parturition pourraient expliquer les dynamiques observées pour plusieurs agents (*e.g.* pics d'infection pendant le regroupement de femelles gestantes et quelques semaines après la parturition).

L'étude que nous avons menée à La Réunion a permis d'évaluer la proportion de chauves-souris (*Mormopterus francoismoutoui*) infectées pendant la saison de maternité et d'explorer la dynamique d'infection pendant deux saisons consécutives. Cette étude a révélé des variations dans la proportion d'individus infectés au cours de la saison, avec des dynamiques d'infections similaires pour les deux saisons : un premier pic d'infection au moment où la densité de femelle gestante semble être maximale, et un second pic, plus important, environ un mois après la parturition. Ces résultats rejoignent les dynamiques d'infection de coronavirus observées dans une colonie de maternité de *Myotis myotis* en Allemagne, et de paramyxovirus et de leptospires observées à La Réunion sur le même modèle d'étude, bien que nous observions le contraire en ce qui concerne l'importance des deux pics d'infections (Drexler et al. 2011). La synchronie de ces pics nécessiterait la mise en place d'études plus approfondies de la dynamique de co-infections et des interactions entre ces agents infectieux, à l'échelle individuelle et à l'échelle populationnelle.

Discussion et perspectives

Évolution moléculaire des CoVs

Selon Villareal, De Fillipis et Gottlieb (2000), la coévolution entre les virus et leurs hôtes dépendrait principalement de 3 critères : (i) si le virus se transmet principalement verticalement ou horizontalement chez des hôtes conspécifiques, (ii) si le virus n'impacte pas la survie de l'hôte et (iii) si le virus entraîne des infections persistantes, latentes et à vie (Villarreal et al. 2000). Ces conditions ne semblent a priori pas correspondre aux virus à ARN qui, du fait de l'absence d'activité correctrice de l'ARN polymérase ARN-dépendante lors de la réplication, sont sujets à des taux de mutations élevés de leur génome par rapport à aux virus à ADN et à d'autres types d'agents infectieux (Jackson et Charleston 2003). En effet, les taux de mutations élevés (10^{-6} à 10^{-3}) entraîneraient une instabilité génétique des virus à ARN, a priori incompatible avec une longue histoire de coévolution avec leurs hôtes (Jackson et Charleston 2003).

Jackson et Charleston ont exploré la congruence de phylogénies de cinq virus à ARN (arenavirus, hantavirus, lyssavirus, spumavirus et virus aviaire du groupe sarcome-leucose (ASLV)) avec leurs hôtes respectifs, afin d'identifier des associations hôtes-virus sur le long terme et d'éventuels signaux de coévolution pour chaque association (Jackson et Charleston 2003). Les résultats de cette étude ont mis en évidence des congruences entre les phylogénies des hantavirus, des spumavirus et des ASLV et leurs hôtes respectifs. En revanche, aucune congruence n'a pu être observée entre les lyssavirus et les arenavirus avec leurs hôtes (Jackson et Charleston 2003). Cependant, ces auteurs insistent sur le fait que la coévolution n'est pas le seul mécanisme entraînant une congruence entre les phylogénies des hôtes et de leurs virus (Jackson et Charleston 2003). En effet, l'observation de congruence entre les phylogénies d'hôtes et d'agents infectieux pourrait être associée à trois mécanismes (Hafner et Nadler 1990; Page 2003; Jackson et Charleston 2003; Ridley 2004). Le premier est la coévolution, définie quand les deux taxons exercent une influence évolutive réciproque et où l'évolution entraînant la spéciation d'un taxon a tendance à entraîner la spéciation de l'autre taxon. Le second mécanisme est l'évolution dite séquentielle, définie quand l'évolution d'un taxon entraîne l'évolution de l'autre taxon de façon non réciproque. Le troisième mécanisme correspond à l'évolution convergente de deux taxons qui n'ont pas d'influence l'un sur l'autre mais qui subissent des pressions de sélection similaires, aboutissant à une spéciation chez les deux taxons. L'observation seule de la congruence de topologies des arbres phylogénétiques ne permet pas de prendre en compte les taux d'évolution de chaque taxon et donc d'identifier clairement de la coévolution (Ridley 2004). Il est donc indispensable de tester la cophylogénie

d'associations hôtes-agent infectieux en se basant sur l'analyse des horloges moléculaires de chaque taxon pour explorer si les congruences sont dues à de la coévolution ou à d'autres phénomènes (Ridley 2004).

L'étude de l'évolution des CoVs dans le système insulaire de l'ouest de l'Océan Indien nous a permis de mettre en évidence que la coévolution serait le mécanisme évolutif dominant, et à l'origine de la diversité génétique des CoVs chez les chauves-souris. Des événements de sauts d'espèces (« host-switch ») ont néanmoins été détectés dans le cas où plusieurs espèces de chauves-souris vivent en syntonie. D'autres études menées dans la région, sur les mêmes espèces et dans les mêmes habitats, ont cependant mis en évidence des mécanismes évolutifs différents, en particulier pour les paramyxovirus et les bactéries leptospires (Gomard et al. 2016; Mélade et al. 2016b). Une diversité génétique majoritairement due à du « host-switch » a été mise en évidence pour les paramyxovirus (Mélade et al. 2016b), alors que plusieurs mécanismes évolutifs (duplication, co-spéciation et « host-switch ») seraient impliqués pour les leptospires (Gomard et al. 2016). Le mécanisme d'évolution des CoVs semble donc plus proche de celui des bactéries leptospires que de celui des paramyxovirus (Gomard et al. 2016; Mélade et al. 2016b; Joffrin et al. 2019) et des astrovirus, autres virus ARN pour lesquels aucune association hôte-virus n'a été mise en évidence dans l'ouest de l'Océan Indien (Lebarbenchon et al. 2017; Hoarau et al. 2018).

L'étroite coévolution entre les chauves-souris et leurs CoVs est assez surprenante pour des virus à ARN. Comme mentionné précédemment, les taux de mutations élevés des virus à ARN et la taille importante de leur génome ne devraient théoriquement pas favoriser la coévolution de ces virus avec leurs hôtes. L'ordre des Nidovirales (auquel appartiennent les CoVs) est le seul ordre dont les virus synthétisent une enzyme de type exoribonucléase (Snijder et al. 2003; Minskaia et al. 2006). Chez les CoVs, cette exoribonucléase est synthétisée à partir de la protéine non structurale *nsp14* (Minskaia et al. 2006). La comparaison entre des CoVs (Murine Hepatitis Virus et SRAS-CoV) mutants déficients en *nsp14* et des CoVs non déficients en *nsp14* a montré que les CoVs synthétisant de l'exoribonucléase avait une fidélité de réplication 15 fois supérieure à celle des virus mutants (Eckerle et al. 2007; Eckerle et al. 2010). L'exoribonucléase des CoVs servirait à moduler la fidélité de la réplication génomique (Eckerle et al. 2007; Eckerle et al. 2010; Ogando et al. 2019) et permettrait une adaptabilité limitée du virus par rapport aux autres virus à ARN (Smith et al. 2013; Ogando et al. 2019) qui pourrait expliquer la coévolution observée entre ces virus et leurs hôtes.

Rôle des hôtes intermédiaires : cas du NL63-CoV

Les hôtes intermédiaires pourraient jouer un rôle déterminant dans l'amplification de la transmission virale (Wong et al. 2007; Karesh et al. 2012; Plowright et al. 2015). L'émergence de nombreux virus des chauves-souris chez l'Homme est effectivement associée à un maintien de la chaîne de transmission chez des hôtes intermédiaires, correspondant souvent à des animaux d'élevage (*e.g.* porcs pour le virus Nipah, chevaux pour le virus Hendra, dromadaires pour le MERS) (Han et al. 2015). Lors de l'émergence de SRAS-CoV en Chine en 2002, des génotypes viraux proches du SRAS-CoV identifié chez l'Homme ont été détectés chez des civettes (Guan et al. 2003; Tu et al. 2004; Kan et al. 2005). En effet, des écouvillons oraux et rectaux effectués sur des civettes (*Paguma larvata*) et des chiens viverrins (*Nyctereutes procyonoides*) dans plusieurs marchés animaux en Chine ont été détectés positifs au SRAS-CoV par PCR, de même que des échantillons environnementaux comme des cages et des murs des cabines de stands (Guan et al. 2003; Webster 2004; Kan et al. 2005). Ces résultats suggèrent que les civettes qui provenaient d'un marché d'animaux, approvisionné par des fermes d'élevages implantées dans plusieurs provinces chinoises, auraient été impliquées dans la transmission des premiers cas de SRAS-CoV (Guan et al. 2003; Tu et al. 2004; Webster 2004). Cependant, l'analyse du statut sanitaire de 1 107 civettes appartenant à 25 fermes d'élevages, dans 12 provinces différentes, n'a pas permis de détecter le virus (Kan et al. 2005). Ainsi, il n'est pas exclu que les civettes ayant transmis le SRAS-CoV à partir de marchés aient été elles-mêmes contaminées par une autre espèce animale également présente sur ces marchés. Des infections expérimentales avec le SRAS-CoV ont révélé que les rats, les souris, les chats ou encore les porcs sont susceptibles à l'infection par ce virus (Wang et al. 2006). Ces espèces domestiques et péri-domestiques auraient ainsi pu être infectées par des chauves-souris et à leur tour transmettre le virus aux civettes et aux chiens viverrins, bien que cette hypothèse n'ait pas été vérifiée.

Notre étude sur la phylogéographie des coronavirus de l'ouest de l'Océan Indien a permis d'identifier une grande diversité de virus sur la base du séquençage partiel du gène codant l'ARN polymérase ARN-dépendante (Joffrin et al. 2019). Nous avons identifié des coronavirus de chauves-souris phylogénétiquement proches de coronavirus humains, en particulier du HCoV-NL63, chez l'espèce *Triaenops afer* au Mozambique. Dans la littérature, des virus étroitement apparentées au HCoV-NL63 ont été détectés chez l'espèce *Triaenops afer* au Kenya (Tao et al. 2017). Les résultats de notre étude semblent donc soutenir l'hypothèse d'une origine est-africaine du HCoV-NL63, potentiellement chez les chauves-souris *Triaenops*

afér. Pour tous les coronavirus humains, des hôtes intermédiaires ont déjà été identifiés pour certain (SRAS-CoV, MERS-CoV) ou fortement suspectés (HCoV-229E, HCoV-HKU1, HCoV-OC43) (Cui et al. 2019). Cependant, le coronavirus HCoV-NL63 est le seul pour lequel il n'existe pas de piste sur le type d'hôte intermédiaire qui aurait pu permettre l'émergence de ce virus de chauve-souris chez l'Homme (Cui et al. 2019; El-Duah et al. 2019a). Afin d'investiguer les hôtes intermédiaires potentiellement impliqués dans la transmission du HCoV-NL63 des chauves-souris à l'Homme, plusieurs approches sont envisageables. La première approche consisterait à réaliser des infections expérimentales *in vivo* pour explorer la sensibilité de différentes espèces hôtes. En 2017, Vergara-Alert et collaborateurs ont infecté expérimentalement plusieurs espèces (lamas, porcs, moutons et chevaux) avec le virus du MERS-CoV afin d'étudier leur susceptibilité (Vergara-Alert et al. 2017). Les résultats ont révélé que le virus se répliquait chez les lamas et les porcs mais pas chez les moutons et les chevaux (Vergara-Alert et al. 2017), démontrant ainsi un spectre d'hôtes restreint chez des animaux domestiques. La seconde approche serait de tester la présence d'anticorps dirigés contre le HCoV-NL63 chez une grande diversité d'hôtes en Afrique de l'ouest, et en particulier au Kenya, zone où le virus aurait potentiellement émergé à partir des chauves-souris. En 2019, El-Duah et collaborateurs ont développé un protocole de détection sérologique pour détecter la présence d'anticorps contre le HCoV-NL63 chez 422 moutons, 397 porcs, 320 chèvres, 163 bovins, et 19 ânes, au Ghana (El-Duah et al. 2019a). Bien que leur protocole soit valide comme outil diagnostique, aucun des animaux testés n'était porteur d'anticorps anti-HCoV-NL63 (El-Duah et al. 2019a). Cette équipe a également recherché la présence d'anticorps anti-HCoV-229E dans le bétail au Ghana, et on peut alors imaginer que le choix du Ghana pour la précédente étude sur la détection du HCoV-NL63 sur le bétail était plutôt opportuniste (El-Duah et al. 2019b). Nous pensons que la mise en place d'une étude réalisée sur la côte sud-est du Kenya, dans les zones où des virus apparentés au HCoV-NL63 ont été identifiés chez des chauves-souris, et qui se focaliserait sur une large diversité d'animaux d'élevages (porcs, moutons, dromadaires, bovins, chèvres, *etc.*) permettrait potentiellement d'identifier le(s) hôte(s) intermédiaire(s) qui auraient pu intervenir dans la transmission d'un virus ancestral commun aux coronavirus de chauves-souris au HCoV-NL63 chez l'Homme.

Identification des voies de transmission

Les voies de transmission des agents infectieux hébergés par les chauves-souris sont multiples, et dépendent des agents infectieux considérés et de leurs modes d'excrétion. Certaines voies de transmission, telle que le contact direct par morsure, sont considérées comme prépondérantes dans l'inconscient collectif alors qu'elles sont à l'origine d'un nombre limité de cas d'infection chez l'Homme. D'autres voies, comme celles faisant intervenir des vecteurs arthropodes, ont été négligées et mériteraient plus d'attention, en particulier pour des arboviroses (*e.g.* flavivirus, alphavirus), mais aussi pour des virus supposés à transmission directe mais qui pourraient faire intervenir également des vecteurs (*e.g.* Ebola). Au-delà des recherches à développer sur les modes de transmission des agents infectieux associés aux chauves-souris, il est également essentiel de sensibiliser les populations ayant des contacts étroits avec les chauves-souris, afin de limiter le risque d'émergence de zoonoses.

L'étude des voies de transmission a effectivement permis de limiter l'émergence de zoonoses virales ces dernières décennies par l'application de mesures de prévention, en limitant par exemple la proximité des élevages et des vergers dans des zones hébergeant des chauves-souris frugivores potentiellement porteuses de virus Hendra et Nipah, en sensibilisant les populations locales aux comportements à adopter ou en conseillant les éleveurs de vacciner leurs chevaux pour le virus Hendra en Australie (Biosecurity Queensland et al. 2014; Nahar et al. 2017). Entre 2012 et 2014, l'Agence des États-Unis pour le Développement International (USAID) a financé des campagnes d'information et de prévention au Bangladesh sur le risque lié au virus Nipah et à la consommation de sirop de palmier dattier (Nahar et al. 2017). Ces campagnes consistaient en la mise en place de messages de prévention par l'intermédiaire d'affiches, de formations de membres d'ONG locales à la communication sur ce sujet, à la diffusion d'autocollants ou encore d'annonces à la télévision nationale bangladaise (Nahar et al. 2017). Au vu de la réticence de certains agriculteurs à arrêter de produire et consommer du sirop de palmier dattier, l'installation de protection autour des collecteurs de sève de palmier a également été développée, limitant ainsi les risques de contamination par l'urine ou la salive de chauves-souris (Nahar et al. 2017).

Les voies de transmission de nombreuses zoonoses restent cependant non élucidées malgré l'incidence sur la santé humaine et animale. Le rôle des chauves-souris dans la transmission de virus Ebola à l'Homme est fortement suspecté (Caron et al. 2018) du fait de la détection du génome viral ou d'anticorps dirigés contre les virus Ebola chez 9 espèces de

chauves-souris (Leroy et al. 2004; Pourrut et al. 2005; Pourrut et al. 2007; Hayman et al. 2012; Ogawa et al. 2015; De Nys et al. 2018). L'émergence de plusieurs épidémies liées au virus Ebola à des périodes de migrations massives de chauves-souris, ainsi que leur consommation, renforcent également les hypothèses sur le rôle de réservoir de ces hôtes (Leroy et al. 2005). Cependant, l'ensemble de ces preuves restent circonstancielles et aucune observation concrète de la transmission de virus Ebola à l'Homme n'a été clairement établie (Caron et al. 2018). En effet, malgré la détection d'anticorps contre le virus Ebola, la détection d'ARN de ce virus dans des populations de chauves-souris, et le succès d'infections expérimentales de virus Ebola à trois espèces de chauves-souris (*Tadarida condylura*, *Tadarida pumila*, et *Epomophorus wahlbergi*) (Swanepoel et al. 1996), aucune étude n'a réussi à isoler le virus à partir de prélèvements biologiques effectués sur des chauves-souris (Caron et al. 2018).

Le virus Ebola a également été détecté par sérologie et par PCR chez d'autres animaux comme les chimpanzés (*Pan troglodites troglodites* et *Pan troglodites verus*), les gorilles des montagnes (*Gorilla gorilla*) ou les antilopes des forêts (*Cephalophus* sp.) en République Démocratique du Congo (Report of an International Commission 1978; Leroy et al. 2004). La République Démocratique du Congo est le premier pays consommateur de viande de brousse du bassin du Congo, les ongulés et les primates représentant les taxons les plus consommés (Wilkie et Carpenter 1999). La transmission de virus Ebola à l'Homme pourrait se faire par la consommation de viande de ces animaux, potentiellement infectés par le virus Ebola au contact des chauves-souris. Plusieurs études suggèrent néanmoins que ces animaux forestiers seraient sensibles à l'infection qui entraînerait de la mortalité dans ces populations (Leroy et al. 2004; Lahm et al. 2007; Caron et al. 2018). Cependant, la preuve d'infection de ces animaux au virus Ebola n'a jusqu'à présent été prouvée qu'à partir de cadavres, et à notre connaissance, aucune étude sérologique n'a mesuré la prévalence d'animaux ayant été en contact avec le virus dans les populations de primates non humains et d'antilopes. Pour tester cette hypothèse, des investigations sérologiques en population naturelle chez ces animaux pourraient être envisagées afin d'estimer la proportion d'animaux qui sont en contact avec le virus dans les populations sauvages.

Investigations en populations naturelles : aspects éthiques

L'investigation de la circulation du virus Marburg dans les populations de chauves-souris a été réalisée par la recherche d'ARN du virus Marburg dans des organes, par biologie

moléculaire (Towner et al. 2009; Amman et al. 2012; Amman et al. 2014). Afin d'explorer la probabilité de transmission virale du virus Marburg par la salive ou par aérosols, Towner et collaborateurs ont également testé des écouvillons oraux et rectaux (Towner et al. 2009). Cette méthode n'avait pas permis de détecter d'ARN viral, probablement du fait d'un nombre d'échantillons testés trop limité (moins de 10) et d'une charge virale faible (Towner et al. 2009; Amman et al. 2015). Suite à cet essai non-concluant pour la détection du virus Marburg, l'échantillonnage par capture définitive a perduré comme méthodologie de référence. D'autres études ont alors utilisé les organes pour la détection du virus Marburg par RT-PCR, sacrifiant ainsi plus de 2 000 roussettes d'Égypte (Amman et al. 2012; Amman et al. 2014). Cependant, des infections expérimentales effectuées sur cette même espèce (six ans après le premier essai) ont pu mettre en évidence la présence de virus dans des écouvillons oraux et rectaux, et son isolement à partir de ce type de prélèvement biologique (Amman et al. 2015).

Mes travaux de thèse ont permis d'explorer la dynamique d'infection des coronavirus chez une espèce de chauves-souris endémique de La Réunion en utilisant une méthode indirecte et non-invasive, limitant les perturbations sur la colonie étudiée. Le succès de la détection de coronavirus dans les chauves-souris dans la région par l'utilisation d'écouvillons oraux et rectaux, et par la collecte de fèces, a permis de répondre à de nombreuses questions de cette thèse (prévalences, diversité génétique, évolution, écologie), ce qui laisse présager de l'utilisation préférentielle de ces méthodes non-invasives pour de futures recherches sur les coronavirus de chauves-souris. Cependant, on peut reconnaître que la capture des individus pour l'étude des effets de la structure de la population sur les dynamiques d'infection aurait néanmoins permis de catégoriser les différentes classes d'âges et les sexes, et ainsi d'étayer nos hypothèses et conclusions. L'évolution des protocoles et des méthodologies d'échantillonnage sur la faune sauvage, en particulier pour les chauves-souris qui ont un haut statut de conservation, doit s'orienter vers une réduction des sacrifices d'animaux quand une alternative est possible. Par exemple, les questions liées au tropisme des agents infectieux et à la quantification de la charge virale dans les organes nécessitent incontestablement le prélèvement d'organes. Cependant, les études visant à détecter la présence d'agents infectieux, caractériser leur dynamique de transmission et l'évolution génétique des agents, ne nécessitent pas systématiquement le sacrifice des animaux et peuvent ainsi être réalisées sans conflit avec des actions de conservation.

Le domaine de la métagénomique s'est notoirement démocratisé, notamment dans les études sur la détection d'agents infectieux dans la faune sauvage, et son utilisation devrait

permettre d'optimiser la recherche de la diversité d'agents infectieux dans une population (Bergner et al. 2019). L'application de ces méthodes aux agents infectieux de chauves-souris a permis de détecter une grande diversité d'agents biologiques (Donaldson et al. 2010; Li et al. 2010; Ge et al. 2012; Baker et al. 2013; He et al. 2014; Geldenhuys et al. 2018; Yinda et al. 2018). Par exemple, Yinda et collaborateurs ont utilisé la métagénomique pour étudier la diversité des agents biologiques présents dans 87 fèces de roussettes paillées africaines (*Eidolon helvum*) et d'épomophores de Gambie (*Epomophorus gambianus*) au Cameroun (Yinda et al. 2018). Le séquençage par la méthode Illumina a généré 108 millions de fragments de séquences lisibles à partir de ces échantillons (Yinda et al. 2018). Parmi ces séquences, 14% ont pu être identifiées comme virales et 86% comme bactériennes, appartenant à l'hôte ou non assignables (Yinda et al. 2018). Sur les 15 millions de séquences virales, seules 1,6 millions étaient des séquences virales de virus eucaryotes (Yinda et al. 2018). Ainsi, cette étude a permis d'identifier plus de 29 familles virales dans les fèces des deux espèces de chauves-souris, dont une majorité de familles virales présentes chez les animaux vertébrés, incluant les Coronaviridae, Reoviridae, Papillomaviridae ou encore Astroviridae (Yinda et al. 2018). Cette approche pourrait être appliquée aux populations de chauves-souris de la région ouest de l'Océan Indien, afin de compléter nos connaissances sur la diversité d'agents infectieux susceptibles d'entraîner des zoonoses (filovirus, paramyxovirus, CoVs, lyssavirus, influenza virus, etc.). Cette approche permettrait également de cibler nos recherches sur l'écologie et l'évolution des agents infectieux sur les taxons présentant un risque potentiel d'émergence.

Conservation et zoonoses

Les chauves-souris sont très vulnérables aux changements environnementaux et aux activités humaines (e.g. modifications des habitats, chasse) (Jones et al. 2009; Conenna et al. 2017). Les chauves-souris endémiques insulaires (CSEI) représentent environ 20% des espèces de chauves-souris recensées dans le monde (Conenna et al. 2017). En 2017, Conenna et collaborateurs ont comparé la proportion des statuts de vulnérabilité de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN) de 310 espèces de CSEI et 827 espèces de chauves-souris non endémiques, insulaires ou non (Conenna et al. 2017). Cette étude a révélé que 33% des espèces de CSIE sont aujourd'hui considérées comme menacées contre seulement 8% des autres espèces (Conenna et al. 2017).

La roussette noire *Pteropus niger* est une espèce de chauve-souris frugivore endémique de l'île Maurice et en danger d'extinction (Kingston et al. 2018). Un conflit entre la population mauricienne et ces animaux existe depuis plusieurs années, du fait des dégâts causés par les chauves-souris sur les vergers (Florens 2016; Oleksy et al. 2018). Malgré le statut de conservation de cette espèce, des campagnes d'abatages massifs ont été conduites entre 2015 à 2018 par le gouvernement mauricien pour tenter de limiter les dégâts causés par cette espèce (Florens 2016; Oleksy et al. 2018). Ainsi, plus de 50 000 individus ont été abattus, réduisant la population de cette espèce de 62 500 à 37 000 individus en moins de 3 ans (Florens 2016; Vincenot et al. 2017; Kingston et al. 2018). Nous avons pu mettre en évidence que les chauves-souris des îles de l'ouest de l'Océan Indien abritent une grande diversité de CoVs (Joffrin et al. 2019). Bien que nous n'ayons pas détecté dans notre étude de CoVs chez la roussette noire, il n'est pas exclu que le nombre d'échantillons (N=48) ou que le type d'échantillons disponibles à tester (poumons) aient impacté la probabilité de détection de CoVs chez cette espèce. Nous avons également pu voir que les dynamiques d'infection de CoVs étaient liées à un grand nombre de facteurs comme le type de gîte et la structure de la population de chauves-souris (Drexler et al. 2011; Joffrin et al. 2019). La modification des densités, de la répartition et de la structure des populations pourraient, en plus de menacer la conservation de ces espèces sensibles, avoir un effet sur les dynamiques d'agents infectieux et augmenter les risques de transmissions à d'autres hôtes (Olival 2016).

De manière générale, la gestion d'espèces considérées comme nuisibles doit s'appuyer sur les travaux d'épidémiologie vétérinaire. En effet, des tentatives d'éradication de zoonoses par la réduction de l'abondance des espèces réservoirs ont souvent été un échec, au mieux en n'impactant pas la dynamique d'infection, au pire en augmentant les prévalences dans les populations animales réservoirs (Donnelly et al. 2003; Choisy et Rohani 2006; Woodroffe et al. 2006). Les blaireaux (*Meles meles*) ont été identifiés comme réservoir de la tuberculose bovine au Royaume-Uni, et semblent constituer un maillon essentiel de la transmission au bétail (Krebs et al. 1997). Plusieurs campagnes d'abatages de blaireaux ont été menées entre les années 1975 et 1997 dans le but de diminuer le nombre d'individus réservoirs et donc de limiter la transmission de la tuberculose bovine au bétail (Donnelly et al. 2003). Cependant, le bilan de ces campagnes s'est avéré contreproductif, avec notamment une augmentation de l'incidence de la tuberculose bovine dans le bétail dans les zones d'abatages (Donnelly et al. 2003). Ces approches ont également été entreprises pour réduire les prévalences de certains virus dans des populations de chauves-souris, comme pour la rage chez les chauves-souris vampires en Amérique latine ou pour le virus Marburg chez la roussette d'Égypte en Ouganda, sans pour

autant réduire les prévalences d'infection (Streicker et al. 2012; Amman et al. 2012; Amman et al. 2014; Olival 2016).

Après l'émergence du virus Marburg en 2007 dans la mine Kitaka en Ouganda, des mineurs locaux ont tenté d'exterminer la colonie de roussettes d'Égypte, comprenant entre 40 000 et 100 000 animaux, en empêchant les animaux de sortir de la grotte pour aller s'alimenter pendant plusieurs semaines (Amman et al. 2014). En 2012, la réouverture de la mine a entraîné la recolonisation de la grotte par une population de chauves-souris moins nombreuse que celle d'origine (Amman et al. 2014). Après 2012, la détection du virus Marburg sur un échantillon de 400 roussettes a révélé que la prévalence d'infection était significativement plus élevée (13 %) que les prévalences d'infection dans la même grotte en 2007 (5,6 %) et 2008 (4,5 %) (Towner et al. 2009; Amman et al. 2014). L'abattage de chauves-souris pourraient ainsi favoriser l'émergence de zoonoses chez l'Homme en augmentant la proximité des chasseurs avec les animaux, en provoquant la fragmentation, la réduction des habitats, la fuite des animaux dans de nouveaux territoires et en induisant un stress physiologique qui favoriserait l'excrétion virale (Olival et al. 2016). À l'avenir, la gestion des populations de chauves-souris devrait alors s'appuyer sur des études préliminaires de la diversité d'agents infectieux et sur leur dynamique d'infection afin de mettre en place des mesures de gestion intégrant à la fois des problématiques de conservation et d'émergence de zoonoses.

Références bibliographiques

- Afelt A, Frutos R, Devaux C (2018) Bats, coronaviruses, and deforestation: Toward the emergence of novel infectious diseases? *Front. Microbiol.* 9:702. doi: 10.1016/j.meegid.2017.12.009
- Agnarsson I, Kuntner M (2012) The generation of a biodiversity hotspot: Biogeography and phylogeography of the Western Indian Ocean islands. In: Anamthawat-Jónsson K (éd) *Current Topics in Phylogenetics and Phylogeography of Terrestrial and Aquatic Systems*, IntechOpen. InTech, Rijeka, Croatia, p 47-58.
- Ahn M, Anderson DE, Zhang Q, Tan CW, Lim BL, Luko K, Wen M, Chia WN, Mani S, Wang LC, Ng JHJ, Sobota RM, Dutertre CA, Ginhoux F, Shi ZL, Irving AT, Wang LF (2019) Dampened NLRP3-mediated inflammation in bats and implications for a special viral reservoir host. *Nat Microbiol* 4:789-799. doi: 10.1038/s41564-019-0371-3
- Ahn M, Cui J, Irving AT, Wang LF (2016) Unique loss of the PYHIN gene family in bats amongst mammals: Implications for inflammasome sensing. *Sci Rep* 6:21722. doi: 10.1038/srep21722
- Al-Khannaq MN, Ng KT, Oong XY, Pang YK, Takebe Y, Chook JB, Hanafi NS, Kamarulzaman A, Tee KK (2016) Molecular epidemiology and evolutionary histories of human coronavirus OC43 and HKU1 among patients with upper respiratory tract infections in Kuala Lumpur, Malaysia. *Virol J* 13:33. doi: 10.1186/s12985-016-0488-4
- Allan BF, Keesing F, Ostfeld RS (2003) Effect of forest fragmentation on Lyme disease risk. *Conserv Biol* 17:267-272. doi: 10.1046/j.1523-1739.2003.01260.x
- Allen T, Murray KA, Zambrana-Torrel C, Morse SS, Rondinini C, Di Marco M, Breit N, Olival KJ, Daszak P, Marco M Di, Breit N, Olival KJ, Daszak P (2017) Global hotspots and correlates of emerging zoonotic diseases. *Nat Commun* 8:1124. doi: 10.1038/s41467-017-00923-8
- Allocati N, Petrucci AG, Di Giovanni P, Masulli M, Di Ilio C, De Laurenzi V (2016) Bat–man disease transmission: Zoonotic pathogens from wildlife reservoirs to human populations. *Cell Death Discov* 2:16048. doi: 10.1038/cddiscovery.2016.48
- Altizer S, Bartel R, Han BA (2011) Animal migration and infectious disease risk. *Science* 331:296-302. doi: 10.1126/science.1194694
- Altizer S, Dobson A, Hosseini P, Hudson P, Pascual M, Rohani P (2006) Seasonality and the dynamics of infectious diseases. *Ecol. Lett.* 9:467-484. doi: 10.1111/j.1461-0248.2005.00879.x
- Altizer S, Hochachka WM, Dhondt AA (2004) Seasonal dynamics of *Mycoplasmal conjunctivitis* in eastern North American house finches. *J Anim Ecol* 73:309-322. doi: 10.1111/j.0021-8790.2004.00807.x
- American Society of Mammalogist (2019) Mammal Diversity Data Base: Chiroptera. In: *Am. Soc. Mammal.*

<https://mammaldiversity.org/#Y2hpcm9wdGVyYSZnbG9iYWxfc2VhcmNoPXRydWUmbG9vc2U9dHJ1ZQ>

- Amman BR, Carroll SA, Reed ZD, Sealy TK, Balinandi S, Swanepoel R, Kemp A, Erickson BR, Comer JA, Campbell S, Cannon DL, Khristova ML, Atimnedi P, Paddock CD, Kent Crockett RJ, Flietstra TD, Warfield KL, Unfer R, Katongole-Mbidde E, Downing R, Tappero JW, Zaki SR, Rollin PE, Ksiazek TG, Nichol ST, Towner JS (2012) Seasonal pulses of Marburg virus circulation in juvenile *Rousettus aegyptiacus* bats coincide with periods of increased risk of human infection. *PLoS Pathog* 8:e1002877. doi: 10.1371/journal.ppat.1002877
- Amman BR, Jones MEB, Sealy TK, Uebelhoer LS, Schuh AJ, Bird BH, Coleman-McCray JD, Martin BE, Nichol ST, Towner JS (2015) Oral shedding of Marburg virus in experimentally infected Egyptian fruit bats (*Rousettus aegyptiacus*). *J Wildl Dis* 51:113-124. doi: 10.7589/2014-08-198
- Amman BR, Nyakarahuka L, McElroy AK, Dodd KA, Sealy TK, Schuh AJ, Shoemaker TR, Balinandi S, Atimnedi P, Kaboyo W, Nichol ST, Towner JS (2014) Marburg virus resurgence in Kitaka mine bat population after extermination attempts, Uganda. *Emerg Infect Dis* 20:1761-1764. doi: 10.3201/eid2010.140696
- Andre-Fontaine G, Aviat F, Thorin C (2015) Waterborne leptospirosis: Survival and preservation of the virulence of pathogenic *Leptospira* spp. in fresh water. *Curr Microbiol* 71:136-142. doi: 10.1007/s00284-015-0836-4
- Annan A, Baldwin HJ, Corman VM, Klose SM, Owusu M, Nkrumah E, Kofi Badu E, Anti P, Agbenyega O, Meyer B, Oppong S, Sarkodie YA, Kalko EK V, Lina PHC, Godlevska E V, Reusken C, Seebens A, Gloza-Rausch F, Vallo P, Tschapka M, Drosten C, Drexler JF (2013) Human betacoronavirus 2c EMC/2012-related viruses in bats, Ghana and Europe. *Emerg Infect Dis* 19:456-459. doi: 10.3201/eid1903.121503
- Anthony SJ, Gilardi K, Menachery VD, Goldstein T, Ssebide B, Mbabazi R, Navarrete-Macias I, Liang E, Wells H, Hicks A, Petrosov A, Byarugaba DK, Debbink K, Dinnon KH, Scobey T, Randell SH, Yount BL, Cranfield M, Johnson CK, Baric RS, Lipkin WI, Mazet JAK (2017a) Further evidence for bats as the evolutionary source of Middle East Respiratory Syndrome coronavirus. *MBio* 8:e00373-17. doi: 10.1128/mBio.00373-17
- Anthony SJ, Johnson CK, Greig DJ, Kramer S, Che X, Wells H, Hicks AL, Joly DO, Wolfe ND, Daszak P, Karesh W, Lipkin WI, Morse SS, Mazet JAK, Goldstein T (2017b) Global patterns in coronavirus diversity. *Virus Evol* 3:vex012. doi: 10.1093/ve/vex012
- Antonovics J, Wilson AJ, Forbes MR, Hauffe HC, Kallio ER, Leggett HC, Longdon B, Okamura B, Sait SM, Webster JP (2017) The evolution of transmission mode. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 372:20160083. doi: 10.1098/rstb.2016.0083
- Anyamba A, Linthicum KJ, Small J, Britch SC, Pak E, De La Rocque S, Formenty P, Hightower AW, Breiman RF, Chretien JP, Tucker CJ, Schnabel D, Sang R, Haagsma K, Latham M, Lewandowski HB, Magdi SO, Mohamed MA, Nguku PM, Reynes JM, Swanepoel R (2010) Prediction, assessment of the Rift Valley fever activity in east and southern Africa

- 2006-2008 and possible vector control strategies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83:43-51. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0289
- Arunkumar G, Chandni R, Mourya DT, Singh SK, Sadanandan R, Sudan P, Bhargava B (2019) Outbreak investigation of Nipah virus disease in Kerala, India, 2018. *J Infect Dis* 219:1867-1878. doi: 10.1093/infdis/jiy612
- Assemblée nationale (2010) Rapport fait au nom de la commission d'enquête sur la manière dont a été programmée, expliquée et gérée la campagne de vaccination contre la grippe A(H1N1). Paris
- Augustine DJ, Augustine J (2014) Modelling interactions: coexistence, population dynamics and conservation implications. *J Appl Ecol* 35:261-272. doi: 10.2307/2405125
- Bahl J, Krauss S, Kühnert D, Fourment M, Raven G, Pryor SP, Niles LJ, Danner A, Walker D, Mendenhall IH, Su YCF, Dugan VG, Halpin RA, Stockwell TB, Webby RJ, Wentworth DE, Drummond AJ, Smith GJD, Webster RG (2013) Influenza A virus migration and persistence in North American wild birds. *PLoS Pathog* 9:e1003570. doi: 10.1371/journal.ppat.1003570
- Baker BH, Miller JA (1963) Geology and geochronology of the Seychelles islands and structure of the floor of the Arabian sea. *Nature* 199:346-348. doi: 10.1038/199346a0.
- Baker DG (1998) Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. *Clin Microbiol Rev* 11:231-66. doi: 10.1128/CMR.11.2.231
- Baker KS, Leggett RM, Bexfield NH, Alston M, Daly G, Todd S, Tachedjian M, Holmes CEG, Cramer S, Wang L-F, Heeney JL, Suu-Ire R, Kellam P, Cunningham AA, Wood JLN, Caccamo M, Murcia PR (2013) Metagenomic study of the viruses of African straw-coloured fruit bats: Detection of a chiropteran poxvirus and isolation of a novel adenovirus. *Virology* 441:95-106. doi: 10.1016/J.VIROL.2013.03.014
- Baker KS, Suu-Ire R, Barr J, Hayman DTS, Broder CC, Horton DL, Durrant C, Murcia PR, Cunningham AA, Wood JLN (2014) Viral antibody dynamics in a chiropteran host. *J Anim Ecol* 83:415-428. doi: 10.1111/1365-2656.12153
- Baldwin HJ, Corman VM, Nkrumah EE, Badu EK, Anti P, Annan AA, Owusu M, Agbenyega O, Opong SK, Klose SM, Adu-Sarkodie Y, Stow AJ, Vallo P, Kalko EK V., Drexler JF, Drosten C, Tschapk M (2015) Widespread coronavirus infection in Ghanaian bats: seasonal, demographic and ecological factors influence infection risk. en préparation
- Banque Mondiale (2012) People, pathogens and our planet: The economics of One Health
- Banque Mondiale (2019) Pourcentage du PIB dépensé dans le secteur de la santé par pays. In: Banq. Mond. <http://datatopics.worldbank.org/health/health>
- Bean AGD, Baker ML, Stewart CR, Cowled C, Deffrasnes C, Wang LF, Lowenthal JW (2013) Studying immunity to zoonotic diseases in the natural host-keeping it real. *Nat Rev Immunol* 13:851-861. doi: 10.1038/nri3551

- Belay ED, Kile JC, Hall AJ, Barton-Behravesh C, Parsons MB, Salyer S, Walke H (2017) Zoonotic disease programs for enhancing global health security. *Emerg Infect Dis* 23:S65-S70. doi: 10.3201/eid2313.170544
- Belouzard S, Millet JK, Licitra BN, Whittaker GR (2012) Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses* 4:1011-1033. doi: 10.3390/v4061011
- Beltz LA (2018) Bacteria from bat flies. In: *Bats and human health*. Wiley-Blackwell, Hoboken, USA, p 231-232.
- Bergmann CC, Lane TE, Stohlman SA (2006) Coronavirus infection of the central nervous system: Host-virus stand-off. *Nat Rev Microbiol* 4:121-132. doi: 10.1038/nrmicro1343
- Bergner LM, Orton RJ, da Silva Filipe A, Shaw AE, Becker DJ, Tello C, Biek R, Streicker DG (2019) Using noninvasive metagenomics to characterize viral communities from wildlife. *Mol Ecol Resour* 19:128-143. doi: 10.1111/1755-0998.12946
- Bijlenga G, Cook JKA, Gelb J, De Wit JJ (2004) Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine: A review. *Avian Pathol.* 33:550-557. doi: 10.1080/03079450400013154
- Biosecurity Queensland, Australian Veterinary Association, Queensland Health, Workplace Health and Safety Queensland (2014) Hendra virus infection prevention advice. https://www.health.qld.gov.au/__data/assets/pdf_file/0026/428624/hev-inf-prev-adv.pdf
- Bird BH, Mazet JAK (2018) Detection of emerging zoonotic pathogens: An integrated One Health approach. *Annu Rev Anim Biosci* 6:121-139. doi: 10.1146/annurev-animal-030117-014628
- Blanshard W, Bodley K (2008) Koalas. In « *Medicine of Australian Mammals* ». (Eds L. Vogelneust and R. Woods.) pp. 227–327.
- Bouley T, Machalaba C, Romanelli C, Wannous C (2017) Linking health, environment, and climate to reduce disaster risk. <https://www.preventionweb.net/experts/oped/view/54404>
- Boulinier T, Staszewski V (2008) Maternal transfer of antibodies: Raising immuno-ecology issues. *Trends Ecol Evol* 23:282-288. doi: 10.1016/j.tree.2007.12.006
- Bradley CA, Altizer S (2007) Urbanization and the ecology of wildlife diseases. *Trends Ecol Evol* 22:95-102. doi: 10.1016/j.tree.2006.11.001
- Breman JG, Heymann DL, Lloyd G, McCormick JB, Miatudila M, Murphy FA, Muyembé-Tamfun JJ, Piot P, Ruppel JF, Sureau P, Van Der Groen G, Johnson KM (2016) Discovery and description of Ebola Zaire virus in 1976 and relevance to the West African epidemic during 2013-2016. *J Infect Dis* 214:S93-S101. doi: 10.1093/infdis/jiw207
- Breugelmans JG, Zucs P, Porten K, Broll S, Niedrig M, Ammon A, Krause G (2004) SARS transmission and commercial aircraft. *Emerg. Infect. Dis.* 10:1502-1503. doi: 10.3201/eid1008.040093

- Brook CE, Bai Y, Dobson AP, Osikowicz LM, Ranaivoson HC, Zhu Q, Kosoy MY, Dittmar K (2015) *Bartonella* spp. in fruit bats and blood-feeding ectoparasites in Madagascar. PLoS Negl Trop Dis 9:e0003532. doi: 10.1371/journal.pntd.0003532
- Brook CE, Dobson AP (2015) Bats as « special » reservoirs for emerging zoonotic pathogens. Trends Microbiol. 23:172-180. doi: 10.1016/j.tim.2014.12.004
- Brook CE, Ranaivoson HC, Broder CC, Cunningham AA, Héraud JM, Peel AJ, Gibson L, Wood JLN, Metcalf CJ, Dobson AP (2019) Disentangling serology to elucidate henipa- and filovirus transmission in Madagascar fruit bats. J Anim Ecol 88:1001-1016. doi: 10.1111/1365-2656.12985
- Buceta J, Johnson K (2017) Modeling the Ebola zoonotic dynamics: Interplay between enviroclimatic factors and bat ecology. PLoS One 12:e0179559. doi: 10.1371/journal.pone.0179559
- Bush SE, Clayton DH (2018) Anti-parasite behaviour of birds. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 373:20170196. doi: 10.1098/rstb.2017.0196
- Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T (2006) Bats: Important reservoir hosts of emerging viruses. Clin Microbiol Rev 19:531-545. doi: 10.1128/CMR.00017-06
- Calisher CH, Holmes KV, Dominguez SR, Schountz T, Cryan P (2008) Bats prove to be rich reservoirs for emerging viruses. Microbe 3:521-528. doi: 10.1128/microbe.3.521.1
- Caron A, Bourgarel M, Cappelle J, Liégeois F, De Nys HM, Roger F (2018) Ebola virus maintenance: if not (Only) bats, what else? Viruses 10:549. doi: 10.3390/v10100549
- Carroll D, Daszak P, Wolfe ND, Gao GF, Morel CM, Morzaria S, Pablos-Méndez A, Tomori O, Mazet JAK (2018) The Global Virome Project. Science 359:872-874. doi: 10.1126/science.aap7463
- Cavanagh D (2007) Coronavirus avian infectious bronchitis virus. Vet Res 38:281-297. doi: 10.1051/vetres:2006055
- Centers for Disease Control and Prevention (2018a) Ecology and Transmission. In: Centers Dis. Control Prev. <https://www.cdc.gov/plague/transmission/index.html>
- Centers for Disease Control and Prevention (2019a) History of the plague. In: Centers Dis. Control Prev. <https://www.cdc.gov/plague/history/index.html>
- Centers for Disease Control and Prevention (2017) Drug-resistant TB. In: Centers Dis. Control Prev. <https://www.cdc.gov/tb/topic/drtb/default.htm>
- Centers for Disease Control and Prevention (2019b) Cost of the Ebola Epidemic. In: Centers Dis. Control Prev. <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/history/2014-2016-outbreak/cost-of-ebola.html#N2>
- Centers for Disease Control and Prevention (2018b) One Health Basics. In: Centers Dis. Control Prev. <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html>
- Centers for Disease Control and Prevention (2016) Virus Ecology. In: Centers Dis. Control Prev. <https://www.cdc.gov/vhf/rvf/resources/virus-ecology.html>

- Chan JFW, Lau SKP, To KKW, Cheng VCC, Woo PCY, Yue KY (2015) Middle East Respiratory syndrome coronavirus: Another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. *Clin Microbiol Rev* 28:465-522. doi: 10.1128/CMR.00102-14
- Chan JFW, To KKW, Tse H, Jin DY, Yuen KY (2013) Interspecies transmission and emergence of novel viruses: Lessons from bats and birds. *Trends Microbiol* 21:544-555. doi: 10.1016/j.tim.2013.05.005
- Chan KH, Peiris JSM, Lam SY, Poon LLM, Yuen KY, Seto WH (2011) The effects of temperature and relative humidity on the viability of the SARS coronavirus. *Adv Virol* 2011:734690. doi: 10.1155/2011/734690
- Cheever FS, Daniels JB, Pappenheimer AM, Bailey OT (1949) A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. *J Exp Med* 90:181-210. doi: 10.1084/jem.90.3.181
- Chen I-C, Hill JK, Ohlemuller R, Roy DB, Thomas CD (2011) Rapid range shifts of species associated with high levels of climate warming. *Science* 333:1024-1026. doi: 10.1126/science.1206432
- Chen L, Liu B, Yang J, Jin Q (2014) DBatVir: The database of bat-associated viruses. *Database* 2014:bau021. doi: 10.1093/database/bau021
- Choisy M, Rohani P (2006) Harvesting can increase severity of wildlife disease epidemics. *Proc R Soc B Biol Sci* 273:2025-2034. doi: 10.1098/rspb.2006.3554
- Christidis L, Goodman SM, Naughton K, Appleton B (2014) Insights into the evolution of a cryptic radiation of bats: Dispersal and ecological radiation of Malagasy *Miniopterus* (Chiroptera: Miniopteridae). *PLoS One* 9:e92440. doi: 10.1371/journal.pone.0092440
- Chua KB, Chua BH, Wang CW (2002) Anthropogenic deforestation, El Niño and the emergence of Nipah virus in Malaysia. *Malays J Pathol* 24:15-21.
- Chua KB, Goh KJ, Wong KT, Kamarulzaman A, Tan PSK, Ksiazek TG, Zaki SR, Paul G, Lam SK, Tan CT (1999) Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia. *Lancet* 354:1257-1259. doi: 10.1016/S0140-6736(99)04299-3
- Clay CA, Lehmer EM, Jeor SS, Dearing MD (2009) Testing mechanisms of the dilution effect: Deer mice encounter rates, Sin nombre virus prevalence and species diversity. *Ecohealth* 6:250-259. doi: 10.1007/s10393-009-0240-2
- Coleman CM, Frieman MB (2013) Emergence of the Middle East Respiratory Syndrome coronavirus. *PLoS Pathog* 9:e1003595. doi: 10.1371/journal.ppat.1003595
- Conenna I, Rocha R, Russo D, Cabeza M (2017) Insular bats and research effort: a review of global patterns and priorities. *Mamm Rev* 47:169-182. doi: 10.1111/mam.12090
- Cordonin C, Toty C, Mavingui P, Tortosa P (2018) Complete genome sequences of three *Leptospira mayottensis* strains from tenrecs that are endemic in the Malagasy region. *Microbiol Resour Announc* 7:e01188-18. doi: 10.1128/MRA.01188-18

- Corman VM, Baldwin HJ, Tateno AF, Zerbinati RM, Annan A, Owusu M, Nkrumah EE, Maganga GD, Oppong S, Adu-Sarkodie Y, Vallo P, da Silva Filho LVRF, Leroy EM, Thiel V, van der Hoek L, Poon LLM, Tschapka M, Drosten C, Drexler JF (2015) Evidence for an ancestral association of human coronavirus 229E with bats. *J Virol* 89:11858-11870. doi: 10.1128/jvi.01755-15
- Corman VM, Eckerle I, Memish ZA, Liljander AM, Dijkman R, Jonsdottir H, Ngeiywa KJZJ, Kamau E, Younan M, Al Masri M, Assiri A, Gluecks I, Musa BE, Meyer B, Müller MA, Hilali M, Bornstein S, Wernery U, Thiel V, Jores J, Drexler JF, Drosten C (2016) Link of a ubiquitous human coronavirus to dromedary camels. *Proc Natl Acad Sci* 113:9864-9869. doi: 10.1073/pnas.1604472113
- Cui J, Li F, Shi ZL (2019) Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 17:181-192. doi: 10.1038/s41579-018-0118-9
- Cunningham AA, Daszak P, Wood JLN (2017) One Health, emerging infectious diseases and wildlife: two decades of progress? *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 372:20160167. doi: 10.1098/rstb.2016.0167
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD (2000) Emerging infectious diseases of wildlife - threats to biodiversity and human health. *Science* 287:443-449. doi: 10.1126/science.287.5452.443
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD (2001) Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Trop* 78:103-116. doi: 10.1016/S0001-706X(00)00179-0
- Dawood FS, Iuliano AD, Reed C, Meltzer MI, Shay DK, Cheng P-Y, Bandaranayake D, Breiman RF, Brooks WA, Buchy P, Feikin DR, Fowler KB, Gordon A, Hien NT, Horby P, Huang QS, Katz MA, Krishnan A, Lal R, Montgomery JM, Mølbak K, Pebody R, Presanis AM, Razuri H, Steens A, Tinoco YO, Wallinga J, Yu H, Vong S, Bresee J, Widdowson M-A (2012) Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic Influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. *Lancet Infect Dis* 12:687-95. doi: 10.1016/S1473-3099(12)70121-4
- De Nys HM, Mbala Kingebeni P, Keita AK, Butel C, Thaurignac G, Villabona-Arenas CJ, Lemarcis T, Geraerts M, Vidal N, Esteban A, Bourgarel M, Roger F, Leendertz F, Diallo R, Ndimbo-Kumugo SP, Nsio-Mbeta J, Tagg N, Koivogui L, Toure A, Delaporte E, Ahuka-Mundeke S, Muyembe Tamfum JJ, Mpoudi-Ngole E, Ayouba A, Peeters M (2018) Survey of Ebola viruses in frugivorous and insectivorous bats in Guinea, Cameroon, and the Democratic Republic of the Congo, 2015–2017. *Emerg Infect Dis* 24:2228-2240. doi: 10.3201/eid2412.180740
- de Wit MJ (2003) Madagascar: Heads it's a continent, tails it's an island. *Annu Rev Earth Planet Sci* 31:213-248. doi: 10.1146/annurev.earth.31.100901.141337
- Dietrich M, Gomard Y, Lagadec E, Ramasindrazana B, Le Minter G, Guernier V, Benlali A, Rocamora G, Markotter W, Goodman SM, Dellagi K, Tortosa P (2018) Biogeography of *Leptospira* in wild animal communities inhabiting the insular ecosystem of the western

- Indian Ocean islands and neighboring Africa. *Emerg Microbes Infect* 7:57. doi: 10.1038/s41426-018-0059-4
- Dietrich M, Wilkinson DA, Benlali A, Lagadec E, Ramasindrazana B, Dellagi K, Tortosa P (2015) *Leptospira* and paramyxovirus infection dynamics in a bat maternity enlightens pathogen maintenance in wildlife. *Environ Microbiol* 17:4280-4289. doi: 10.1111/1462-2920.12766
- Dimitrov DS, Wang L (2007) *In utero* transmission of Nipah virus: Role played by pregnancy and vertical transmission in henipavirus epidemiology. *J Infect Dis* 196:807-809. doi: 10.1086/520822
- Do Amaral RB, Lourenço EC, Famadas KM, Garcia AB, Machado RZ, André MR (2018) Molecular detection of *Bartonella* spp. and *Rickettsia* spp. in bat ectoparasites in Brazil. *PLoS One* 13:e0198629. doi: 10.1371/journal.pone.0198629
- Dobson AP (2005) What links infectious bats to emerging diseases? *Science* 310:628-629. doi: 10.1126/science.1120872
- Dodd DW, Gagnon KT, Corey DR (2013) Digital quantitation of potential therapeutic target RNAs. *Nucleic Acid Ther* 23:188-194. doi: 10.1089/nat.2013.0427
- Donaldson EF, Haskew AN, Gates JE, Huynh J, Moore CJ, Frieman MB (2010) Metagenomic analysis of the viromes of three North American bat species: Viral diversity among different bat species that share a common habitat. *J Virol* 84:13004-13018. doi: 10.1128/JVI.01255-10
- Donnelly CA, Woodroffe R, Cox DR, Bourne J, Gettinby G, Le Fevre AM, McInerney JP, Morrison WI (2003) Impact of localized badger culling on tuberculosis incidence in British cattle. *Nature* 426:834-837. doi: 10.1038/nature02192
- Doyle LP, Hutchings LM (1946) A transmissible gastroenteritis in pigs. *J Am Vet Med Assoc* 108:257-9.
- Drexler JF, Corman VM, Drosten C (2014) Ecology, evolution and classification of bat coronaviruses in the aftermath of SARS. *Antiviral Res* 101:45-56. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.10.013
- Drexler JF, Corman VM, Wegner T, Tateno AF, Zerbinati RM, Gloza-Rausch F, Seebens A, Müller MA, Drosten C (2011) Amplification of emerging viruses in a bat colony. *Emerg Infect Dis* 17:449-456. doi: 10.3201/eid1703.100526
- Eckerle LD, Becker MM, Halpin RA, Li K, Venter E, Lu X, Scherbakova S, Graham RL, Baric RS, Stockwell TB, Spiro DJ, Denison MR (2010) Infidelity of SARS-CoV *nsp14*-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *PLoS Pathog* 6:e1000896. doi: 10.1371/journal.ppat.1000896
- Eckerle LD, Lu X, Sperry SM, Choi L, Denison MR (2007) High fidelity of murine hepatitis virus replication is decreased in *nsp14* exonuclease mutants. *J Virol* 81:12135-44. doi: 10.1128/JVI.01296-07

- Ecohealth Alliance (2015) Emerging Infectious Diseases Repository. <https://eidr.ecohealthalliance.org/events>
- Ecohealth Alliance (2019) PREDICT. In: Ecohealth Alliance. <https://www.ecohealthalliance.org/program/predict>
- El-Duah P, Meyer B, Sylverken A, Owusu M, Gottula LT, Yeboah R, Lamptey J, Frimpong YO, Burimuah V, Folitse R, Agbenyega O, Oppong S, Adu-Sarkodie Y, Drosten C (2019a) Development of a whole-virus ELISA for serological evaluation of domestic livestock as possible hosts of human coronavirus NL63. *Viruses* 11:v11010043. doi: 10.3390/v11010043
- El-Duah P, Sylverken A, Owusu M, Yeboah R, Lamptey J, Frimpong YO, Burimuah V, Antwi C, Folitse R, Agbenyega O, Oppong S, Adu-Sarkodie Y, El-Duah P, Sylverken A, Owusu M, Yeboah R, Lamptey J, Frimpong YO, Burimuah V, Antwi C, Folitse R, Agbenyega O, Oppong S, Adu-Sarkodie Y (2019b) Potential intermediate hosts for coronavirus transmission: No evidence of clade 2C coronaviruses in domestic livestock from Ghana. *Trop Med Infect Dis* 4:34. doi: 10.3390/tropicalmed4010034
- Engering A, Hogerwerf L, Slingenbergh J (2013) Pathogen-host-environment interplay and disease emergence. *Emerg. Microbes Infect.* 2:e5. doi: 10.1038/emi.2013.5
- Epstein JH, Baker ML, Zambrana-Torrel C, Middleton D, Barr JA, DuBovi E, Boyd V, Pope B, Todd S, Crameri G, Walsh A, Pelican K, Fielder MD, Davies AJ, Wang LF, Daszak P (2013) Duration of maternal antibodies against Canine distemper virus and Hendra virus in pteropid bats. *PLoS One* 8:e67584. doi: 10.1371/journal.pone.0067584
- Fabijan J, Caraguel C, Jelocnik M, Polkinghorne A, Boardman WSJ, Nishimoto E, Johnsson G, Molsher R, Woolford L, Timms P, Simmons G, Hemmatzadeh F, Trott DJ, Speight N (2019) *Chlamydia pecorum* prevalence in South Australian koala (*Phascolarctos cinereus*) populations: Identification and modelling of a population free from infection. *Sci Rep* 9:6261. doi: 10.1038/s41598-019-42702-z
- Fehr AR, Perlman S (2015) Coronaviruses: An overview of their replication and pathogenesis. In: Maier HJ, Bickerton E, Britton P (éd) *Coronaviruses: Methods and protocols*, Methods in. Humana Press, New York, p 1-23.
- Florens FBV (2016) Mauritius culls threatened fruit bats. *Nature* 530:33. doi: 10.1038/530033a
- Fogarty R, Halpin K, Hyatt AD, Daszak P, Mungall BA (2008) Henipavirus susceptibility to environmental variables. *Virus Res* 132:140-144. doi: 10.1016/j.virusres.2007.11.010
- Foley NM, Hughes GM, Huang Z, Clarke M, Jebb D, Whelan C V, Petit EJ, Touzalin F, Farcy O, Jones G, Ransome RD, Kacprzyk J, O'Connell MJ, Kerth G, Rebelo H, Rodrigues L, Puechmaille SJ, Teeling EC (2018) Growing old, yet staying young: The role of telomeres in bats' exceptional longevity. *Sci Adv* 4:eaao0926. doi: 10.1126/sciadv.aao0926
- Forni D, Cagliani R, Clerici M, Sironi M (2017) Molecular evolution of human coronavirus genomes. *Trends Microbiol.* 25:35-48. doi: 10.1016/j.tim.2016.09.001
- Fu X, Fang B, Liu Y, Cai M, Jun J, Ma J, Bu D, Wang L, Zhou P, Wang H, Zhang G (2018) Newly emerged porcine enteric alphacoronavirus in southern China: Identification, origin

- and evolutionary history analysis. *Infect Genet Evol* 62:179-187. doi: 10.1016/j.meegid.2018.04.031
- Gago S, Elena SF, Flores R, Rafael Sanjuán (2009) Extremely high mutation rate of a hammerhead viroid. *Science* 323:1308. doi: 10.1126/science.1169202
- Gallagher T, Perlman S (2013) Broad reception for coronavirus. *Nature* 495:176-177. doi: 10.1038/495176a
- Garchitorena A, Sokolow SH, Roche B, Ngonghala CN, Jocque M, Lund A, Barry M, Mordecai EA, Daily GC, Jones JH, Andrews JR, Bendavid E, Luby SP, Labeaud AD, Seetah K, Guégan JF, Bonds MH, De Leo GA (2017) Disease ecology, health and the environment: A framework to account for ecological and socio-economic drivers in the control of neglected tropical diseases. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 372:20160128. doi: 10.1098/rstb.2016.0128
- GBD 2015 Healthcare Access and Quality Collaborators (2017) Healthcare Access and Quality Index based on mortality from causes amenable to personal health care in 195 countries and territories, 1990–2015: a novel analysis from the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 390:231-266. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30818-8
- Ge X, Li Y, Yang X, Zhang H, Zhou P, Zhang Y, Shi Z (2012) Metagenomic analysis of viruses from bat fecal samples reveals many novel viruses in insectivorous bats in China. *J Virol* 86:4620-4630. doi: 10.1128/jvi.06671-11
- Geldenhuys M, Mortlock M, Weyer J, Bezuidt O, Seamark ECJ, Kearney T, Gleasner C, Erkkila TH, Cui H, Markotter W (2018) A metagenomic viral discovery approach identifies potential zoonotic and novel mammalian viruses in *Neoromicia* bats within South Africa. *PLoS One* 13:e0194527. doi: 10.1371/journal.pone.0194527
- George DB, Webb CT, Farnsworth ML, O’Shea TJ, Bowen RA, Smith DL, Stanley TR, Ellison LE, Rupprecht CE (2011) Host and viral ecology determine bat rabies seasonality and maintenance. *Proc Natl Acad Sci* 108:10208-10213. doi: 10.1073/PNAS.1010875108
- Global Forum for Health Research (2002) The 10/90 Report on Health Research 2001-2002. Geneva, World Heal Organ
- Gloza-Rausch F, Anne Ipsen, Seebens A, Göttsche M, Panning M, Drexler JF, Petersen N, Annan A, Grywna K, Müller M, Pfefferle S, Drosten C (2008) Detection and prevalence patterns of group I coronaviruses in bats, northern Germany. *Emerg Infect Dis* 14:626-631.
- Gomard Y, Dietrich M, Wieseke N, Ramasindrazana B, Lagadec E, Goodman SM, Dellagi K, Tortosa P (2016) Malagasy bats shelter a considerable genetic diversity of pathogenic *Leptospira* suggesting notable host-specificity patterns. *FEMS Microbiol Ecol* 92:fiw037. doi: 10.1093/femsec/fiw037
- Goodman SM (2011) Les chauves-souris de Madagascar. Antananarivo, Madagascar.

- Goodman SM, Chan LM, Nowak MD, Yoder AD (2010a) Phylogeny and biogeography of western Indian Ocean *Rousettus* (Chiroptera: Pteropodidae). *J Mammal* 91:593-606. doi: 10.1644/09-mamm-a-283.1
- Goodman SM, Rakotondramanana CF, Ramasindrazana B, Kearney T, Monadjem A, Schoeman MC, Taylor PJ, Naughton K, Appleton B (2015) An integrative approach to characterize Malagasy bats of the subfamily Vespertilioninae Gray, 1821, with the description of a new species of *Hypsugo*. *Zool J Linn Soc* 173:988-1018. doi: 10.1111/zoj.12223
- Goodman SM, Weyeneth N, Ibrahim Y, Saïd I, Ruedi M (2010b) A review of the bat fauna of the Comoro archipelago. *Acta Chiropterologica* 12:117-141. doi: 10.3161/150811010x504635
- Gorbalenya AE, Enjuanes L, Ziebuhr J, Snijder EJ (2006) Nidovirales: Evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res* 117:17-37. doi: 10.1016/j.virusres.2006.01.017
- Greer A, Ng V, Fisman D (2008) Climate change and infectious diseases in North America: the road ahead. *Can Med Assoc J* 178:715-722. doi: 10.1503/cmaj.081325
- Guan Y, Zheng BJ, He YQ, Liu XL, Zhuang ZX, Cheung CL, Luo SW, Li PH, Zhang LJ, Guan YJ, Butt KM, K. L. Wong, Chan KW, Lim W, Shortridge KF, Yuen KY, Peiris JSM, Poon LLM (2003) Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in Southern China. *Science* 302:276-278. doi: 10.1126/science.1087139
- Guernier V, Hochberg ME, Guégan JF (2004) Ecology drives the worldwide distribution of human diseases. *PLoS Biol* 2:740-746. doi: 10.1371/journal.pbio.0020141
- Guo W-P, Lin X-D, Wang W, Tian J-H, Cong M-L, Zhang H-L, Wang M-R, Zhou R-H, Wang J-B, Li M-H, Xu J, Holmes EC, Zhang Y-Z (2013) Phylogeny and origins of hantaviruses harbored by bats, insectivores, and rodents. *PLoS Pathog* 9:e1003159. doi: 10.1371/journal.ppat.1003159
- Hafner MS, Nadler SA (1990) Cospeciation in host-parasite assemblages: Comparative analysis of rates of evolution and timing of cospeciation events. *Syst Zool* 39:192-204. doi: 10.2307/2992181
- Hales S, de Wet N, Maindonald J, Woodward A (2002) Potential effect of population and climate changes on global distribution of dengue fever: An empirical model. *Lancet* 360:830-834.
- Hammond JOS, Kendall J-M, Collier JS, Rumpker G (2013) The extent of continental crust beneath the Seychelles. *Earth Planet Sci Lett* 381:166-176. doi: 10.1016/J.EPSL.2013.08.023
- Hamre D, Procknow JJ (1966) A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc Soc Exp Biol Med* 121:190-193. doi: 10.3181/00379727-121-30734
- Han BA, Kramer AM, Drake JM (2016) Global patterns of zoonotic disease in mammals. *Trends Parasitol.* 32:565-577. doi: 10.1016/j.pt.2016.04.007

- Han H-J, Wen H-L, Zhou C-M, Chen F-F, Luo L-M, Liu J-W, Yu X-J (2015) Bats as reservoirs of severe emerging infectious diseases. *Virus Res* 205:1-6. doi: 10.1016/j.virusres.2015.05.006
- Harriman V (2003) *Myotis grisescens* (gray myotis). In: Anim. Divers. Web. https://animaldiversity.org/accounts/Myotis_grisescens/
- Hart BL (2011) Behavioural defences in animals against pathogens and parasites: Parallels with the pillars of medicine in humans. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 366:3406-3417. doi: 10.1098/rstb.2011.0092
- Hayman DTS (2015) Biannual birth pulses allow filoviruses to persist in bat populations. *Proc R Soc B Biol Sci* 282:20142591. doi: 10.1098/rspb.2014.2591
- Hayman DTS, Bowen RA, Cryan PM, McCracken GF, O'Shea TJ, Peel AJ, Gilbert A, Webb CT, Wood JLN (2013) Ecology of zoonotic infectious diseases in bats: Current knowledge and future directions. *Zoonoses Public Health* 60:2-21. doi: 10.1111/zph.12000
- Hayman DTS, Luis AD, Restif O, Baker KS, Fooks AR, Leach C, Horton DL, Suu-Ire R, Cunningham AA, Wood JLN, Webb CT (2018) Maternal antibody and the maintenance of a lyssavirus in populations of seasonally breeding African bats. *PLoS One* 13:e0198563. doi: 10.1371/journal.pone.0198563
- Hayman DTS, Yu M, Cramer G, Wang L-F, Suu-Ire R, Wood JLN, Cunningham AA (2012) Ebola virus antibodies in fruit bats, Ghana, West Africa. *Emerging Infect Dis* 18:1207-1209. doi: 10.3201/eid1807.111654
- He B, Zhang Y, Xu L, Yang W, Yang F, Feng Y, Xia L, Zhou J, Zhen W, Feng Y, Guo H, Zhang H, Tu C (2014) Identification of diverse alphacoronaviruses and genomic characterization of a novel severe acute respiratory syndrome-like coronavirus from bats in China. *J Virol* 88:7070-82. doi: 10.1128/JVI.00631-14
- Headrick DR (2014) Sleeping sickness epidemics and colonial responses in East and Central Africa, 1900-1940. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e2772. doi: 10.1371/journal.pntd.0002772
- Healy K, Guillerme T, Finlay S, Kane A, Kelly SBA, McClean D, Kelly DJ, Donohue I, Jackson AL, Cooper N (2014) Ecology and mode-of-life explain lifespan variation in birds and mammals. *Proc R Soc B Biol Sci* 281:20140298. doi: 10.1098/rspb.2014.0298
- Hoarau F, Le Minter G, Joffrin L, Schoeman MC, Lagadec E, Ramasindrazana B, Dos Santos A, Goodman SM, Gudo ES, Mavingui P, Lebarbenchon C (2018) Bat astrovirus in Mozambique. *Virology* 15:104. doi: 10.1186/s12985-018-1011-x
- Holmes EC (2010) The comparative genomics of viral emergence. *Proc Natl Acad Sci* 107:1742-1746. doi: 10.1073/pnas.0906193106
- Hoshino T, Inagaki F (2012) Molecular quantification of environmental DNA using microfluidics and digital PCR. *Syst Appl Microbiol* 35:390-395. doi: 10.1016/j.syapm.2012.06.006

- Hosseini PR, Dhondt AA, Dobson A (2004) Seasonality and wildlife disease: How seasonal birth, aggregation and variation in immunity affect the dynamics of *Mycoplasma gallisepticum* in house finches. *Proc R Soc B Biol Sci* 271:2569-2577. doi: 10.1098/rspb.2004.2938
- Howard CR, Fletcher NF (2012) Emerging virus diseases: Can we ever expect the unexpected? *Emerg Microbes Infect* 1:e46. doi: 10.1038/emi.2012.47
- Hristov NI, Betke M, Theriault DEH, Bagchi A, Kunz TH (2010) Seasonal variation in colony size of Brazilian free-tailed bats at Carlsbad Cavern based on thermal imaging. *J Mammal* 91:183-192. doi: 10.1644/08-mamm-a-391r.1
- Huang ZYX, de Boer WF, van Langevelde F, Xu C, Ben Jebara K, Berlingieri F, Prins HHT (2013) Dilution effect in bovine tuberculosis: Risk factors for regional disease occurrence in Africa. *Proc R Soc B Biol Sci* 280:20130624. doi: 10.1098/rspb.2013.0624
- Hughes L (2000) Biological consequences of global warming: is the signal already apparent? *Trends Ecol Evol* 15:56-61. doi: 10.1016/S0169-5347(99)01764-4
- Huynh J, Li S, Yount B, Smith A, Sturges L, Olsen JC, Nagel J, Johnson JB, Agnihothram S, Gates JE, Frieman MB, Baric RS, Donaldson EF (2012) Evidence supporting a zoonotic origin of human coronavirus strain NL63. *J Virol* 86:12816-25. doi: 10.1128/JVI.00906-12
- Iehlé C, Razafitrimo G, Razainirina J, Andriaholinirina N, Goodman SM, Faure C, Georges-Courbot MC, Rousset D, Reynes JM (2007) Henipavirus and Tioman virus antibodies in pteropodid bats, Madagascar. *Emerg Infect Dis* 13:159-161. doi: 10.3201/eid1301.060791
- IUCN (2019) IUCN Red list. <https://www.iucnredlist.org/>
- Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH, Muscatello DJ, Palekar R, Tempia S, Cohen C, Gran JM, Schanzer D, Cowling BJ, Wu P, Kyncl J, Ang LW, Park M, Redlberger-Fritz M, Yu H, Espenhain L, Krishnan A, Emukule G, van Asten L, Pereira da Silva S, Aungkulanon S, Buchholz U, Widdowson M-A, Bresee JS (2018) Estimates of global seasonal Influenza-associated respiratory mortality: A modelling study. *Lancet* 391:1285-1300. doi: 10.1016/S0140-6736(17)33293-2
- Jackson AP, Charleston MA (2003) A cophylogenetic perspective of RNA-virus evolution. *Mol Biol Evol* 21:45-57. doi: 10.1093/molbev/msg232
- Jaenson TG, Jaenson DGE, Eisen L, Petersson E, Lindgren E (2012) Changes in the geographical distribution and abundance of the tick *Ixodes ricinus* during the past 30 years in Sweden. *Parasit Vectors* 5:8. doi: 10.1186/1756-3305-5-8
- Jeong J, Peel AJ, Plowright RK, Restif O, McCallum H (2019) Relation of seasonal birth pulses and maternal immunity with viral invasion and persistence: A case study of Hendra virus infection in a population of black flying foxes (*Pteropus alecto*). *bioRxiv* 582726. doi: 10.1101/582726

- Joffrin L, Dietrich M, Mavingui P, Lebarbenchon C (2018) Bat pathogens hit the road: But which one? PLOS Pathog 14:e1007134. doi: 10.1371/journal.ppat.1007134
- Joffrin L, Goodman SM, Wilkinson DA, Ramasindrazana B, Lagadec E, Gomard Y, Minter G Le, Santos A Dos, Schoeman MC, Sookhareea R, Tortosa P, Julienne S, Gudo ES, Mavingui P, Lebarbenchon C (2019a) Bat coronavirus phylogeography in the western Indian Ocean. bioRxiv 742866. doi: 10.1101/742866
- Joffrin L, Hoarau AOG, Lagadec E, Mavingui P, Lebarbenchon C (2019b) Astrovirus in Reunion Free-tailed Bat (*Mormopterus francoismoutoui*). bioRxiv 774224. doi: <https://doi.org/10.1101/774224>
- Johnson NPAS, Mueller J (2002) Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 « Spanish » Influenza pandemic. Bull Hist Med 76:105-15. doi: 10.1353/bhm.2002.0022
- Johnson PTJ, Thieltges DW (2010) Diversity, decoys and the dilution effect: How ecological communities affect disease risk. J Exp Biol 213:961-970. doi: 10.1242/jeb.037721
- Jones G, Jacobs DS, Kunz TH, Wilig MR, Racey PA (2009) Carpe noctem: The importance of bats as bioindicators. Endanger. Species Res. 8:93-115. doi: 10.3354/esr00182
- Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P (2008) Global trends in emerging infectious diseases. Nat Lett 451:990-994. doi: 10.1038/nature06536
- Kan B, Wang M, Jing H, Xu H, Jiang X, Yan M, Liang W, Zheng H, Wan K, Liu Q, Cui B, Xu Y, Zhang E, Wang H, Ye J, Li G, Li M, Cui Z, Qi X, Chen K, Du L, Gao K, Zhao Y-T, Zou X-Z, Feng Y-J, Gao Y-F, Hai R, Yu D, Guan Y, Xu J (2005) Molecular evolution analysis and geographic investigation of Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus-like virus in palm civets at an animal market and on farms. J Virol 79:11892-11900. doi: 10.1128/jvi.79.18.11892-11900.2005
- Karesh WB, Dobson A, Lloyd-Smith JO, Lubroth J, Dixon MA, Bennett M, Aldrich S, Harrington T, Formenty P, Loh EH, MacHalaba CC, Thomas MJ, Heymann DL (2012) Ecology of zoonoses: Natural and unnatural histories. Lancet 380:1936-1945. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61678-X
- Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, Santiago ML, Bibollet-Ruche F, Chen Y, Wain L V, Liegeois F, Loul S, Ngole EM, Bienvenue Y, Delaporte E, Brookfield JFY, Sharp PM, Shaw GM, Peeters M, Hahn BH (2006) Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. Science 313:523-6. doi: 10.1126/science.1126531
- Keesing F, Belden LK, Daszak P, Dobson A, Harvell CD, Holt RD, Hudson P, Jolles A, Jones KE, Mitchell CE, Myers SS, Bogich T, Ostfeld RS (2010) Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. Nature 468:647-652. doi: 10.1038/nature09575
- Kilama WL (2009) The 10/90 gap in sub-Saharan Africa: Resolving inequities in health research. Acta Trop 112:S8-S15. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.08.015
- Kilbourne ED (2006) Influenza pandemics of the 20th century. Emerg Infect Dis 12:9-14. doi: 10.3201/eid1201.051254

- Kingston T, Florens V, Oleksy R, Ruhomaun K, Tatayah V (2018) *Pteropus niger*. The IUCN Red List of Threatened Species 2018. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-1.RLTS.T18743A86475525.en>.
- Ko AI, Goarant C, Picardeau M (2009) *Leptospira*: The dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol* 7:nrmicro2208. doi: 10.1038/nrmicro2208
- Krebs JR, Anderson R, Clutton-Brock T, Morisson I, Young F, Donnelly C, Frost S, Woodroffe R (1997) Bovine tuberculosis in cattle and badgers: report to the Rt Hon Dr Jack Cunningham MP. London.
- Kreuder Johnson C, Hitchens PL, Smiley Evans T, Goldstein T, Thomas K, Clements A, Joly DO, Wolfe ND, Daszak P, Karesh WB, Mazet JK (2015) Spillover and pandemic properties of zoonotic viruses with high host plasticity. *Sci Rep* 5:14830. doi: 10.1038/srep14830
- Kruse H, Kirkemo AM, Handeland K (2004) Wildlife as source of zoonotic infections. *Emerg. Infect. Dis.* 10:2067-2072.
- Kuhn JH, Li W, Choe H, Farzan M (2004) Angiotensin-converting enzyme 2: A functional receptor for SARS coronavirus. *Cell. Mol. Life Sci.* 61:2738-2743. doi: 10.1038/nature02145
- Kunz TH (1982) *Ecology of Bats*. Plenum Press, New York.
- Kunz TH, Lumsden LF (2006) Ecology of cavity and foliage roosting bats. In: Kunz TH, Fenton M (éd) *Bat Ecology*. University of Chicago Press, 2005, Chicago, USA, p 24.
- Kurz SG, Furin JJ, Bark CM (2016) Drug-resistant tuberculosis: Challenges and progress. *Infect Dis Clin North Am* 30:509-522. doi: 10.1016/j.idc.2016.02.010
- Kuzmin I V, Ilinykh PA, Ksiazek TG, Bukreyev A, Schwarz TM, Basler CF, Jordan I, Sachidanandam R (2017) Innate immune responses of bat and human cells to filoviruses: Commonalities and distinctions. *J Virol* 91:2471-2487. doi: 10.1128/JVI.02471-16
- Lagadec E, Gomard Y, Le Minter G, Cordonin C, Cardinale E, Ramasindrazana B, Dietrich M, Goodman SM, Tortosa P, Dellagi K (2016) Identification of *Tenrec ecaudatus*, a wild mammal introduced to Mayotte Island, as a reservoir of the newly identified human pathogenic *Leptospira mayottensis*. *PLoS Negl Trop Dis* 10:e0004933. doi: 10.1371/journal.pntd.0004933
- Lahm SA, Kombila M, Swanepoel R, Barnes RFW (2007) Morbidity and mortality of wild animals in relation to outbreaks of Ebola haemorrhagic fever in Gabon, 1994-2003. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101:64-78. doi: 10.1016/j.trstmh.2006.07.002
- Lai MMC, Cavanagh D (1997) The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 48:1-100. doi: 10.1016/S0065-3527(08)60286-9
- Lamb JM, Ralph TMC, Naidoo T, Taylor PJ, Ratrimomanarivo F, Stanley WT, Goodman SM (2011) Toward a molecular phylogeny for the Molossidae (Chiroptera) of the Afro-Malagasy region. *Acta Chiropterologica* 13:1-16. doi: 10.3161/150811011x578589

- Lau SKP, Lee P, Tsang AKL, Yip CCY, Tse H, Lee RA, So L-Y, Lau Y-L, Chan K-H, Woo PCY, Yuen K-Y (2011) Molecular epidemiology of human coronavirus OC43 reveals evolution of different genotypes over time and recent emergence of a novel genotype due to natural recombination. *J Virol* 85:11325-37. doi: 10.1128/JVI.05512-11
- Lau SKP, Woo PCY, Li KSM, Tsang AKL, Fan RYY, Luk HKH, Cai J-P, Chan K-H, Zheng B-J, Wang M, Yuen K-Y (2015) Discovery of a novel coronavirus, China *Rattus* coronavirus HKU24, from Norway rats supports the murine origin of betacoronavirus 1 and has implications for the ancestor of betacoronavirus lineage A. *J Virol* 89:3076-3092. doi: 10.1128/jvi.02420-14
- Lebarbenchon C, Brown SP, Poulin R, Gauthier-Clerc M, Thomas F (2008) Evolution of pathogens in a man-made world. *Mol Ecol* 17:475-484. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03375.x
- Lebarbenchon C, Ramasindrazana B, Joffrin L, Bos S, Lagadec E, Le Minter G, Gomard Y, Tortosa P, Wilkinson DA, Goodman SM, Mavingui P (2017) Astroviruses in bats, Madagascar. *Emerg. Microbes Infect.* 6:e58. doi: 10.1038/emi.2017.47
- Lee C (2015) Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virol. J.* 12:193. doi: 10.1186/s12985-015-0421-2
- Leopardi S, Holmes EC, Gastaldelli M, Tassoni L, Priori P, Scaravelli D, Zamperin G, De Benedictis P (2018) Interplay between co-divergence and cross-species transmission in the evolutionary history of bat coronaviruses. *Infect Genet Evol* 58:279-289. doi: 10.1016/j.meegid.2018.01.012
- Leroy EM, Epelboin A, Mondonge V, Pourrut X, Gonzalez JP, Muyembe-Tamfum JJ, Formenty P (2009) Human Ebola outbreak resulting from direct exposure to fruit bats in Luebo, Democratic Republic of Congo, 2007. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 9:723-728. doi: 10.1089/vbz.2008.0167
- Leroy EM, Kumulungui B, Pourrut X, Rouquet P, Hassanin A, Yaba P, Délicat A, Paweska JT, Gonzalez J-P, Swanepoel R (2005) Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* 438:575-576. doi: 10.1038/438575a
- Leroy EM, Rouquet P, Formenty P, Souquière S, Kilbourne A, Froment J-M, Bermejo M, Smit S, Karesh W, Swanepoel R, Zaki SR, Rollin PE (2004) Multiple Ebola virus transmission events and rapid decline of central African wildlife. *Science* 303:389-390. doi: 10.1126/science.1088679
- Levett PN (2001) Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14:296-326. doi: 10.1128/CMR.14.2.296-326.2001
- Li F (2013) Receptor recognition and cross-species infections of SARS coronavirus. *Antiviral Res* 100:246-254. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.08.014
- Li F (2015) Receptor recognition mechanisms of coronaviruses: A Decade of structural studies. *J Virol* 89:1954-1964. doi: 10.1128/jvi.02615-14

- Li H, Bai R, Zhao Z, Tao L, Ma M, Ji Z, Jian M, Ding Z, Dai X, Bao F, Liu A (2018) Application of droplet digital PCR to detect the pathogens of infectious diseases. *Biosci Rep* 38:BSR20181170. doi: 10.1042/BSR20181170
- Li L, Victoria JG, Wang C, Jones M, Fellers GM, Kunz TH, Delwart E (2010) Bat guano virome: Predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses. *J Virol* 84:6955-65. doi: 10.1128/JVI.00501-10
- Li W, S-K W, F L, JH K, I-C H, H C, M F (2005) Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* 310:676-679. doi: 10.1126/science.1118391
- Li W, Wong S-K, Li F, Kuhn JH, Huang I-C, Choe H, Farzan M (2006) Animal origins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus: Insight from ACE2-S-protein interactions. *J Virol* 80:4211-9. doi: 10.1128/JVI.80.9.4211-4219.2006
- Lindgren E, Tälleklint L, Polfeldt T (2000) Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. *Environ Health Perspect* 108:119-123. doi: 10.1289/ehp.00108119
- Loh EH, Zambrana-Torrel C, Olival KJ, Bogich TL, Johnson CK, Mazet JAK, Karesh W, Daszak P (2015) Targeting transmission pathways for emerging zoonotic disease surveillance and control. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 15:432-437. doi: 10.1089/vbz.2013.1563
- Longdon B, Brockhurst MA, Russell CA, Welch JJ, Jiggins FM (2014) The evolution and genetics of virus host shifts. *PLoS Pathog* 10:e1004395. doi: 10.1371/journal.ppat.1004395
- Looi L-M, Chua K-B (2007) Lessons from the Nipah virus outbreak in Malaysia. *Malays J Pathol* 29:63-7.
- Luby S, Rahman M, Hossain M, Blum L, Husain M, Gurley E, Khan R, Ahmed B-N, Rahman S, Nahar N, Kenah E, Comer J, Ksiazek T (2006) Foodborne transmission of Nipah virus, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 12:1888-1894. doi: 10.3201/eid1212.060732
- Luis AD, Hayman DTS, O'Shea TJ, Cryan PM, Gilbert AT, Pulliam JRC, Mills JN, Timonin ME, Willis CKR, Cunningham AA, Fooks AR, Rupprecht CE, Wood JLN, Webb CT (2013) A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: Are bats special? *Proc R Soc B Biol Sci* 280:20122753. doi: 10.1098/rspb.2012.2753
- Luis AD, O'Shea TJ, Hayman DTS, Wood JLN, Cunningham AA, Gilbert AT, Mills JN, Webb CT (2015) Network analysis of host-virus communities in bats and rodents reveals determinants of cross-species transmission. *Ecol Lett* 18:1153-1162. doi: 10.1111/ele.12491
- Martin V, Chevalier V, Ceccato P, Anyamba A, De Simone L, Lubroth J, de La Rocque S, Domenech J (2008) The impact of climate change on the epidemiology and control of Rift Valley fever. *Rev Sci Tech* 27:413-26.
- Masters PS (2006) The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* 65:193-292. doi: 10.1016/S0065-3527(06)66005-3

- McCallum H, Dobson A (2002) Disease, habitat fragmentation and conservation. *Proc R Soc London Ser B Biol Sci* 269:2041-2049. doi: 10.1098/rspb.2002.2079
- McCormick JB, Bauer SP, Elliott LH, Webb PA, Johnson KM (1983) Biologic differences between strains of Ebola virus from Zaire and Sudan. *J Infect Dis* 147:264-267. doi: 10.1093/infdis/147.2.264
- Mebus CA, Stair EL, Rhodes MB, Twiehaus MJ (1973) Pathology of neonatal calf diarrhea induced by a coronavirus-like agent. *Vet Pathol* 10:45-64. doi: 10.1177/030098587301000105
- Medlock JM, Hansford KM, Bormane A, Derdakova M, Estrada-Peña A, George J-C, Golovljova I, Jaenson TG, Jensen J-K, Jensen PM, Kazimirova M, Oteo JA, Papa A, Pfister K, Plantard O, Randolph SE, Rizzoli A, Santos-Silva MM, Sprong H, Vial L, Hendrickx G, Zeller H, Van Bortel W (2013) Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasit Vectors* 6:1. doi: 10.1186/1756-3305-6-1
- Mélade J, McCulloch S, Ramasindrazana B, Lagadec E, Turpin M, Pascalis H, Goodman SM, Markotter W, Dellagi K (2016a) Serological evidence of lyssaviruses among bats on Southwestern Indian Ocean islands. *PLoS One* 11:e0160553. doi: 10.1371/journal.pone.0160553
- Mélade J, Wieseke N, Ramasindrazana B, Flores O, Lagadec E, Gomard Y, Goodman SM, Dellagi K, Pascalis H (2016b) An eco-epidemiological study of Morbilli-related paramyxovirus infection in Madagascar bats reveals host-switching as the dominant macro-evolutionary mechanism. *Sci Rep* 6:23752. doi: 10.1038/srep23752
- Menachery VD, Graham RL, Baric RS (2017) Jumping species—a mechanism for coronavirus persistence and survival. *Curr Opin Virol* 23:1-7. doi: 10.1016/j.coviro.2017.01.002
- Melson M, Guillemin J, Hugh-Jones M, Langmuir A, Popova I, Shelokov A, Yampolskaya O (1994) The Sverdlovsk anthrax outbreak of 1979. *Science* 266:1202-1208. doi: 10.1126/science.7973702
- Mihindukulasuriya KA, Wu G, St. Leger J, Nordhausen RW, Wang D (2008) Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray. *J Virol* 82:5084-5088. doi: 10.1128/JVI.02722-07
- Miller MR, McMinn RJ, Misra V, Schountz T, Müller MA, Kurth A, Munster VJ (2016) Broad and temperature independent replication potential of filoviruses on cells derived from Old and New World bat species. *J Infect Dis* 214:S297-S302. doi: 10.1093/infdis/jiw199
- Minskaia E, Hertzog T, Gorbalenya AE, Campanacci V, Cambillau C, Canard B, Ziebuhr J (2006) Discovery of an RNA virus 3'-5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci* 103:5108-5113. doi: 10.1073/pnas.0508200103
- Moon S, Bermudez J, 'T Hoen E (2012) Innovation and access to medicines for neglected populations: Could a treaty address a broken pharmaceutical R&D system? *PLoS Med* 9:e1001218. doi: 10.1371/journal.pmed.1001218

- Mora-Díaz JC, Piñeyro PE, Houston E, Zimmerman J, Giménez-Lirola LG (2019) Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus: A review. *Front Vet Sci* 6:53. doi: 10.3389/fvets.2019.00053
- Moratelli R, Calisher CH (2015) Bats and zoonotic viruses: Can we confidently link bats with emerging deadly viruses? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110:1-22. doi: 10.1590/0074-02760150048
- Morelli G, Song Y, Mazzoni CJ, Eppinger M, Roumagnac P, Wagner DM, Feldkamp M, Kusecek B, Vogler AJ, Li Y, Cui Y, Thomson NR, Jombart T, Leblois R, Lichtner P, Rahalison L, Petersen JM, Balloux F, Keim P, Wirth T, Ravel J, Yang R, Carniel E, Achtman M (2010) *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. *Nat Genet* 42:1140-1143. doi: 10.1038/ng.705
- Morens DM, Folkers GK, Fauci AS (2004) The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature* 430:242-9. doi: 10.1038/nature02759
- Morse SF, Olival KJ, Kosoy M, Billeter S, Patterson BD, Dick CW, Dittmar K (2012a) Global distribution and genetic diversity of *Bartonella* in bat flies (Hippoboscoidea, Streblidae, Nycteribiidae). doi: 10.1016/j.meegid.2012.06.009
- Morse SS (1995) Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 1:7-15. doi: 10.3201/eid0101.950102
- Morse SS, Mazet JAK, Woolhouse M, Parrish CR, Carroll D, Karesh WB, Zambrana-Torrel C, Lipkin WI, Daszak P (2012b) Prediction and prevention of the next pandemic zoonosis. *Lancet* 380:1956-1965. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61684-5
- Mühldorfer K (2013) Bats and Bacterial Pathogens: A Review. *Zoonoses Public Health* 60:93-103. doi: 10.1111/j.1863-2378.2012.01536.x
- Müller MA, Corman VM, Jores J, Meyer B, Younan M, Liljander A, Bosch B-J, Lattwein E, Hilali M, Musa BE, Bornstein S, Drosten C (2014) MERS coronavirus neutralizing antibodies in camels, Eastern Africa, 1983–1997. *Emerg Infect Dis* 20:2093-5. doi: 10.3201/eid2012.141026
- Mungall BA, Middleton D, Crameri G, Halpin K, Bingham J, Eaton BT, Broder CC (2007) vertical transmission and fetal replication of Nipah virus in an experimentally infected cat. *J Infect Dis* 196:812-816. doi: 10.1086/520818
- Muradrasoli S, Mohamed N, Hornyák Á, Fohlman J, Olsen B, Belák S, Blomberg J (2009) Broadly targeted multiprobe QPCR for detection of coronaviruses: coronavirus is common among mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *J Virol Methods* 159:277-287. doi: 10.1016/j.jviromet.2009.04.022
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853-858. doi: 10.1038/35002501
- Nahar N, Asaduzzaman M, Sultana R, Garcia F, Paul RC, Abedin J, Sazzad HMS, Rahman M, Gurley ES, Luby SP (2017) A large-scale behavior change intervention to prevent Nipah

- transmission in Bangladesh: components and costs. *BMC Res Notes* 10:225. doi: 10.1186/s13104-017-2549-1
- National Institute of Allergies and Infectious Diseases (2017) Global examples of emerging and re-emerging infectious diseases. In: *Natl. Inst. Heal.* <https://www.niaid.nih.gov/news-events/three-decades-responding-infectious-disease-outbreaks>
- Ngonghala CN, Pluciński MM, Murray MB, Farmer PE, Barrett CB, Keenan DC, Bonds MH (2014) Poverty, disease, and the ecology of complex systems. *PLoS Biol* 12:e1001827. doi: 10.1371/journal.pbio.1001827
- Niederwerder MC, Hesse RA (2018) Swine enteric coronavirus disease: A review of 4 years with porcine epidemic diarrhoea virus and porcine deltacoronavirus in the United States and Canada. *Transbound Emerg Dis* 65:660-675. doi: 10.1111/tbed.12823
- Nowak RM (1999) *Walker's Mammals of the World*, Vol. 2, 6th edition. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- O'Brien J (2011) Bats of the Western Indian Ocean islands. *Animals* 1:259-290. doi: 10.3390/ani1030259
- O'Brien J, Mariani C, Olson L, Russell AL, Say L, Yoder AD, Hayden TJ (2009) Multiple colonisations of the western Indian Ocean by *Pteropus* fruit bats (Megachiroptera: Pteropodidae): The furthest islands were colonised first. doi: 10.1016/j.ympcv.2009.02.010
- O'Shea TJ, Cryan PM, Cunningham AA, Fooks AR, Hayman DTS, Luis AD, Peel AJ, Plowright RK, Wood JLN (2014) Bat flight and zoonotic viruses. *Emerg Infect Dis* 20:741-745. doi: 10.3201/eid2005.130539
- Obame-Nkoghe J, Rahola N, Bourgarel M, Yangari P, Prugnonelle F, Maganga GD, Leroy E-M, Fontenille D, Ayala D, Paupy C (2016) Bat flies (Diptera: Nycteribiidae and Streblidae) infesting cave-dwelling bats in Gabon: Diversity, dynamics and potential role in *Polychromophilus melanipherus* transmission. *Parasit Vectors* 9:333. doi: 10.1186/s13071-016-1625-z
- Ogando NS, Ferron F, Decroly E, Canard B, Posthuma CC, Snijder EJ (2019) The curious case of the nidovirus exoribonuclease: Its role in RNA synthesis and replication fidelity. *Front Microbiol* 10:1813. doi: 10.3389/fmicb.2019.01813
- Ogawa H, Miyamoto H, Nakayama E, Yoshida R, Nakamura I, Sawa H, Ishii A, Thomas Y, Nakagawa E, Matsuno K, Kajihara M, Maruyama J, Nao N, Muramatsu M, Kuroda M, Simulundu E, Changula K, Hang'Ombe B, Namangala B, Nambota A, Katampi J, Igarashi M, Ito K, Feldmann H, Sugimoto C, Moonga L, Mweene A, Takada A (2015) Seroepidemiological prevalence of multiple species of filoviruses in fruit bats (*Eidolon helvum*) migrating in Africa. *J Infect Dis* 212:S101-S108. doi: 10.1093/infdis/jiv063
- Ogden NH, Bouchard C, Badcock J, Drebot MA, Elias SP, Hatchette TF, Koffi JK, Leighton PA, Lindsay LR, Lubelczyk CB, Peregrine AS, Smith RP, Webster D (2019) What is the real number of Lyme disease cases in Canada? *BMC Public Health* 19:849. doi: 10.1186/s12889-019-7219-x

- Oleksy RZ, Ayady CL, Tatayah V, Jones C, Froidevaux JSP, Racey PA, Jones G (2018) The impact of the endangered Mauritian flying fox *Pteropus niger* on commercial fruit farms and the efficacy of mitigation. *Oryx* 1-8. doi: 10.1017/S0030605318001138
- Olival KJ (2016) To cull, or not to cull, bat is the question. *Ecohealth* 13:6-8. doi: 10.1007/s10393-015-1075-7
- Olival KJ, Hosseini PR, Zambrana-Torrel C, Ross N, Bogich TL, Daszak P (2017) Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. *Nature* 546:646-650. doi: 10.1038/nature22975
- Olsen SJ, Chang H-L, Cheung TY-Y, Tang AF-Y, Fisk TL, Ooi SP-L, Kuo H-W, Jiang DD-S, Chen K-T, Lando J, Hsu K-H, Chen T-J, Dowell SF (2003) Transmission of the Severe Acute Respiratory Syndrome on Aircraft. *N Engl J Med* 349:2416-2422. doi: 10.1056/NEJMoa031349
- Organisation Mondiale de la Santé (2018a) World Health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Geneva, Switzerland
- Organisation Mondiale de la Santé (1972) WHO expert committee on smallpox eradication. Geneva, Switzerland
- Organisation Mondiale de la Santé (2017a) Global Health Observatory (GHO) data : HIV/AIDS. In: Organ. Mond. la Santé. <https://www.who.int/gho/hiv/en/>
- Organisation Mondiale de la Santé (2017b) Plague. In: Organ. Mond. la Santé. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/plague>
- Organisation Mondiale de la Santé (2017c) Plague - Madagascar. In: Organ. Mond. la Santé. <https://www.who.int/csr/don/27-november-2017-plague-madagascar/en/>
- Organisation Mondiale de la Santé (2018b) Global tuberculosis report 2018. Geneva, Switzerland
- Organisation Mondiale de la Santé (2010) What is the pandemic (H1N1) 2009 virus? In: Organ. Mond. la Santé. https://www.who.int/csr/disease/swineflu/frequently_asked_questions/about_disease/en/
- Organisation Mondiale de la Santé (2019a) WHO zoonoses definition. In: Organ. Mond. la Santé. <https://www.who.int/topics/zoonoses/en/>
- Organisation Mondiale de la Santé (2003) Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003 Based on data as of the 31 December 2003. In: Organ. Mond. la Santé. https://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/
- Organisation Mondiale de la Santé (2019b) MERS situation update, May 2019. In: Organ. Mond. la Santé. <http://www.emro.who.int/health-topics/mers-cov/mers-outbreaks.html>
- Organisation Mondiale de la Santé (2019c) Ebola outbreak 2014-2016. In: Organ. Mond. la Santé. <https://www.who.int/csr/disease/ebola/en/>
- Organization WH (2009) WHO Guide to identifying the economic consequences of disease and injury

- Osborne C, Cryan PM, O'Shea TJ, Oko LM, Ndaluka C, Calisher CH, Berglund AD, Klavetter ML, Bowen RA, Holmes K V, Dominguez SR (2011) Alphacoronaviruses in New World bats: Prevalence, persistence, phylogeny, and potential for interaction with humans. *PLoS One* 6:e19156. doi: 10.1371/journal.pone.0019156
- Ostfeld RS, Keesing F (2012) Effects of host diversity on infectious disease. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 43:157-182. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-102710-145022
- Pachka H, Annelise T, Alan K, Power T, Patrick K, Véronique C, Janusz P, Ferran J (2016) Rift Valley fever vector diversity and impact of meteorological and environmental factors on *Culex pipiens* dynamics in the Okavango Delta, Botswana. *Parasit Vectors* 9:434. doi: 10.1186/s13071-016-1712-1
- Page RDM (2003) Introduction. In: Page RDM (éd) *Tangled trees: Phylogeny, cospeciation, and coevolution*. University of Chicago Press, Chicago, USA, p 1-21
- Pakenham RHW (1984) *Mammals of Zanzibar and Pemba*. Harpenden: non publié
- Paksuz S (2017) Important caves in Turkish Thrace for bats: Dupnisa cave system and Koyunbaba cave. In: *Cave investigation*. p 92
- Papenfuss AT, Baker ML, Feng ZP, Tachedjian M, Crameri G, Cowled C, Ng J, Janardhana V, Field HE, Wang LF (2012) The immune gene repertoire of an important viral reservoir, the Australian black flying fox. *BMC Genomics* 13:261. doi: 10.1186/1471-2164-13-261
- Parmesan C, Yohe G (2003) A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature* 421:37-42. doi: 10.1038/nature01286
- Parpia AS, Ndeffo-Mbah ML, Wenzel NS, Galvani AP (2016) Effects of response to 2014–2015 Ebola outbreak on deaths from malaria, HIV/AIDS, and tuberculosis, West Africa. *Emerging Infect Dis* 22:433-441. doi: 10.3201/eid2203.150977
- Parrish CR, Holmes EC, Morens DM, Park E-C, Burke DS, Calisher CH, Laughlin CA, Saif LJ, Daszak P (2008) Cross-species virus transmission and the emergence of new epidemic diseases. *Microbiol Mol Biol Rev* 72:457-470. doi: 10.1128/mmbr.00004-08
- Pasquini-Descomps H, Brender N, Maradan D (2017) Value for money in H1N1 Influenza: A systematic review of the cost-effectiveness of pandemic interventions. *Value Heal* 20:819-827. doi: 10.1016/J.JVAL.2016.05.005
- Patz JA, Campbell-Lendrum D, Holloway T, Foley JA (2005) Impact of regional climate change on human health. *Nature* 438:310-317. doi: 10.1038/nature04188
- Patz JA, Daszak P, Tabor GM, Aguirre AA, Pearl M, Epstein J, Wolfe ND, Kilpatrick AM, Fofopoulos J, Molyneux D, Bradley DJ, Working group on land use change and disease emergence (2004) Unhealthy landscapes: Policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. *Environ. Health Perspect.* 112:1092-1098
- Patz JA, Epstein JH, Burke TA, Balbus JM (1996) Global climate change and emerging infectious diseases. *JAMA J Am Med Assoc* 275:217-222. doi: 10.1001/jama.1996.03530270057032

- Pavlovich SS, Lovett SP, Koroleva G, Guito JC, Arnold CE, Nagle ER, Kulcsar K, Lee A, Thibaud-Nissen F, Hume AJ, Mühlberger E, Uebelhoer LS, Towner JS, Rabadan R, Sanchez-Lockhart M, Kepler TB, Palacios G (2018) The Egyptian rousette genome reveals unexpected features of bat antiviral immunity. *Cell* 173:1098-1110.e18. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.070
- Peel AJ, Baker KS, Hayman DTSS, Broder CC, Cunningham AA, Fooks AR, Garnier R, Wood JLNN, Restif O (2018) Support for viral persistence in bats from age-specific serology and models of maternal immunity. *Sci. Rep.* 8:3859. doi: 10.1038/s41598-018-22236-6
- Peel AJ, Pulliam JRC, Luis AD, Plowright RK, O'Shea TJ, Hayman DTS, Wood JLN, Webb CT, Restif O (2014) The effect of seasonal birth pulses on pathogen persistence in wild mammal populations. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281:20132962.
- Peeters M, Courgnaud V, Abela B, Auzel P, Pourrut X, Bibollet-Ruche F, Loul S, Liegeois F, Butel C, Koulagna D, Mpoudi-Ngole E, Shaw GM, Hahn BH, Delaporte E (2002) Risk to human health from a plethora of simian immunodeficiency viruses in primate bushmeat. *Emerg Infect Dis* 8:451-7. doi: 10.3201/eid0805.010522
- Pensaert MB, de Bouck P (1978) A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch Virol* 58:243-7. doi: 10.1007/bf01317606
- Pestka S, Krause CD, Walter MR (2004) Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* 202:8-32. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x
- Pfefferle S, Oppong S, Drexler JF, Gloza-Rausch F, Ipsen A, Seebens A, Müller MA, Annan A, Vallo P, Adu-Sarkodie Y, Kruppa TF, Drosten C (2009) Distant relatives of severe acute respiratory syndrome coronavirus and close relatives of human coronavirus 229E in bats, Ghana. *Emerg Infect Dis* 15:1377-1384. doi: 10.3201/eid1509.090224
- Pike BL, Saylor KE, Fair JN, LeBreton M, Tamoufe U, Djoko CF, Rimoin AW, Wolfe ND (2010) The origin and prevention of pandemics. *Clin Infect Dis* 50:1636-1640. doi: 10.1086/652860
- Piot P, Muyembe J-J, Edmunds WJ (2014) Ebola in west Africa: from disease outbreak to humanitarian crisis. *Lancet Infect Dis* 14:1034-1035. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70956-9
- Plowright RK, Becker DJ, Crowley DE, Washburne AD, Huang T, Nameer PO, Gurley ES, Han BA (2019) Prioritizing surveillance of Nipah virus in India. *PLoS Negl Trop Dis* 13:e0007393. doi: 10.1371/journal.pntd.0007393
- Plowright RK, Eby P, Hudson PJ, Smith IL, Westcott D, Bryden WL, Middleton D, Reid PA, McFarlane RA, Martin G, Tabor GM, Skerratt LF, Anderson DL, Crameri G, Quammen D, Jordan D, Freeman P, Wang L-F, Epstein JH, Marsh GA, Kung NY, McCallum H (2015) Ecological dynamics of emerging bat virus spillover. *Proc R Soc B Biol Sci* 282:20142124. doi: 10.1098/rspb.2014.2124
- Plowright RK, Parrish CR, McCallum H, Hudson PJ, Ko AI, Graham AL, Lloyd-Smith JO (2017) Pathways to zoonotic spillover. *Nat. Rev. Microbiol.* 15:502-510. doi: 10.1038/nrmicro.2017.45

- Plowright RK, Peel AJ, Streicker DG, Gilbert AT, McCallum H, Wood J, Baker ML, Restif O (2016) Transmission or within-host dynamics driving pulses of zoonotic viruses in reservoir–host populations. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10:e0004796.
- Plowright RK, Sokolow SH, Gorman ME, Daszak P, Foley JE (2008) Causal inference in disease ecology: Investigating ecological drivers of disease emergence. *Front Ecol Environ* 6:420-429. doi: 10.1890/070086
- Poirotte C, Massol F, Herbert A, Willaume E, Bomo PM, Kappeler PM, Charpentier MJE (2017) Mandrills use olfaction to socially avoid parasitized conspecifics. *Sci Adv* 3:e1601721 . doi: 10.1126/sciadv.1601721
- Pourrut X, Délicat A, Rollin PE, Ksiazek TG, Gonzalez J -P., Leroy EM (2007) Spatial and temporal patterns of Zaire Ebola virus antibody prevalence in the possible reservoir bat species. *J Infect Dis* 196:S176-S183. doi: 10.1086/520541
- Pourrut X, Kumulungui B, Wittmann T, Moussavou G, Délicat A, Yaba P, Nkoghe D, Gonzalez JP, Leroy EM (2005) The natural history of Ebola virus in Africa. *Microbes Infect.* 7:1005 -1014. doi: 10.1016/j.micinf.2005.04.006
- Prendergast ME, Rouby H, Punnwong P, Marchant R, Crowther A, Kourampas N, Shipton C, Walsh M, Lambeck K, Boivin NL (2016) Continental island formation and the archaeology of defaunation on Zanzibar, Eastern Africa. *PLoS One* 11:e0149565. doi: 10.1371/journal.pone.0149565
- Promislow DEL, Harvey PH (1990) Living fast and dying young: A comparative analysis of life-history variation among mammals. *J Zool* 220:417-437. doi: 10.1111/j.1469-7998.1990.tb04316.x
- Pulliam JRC, Epstein JH, Dushoff J, Rahman SA, Bunning M, Jamaluddin AA, Hyatt AD, Field HE, Dobson AP, Daszak P (2012) Agricultural intensification, priming for persistence and the emergence of Nipah virus: A lethal bat-borne zoonosis. *J R Soc Interface* 9:89-101. doi: 10.1098/rsif.2011.0223
- Quan P-L, Sauzade M, Brouzes E (2018) dPCR: A technology review. *Sensors* 18:1271. doi: 10.3390/s18041271
- Raj VS, Mou H, Smits SL, Dekkers DHW, Müller MA, Dijkman R, Muth D, Demmers JAA, Zaki A, Fouchier RAM, Thiel V, Drosten C, Rottier PJM, Osterhaus ADME, Bosch BJ, Haagmans BL (2013) Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature* 495:251-254. doi: 10.1038/nature12005
- Rajemison FI, Rajemison FI, Lalarivoniaina OSN, Lalarivoniaina OSN, Goodman SM, Goodman SM (2017) Bat flies (Diptera: Nycteribiidae, Streblidae) parasitising *Rousettus madagascariensis* (Chiroptera: Pteropodidae) in the Parc National d'Ankarana, Madagascar: Species diversity, rates of parasitism and sex ratios. *African Entomol* 25:72 -85. doi: 10.4001/003.025.0072
- Ramasindrazana B, Dellagi K, Lagadec E, Randrianariveლოსია M, Goodman SM, Tortosa P (2016) Diversity, host specialization, and geographic structure of filarial nematodes infecting Malagasy bats. *PLoS One* 11:e0145709. doi: 10.1371/journal.pone.0145709

- Ranaivoson HC, Héraud J-M, Goethert HK, Telford SR, Rabetafika L, Brook CE (2019) Babesial infection in the Madagascan flying fox, *Pteropus rufus* É. Geoffroy, 1803. *Parasit Vectors* 12:51. doi: 10.1186/s13071-019-3300-7
- Randolph SE, Dobson ADM (2012) Pangloss revisited: A critique of the dilution effect and the biodiversity-buffers-disease paradigm. *Parasitology* 139:847-863. doi: 10.1017/S0031182012000200
- Razanajatovo NH, Nomenjanahary LA, Wilkinson DA, Razafimanahaka JH, Goodman SM, Jenkins RK, Jones JP, Héraud J-M (2015) Detection of new genetic variants of betacoronaviruses in endemic frugivorous bats of Madagascar. *Virology* 12:42. doi: 10.1186/s12985-015-0271-y
- Report of an International Commission (1978) Ebola haemorrhagic fever in Zaire, 1976. *Bull World Health Organ* 56:271-93.
- Reusken C, Obasanya J, Messori S, Vasconcelos P, Wilkinson A, Khellef N, Kobinger G, Mourya D, Carson G, Brett-Major D, Munuya P, Paweska J, Salman M, Kanj S, Zeller H, De Lamballerie X, Drosten C, Icksang Ko A, Yazdanpanah Y, Horby P, Daszak P, Damon I, Marston H, Wacharapluesadee S, Willis M, Carroll M, Whitworth J, Roth C, Rollin P, Rodriguez-Morales A (2018) WHO Research and Development Blueprint 2018 Annual review of diseases prioritized under the Research and Development Blueprint Informal consultation. Geneva, Switzerland
- Richter H V, Cumming GS (2008) First application of satellite telemetry to track African straw-coloured fruit bat migration. *J Zool* 275:172-176. doi: 10.1111/j.1469-7998.2008.00425.x
- Ridley M (2004) Coevolution. In: *Evolution*, Blackwell. p 613-6.
- Ritchie H, Roser M (2019) Causes of deaths. In: Univ. Oxford Glob. Chang. data lab. <https://ourworldindata.org/causes-of-death>
- Roberts BJ, Catterall CP, Eby P, Kanowski J (2012) Long-distance and frequent movements of the flying-fox *Pteropus poliocephalus*: Implications for management. *PLoS One* 7:e42532. doi: 10.1371/journal.pone.0042532
- Rogers DJ, Randolph SE (2000) The global spread of malaria in a future, warmer world. *Science* 289:1763-6.
- Russell AL, Goodman SM, Cox MP (2008) Coalescent analyses support multiple mainland-to-island dispersals in the evolution of Malagasy *Triaenops* bats (Chiroptera: Hipposideridae). *J Biogeogr* 35:995-1003. doi: 10.1111/j.1365-2699.2008.01891.x
- Saif LJ (2004) Animal coronaviruses: What can they teach us about the severe acute respiratory syndrome? *Rev sci tech Off int Epiz* 23:643-660. doi: 10.20506/rst.23.2.1513
- Sarabian C, Curtis V, McMullan R (2018) Evolution of pathogen and parasite avoidance behaviours. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 373:20170256. doi: 10.1098/rstb.2017.0256

- Saunders-Hastings P, Krewski D (2016) Reviewing the history of pandemic Influenza: Understanding patterns of emergence and transmission. *Pathogens* 5:66. doi: 10.3390/pathogens5040066
- Schalk A, Hawn M (1931) An apparently new respiratory disease of baby chicks. *J Am Vet Med Assoc* 78:413-416.
- Schaller M, Park JH (2011) The behavioral immune system (and why it matters). *Curr Dir Psychol Sci* 20:99-103. doi: 10.1177/0963721411402596
- Schountz T (2014) Immunology of bats and their viruses: Challenges and opportunities. *Viruses* 6:4880-4901. doi: 10.3390/v6124880
- Schuh AJ, Amman BR, Sealy TK, Spengler JR, Nichol ST, Towner JS (2017) Egyptian rousette bats maintain long-term protective immunity against Marburg virus infection despite diminished antibody levels. *Sci Rep* 7:8763. doi: 10.1038/s41598-017-07824-2
- Seltmann A, Corman VM, Rasche A, Drosten C, Cziráj GÁ, Bernard H, Struebig MJ, Voigt CC (2017) Seasonal fluctuations of astrovirus, but not coronavirus shedding in bats inhabiting human-modified tropical forests. *Ecohealth* 14:272-284. doi: 10.1007/s10393-017-1245-x
- Semba R, Chipangwi J, Miotti P, Dallabetta G, Hoover D, Canner J, Saah A (1994) Maternal vitamin A deficiency and mother-to-child transmission of HIV-1. *Lancet* 343:1593-1597. doi: 10.1016/S0140-6736(94)93056-2
- Sénat (2010) Rapport de la commission d'enquête sur le rôle des firmes pharmaceutiques dans la gestion par le Gouvernement de la grippe A (H1N1). Paris
- Sharp PM, Hahn BH (2011) Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1:a006841 . doi: 10.1101/cshperspect.a006841
- Sironi M, Cagliani R, Forni D, Clerici M (2015) Evolutionary insights into host-pathogen interactions from mammalian sequence data. *Nat Rev Genet* 16:224-236. doi: 10.1038/nrg3905
- Smith CS, de Jong CE, Meers J, Henning J, Wang L-F, Field HE (2016) Coronavirus infection and diversity in bats in the Australasian region. *Ecohealth* 13:72-82. doi: 10.1007/s10393-016-1116-x
- Smith EC, Blanc H, Vignuzzi M, Denison MR (2013) Coronaviruses lacking exoribonuclease activity are susceptible to lethal mutagenesis: Evidence for proofreading and potential therapeutics. *PLoS Pathog* 9:e1003565. doi: 10.1371/journal.ppat.1003565
- Smith KM, Machalaba CC, Seifman R, Feferholtz Y, Karesh WB (2019) Infectious disease and economics: The case for considering multi-sectoral impacts. *One Heal.* 7:100080.
- Snijder EJ, Bredenbeek PJ, Dobbe JC, Thiel V, Ziebuhr J, Poon LLM, Guan Y, Rozanov M, Spaan WJM, Gorbalenya AE (2003) Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J Mol Biol* 331:991-1004. doi: 10.1016/s0022-2836(03)00865-9

- Sohayati AR, Hassan L, Sharifah SH, Lazarus K, Zaini CM, Epstein JH, Shamsyul Naim N, Field HE, Arshad SS, Abdul Aziz J, Daszak P (2011) Evidence for Nipah virus recrudescence and serological patterns of captive *Pteropus vampyrus*. *Epidemiol Infect* 139:1570-1579. doi: 10.1017/S0950268811000550
- Song D, Moon H, Kang B (2015) Porcine epidemic diarrhea: A review of current epidemiology and available vaccines. *Clin Exp Vaccine Res* 4:166. doi: 10.7774/cevr.2015.4.2.166
- Song HD, Tu CC, Zhang GW, Wang SY, Zheng K, Lei LC, Chen QX, Gao YW, Zhou HQ, Xiang H, Zheng HJ, Chern SWW, Cheng F, Pan CM, Xuan H, Chen SJ, Luo HM, Zhou DH, Liu YF, He JF, Qin PZ, Li LH, Ren YQ, Liang WJ, Yu YD, Anderson L, Wang M, Xu RH, Wu XW, Zheng HY, Chen JD, Liang G, Gao Y, Liao M, Fang L, Jiang LY, Li H, Chen F, Di B, He LJ, Lin JY, Tong S, Kong X, Du L, Hao P, Tang H, Bernini A, Yu XJ, Spiga O, Guo ZM, Pan HY, He WZ, Manuguerra JC, Fontanet A, Danchin A, Niccolai N, Li YX, Wu CI, Zhao GP (2005) Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. *Proc Natl Acad Sci* 102:2430-2435. doi: 10.1073/pnas.0409608102
- Stone BL, Tourand Y, Brissette CA (2017) Brave new worlds: The expanding universe of Lyme disease. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 17:619-629. doi: 10.1089/vbz.2017.2127
- Storm N, Van Vuren PJ, Markotter W, Paweska JT (2018) Antibody responses to Marburg virus in Egyptian rousette bats and their role in protection against infection. *Viruses* 10:73. doi: 10.3390/v10020073
- Strassburg MA (1982) The global eradication of smallpox. *Am J Infect Control* 10:53-59. doi: 10.1016/0196-6553(82)90003-7
- Streicker DG, Recuenco S, Valderrama W, Benavides JG, Vargas I, Pacheco V, Condori Condori RE, Montgomery J, Rupprecht CE, Rohani P, Altizer S (2012) Ecological and anthropogenic drivers of rabies exposure in vampire bats: Implications for transmission and control. *Proc R Soc B Biol Sci* 279:3384-3392. doi: 10.1098/rspb.2012.0538
- Streicker DG, Winternitz JC, Satterfield DA, Condori-Condori RE, Broos A, Tello C, Recuenco S, Velasco-Villa A, Altizer S, Valderrama W (2016) Host-pathogen evolutionary signatures reveal dynamics and future invasions of vampire bat rabies. *Proc Natl Acad Sci* 113:10926-10931. doi: 10.1073/pnas.1606587113
- Subudhi S, Rapin N, Misra V (2019) Immune system modulation and viral persistence in bats: Understanding viral spillover. *Viruses* 11:v11020192
- Swanepoel R, Leman PA, Burt FJ, Zachariades NA, Braack LEO, Ksiazek TG, Rollin PE, Zaki SR, Peters CJ (1996) Experimental inoculation of plants and animals with Ebola virus. *Emerg Infect Dis* 2:321-325. doi: 10.3201/eid0204.960407
- Swanepoel R, Smit SB, Rollin PE, Formenty P, Leman PA, Kemp A, Burt FJ, Grobbelaar AA, Croft J, Bausch DG, Zeller H, Leirs H, Braack LEO, Libande ML, Zaki S, Nichol ST, Ksiazek TG, Paweska JT (2007) Studies of reservoir hosts for Marburg virus. *Emerg Infect Dis* 13:1847-1851. doi: 10.3201/eid1312.071115

- Tao Y, Shi M, Chommanard C, Queen K, Zhang J, Markotter W, Kuzmin I V, Holmes EC, Tong S (2017) Surveillance of bat coronaviruses in Kenya identifies relatives of human coronaviruses NL63 and 229E and their recombination history. *J Virol* 91:e01953-16. doi: 10.1128/jvi.01953-16
- Taylor LH, Latham SM, Woolhouse MEJ (2001) Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 356:983-989. doi: 10.1098/rstb.2001.0888
- Teeling EC (2005) A Molecular Phylogeny for Bats Illuminates Biogeography and the Fossil Record. *Science* 307:580-584. doi: 10.1126/science.1105113
- ThermoFisher Scientific (2015) QuantStudio 3D Digital PCR System. In: ThermoFisher Sci. <https://www.thermofisher.com/re/en/home/life-science/pcr/digital-pcr/quantstudio-3d-digital-pcr-system.html>
- Thibeaux R, Geroult S, Benezech C, Chabaud S, Soupé-Gilbert M-E, Girault D, Bierque E, Goarant C (2017) Seeking the environmental source of leptospirosis reveals durable bacterial viability in river soils. *PLoS Negl Trop Dis* 11:e0005414. doi: 10.1371/journal.pntd.0005414
- Tortosa P, Pascalis H, Guernier V, Cardinale E, Le Corre M, Goodman SM, Dellagi K (2012) Deciphering arboviral emergence within insular ecosystems. *Infect Genet Evol* 12:1333-1339. doi: 10.1016/j.meegid.2012.03.024
- Towner JS, Amman BR, Sealy TK, Reeder Carroll SA, Comer JA, Kemp A, Swanepoel R, Paddock CD, Balinandi S, Khristova ML, Formenty PBH, Albarino CG, Miller DM, Reed ZD, Kayiwa JT, Mills JN, Cannon DL, Greer PW, Byaruhanga E, Farnon EC, Atimmedi P, Okware S, Katongole-Mbidde E, Downing R, Tappero JW, Zaki SR, Ksiazek TG, Nichol ST, Rollin PE (2009) Isolation of genetically diverse Marburg viruses from Egyptian fruit bats. *PLoS Pathog* 5:e1000536. doi: 10.1371/journal.ppat.1000536
- Tresnan DB, Holmes K V (1998) Feline aminopeptidase N is a receptor for all group I coronaviruses. *Adv Exp Med Biol* 440:69-75.
- Tu C, Crameri G, Kong X, Chen J, Sun Y, Yu M, Xiang H, Xia X, Liu S, Ren T, Yu Y, Eaton BT, Xuan H, Wang LF (2004) Antibodies to SARS coronavirus in civets. *Emerg Infect Dis* 10:2244-2248. doi: 10.3201/eid1012.040520
- Turmelle AS, Allen LC, Jackson FR, Kunz TH, Rupprecht CE, McCracken GF (2010) Ecology of rabies virus exposure in colonies of Brazilian free-tailed Bats (*Tadarida brasiliensis*) at natural and man-made roosts in Texas. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 10:165-175. doi: 10.1089/vbz.2008.0163
- Tyrell DA, Bynoe ML (1965) Cultivation of a novel type of common-cold virus in organ cultures. *Br Med J* 1:1467-70. doi: 10.1136/bmj.1.5448.1467
- Van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJM, Wolthers KC, Wertheim-van Dillen PME, Kaandorp J, Spaargaren J, Berkhout B (2004) Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 10:368-373. doi: 10.1038/nm1024
- Van Valen L (1973) A new evolutionary law. *Evol Theory* 1:1-30.

- Vergara-Alert J, van den Brand JMA, Widagdo W, Muñoz M, Raj S, Schipper D, Solanes D, Cordón I, Bensaid A, Haagmans BL, Segalés J, Júlia Vergara-Alert 1, Judith M.A. van den Brand 1, W. Widagdo 1, Marta Muñoz VSR, Debby Schipper, David Solanes, Ivan Cordón, Albert Bensaid, Bart L. Haagmans JS (2017) Livestock susceptibility to infection with Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *Emerg Infect Dis* 23:232-240. doi: 10.3201/eid2302.161239
- Verhagen JH, Herfst S, Fouchier RAM (2015) How a virus travels the world. *Science* 347:616-617. doi: 10.1126/science.aaa6724
- Viergever RF (2013) The mismatch between the health research and development (R&D) that is needed and the R&D that is undertaken: an overview of the problem, the causes, and solutions. *Glob Health Action* 6:22450. doi: 10.3402/gha.v6i0.22450
- Vijgen L, Keyaerts E, Moës E, Thoelen I, Wollants E, Lemey P, Vandamme A-M, Van Ranst M (2005) Complete genomic sequence of human coronavirus OC43: Molecular clock analysis suggests a relatively recent zoonotic coronavirus transmission event. *J Virol* 79:1595-604. doi: 10.1128/JVI.79.3.1595-1604.2005
- Villarreal LP, Defilippis VR, Gottlieb KA (2000) Acute and persistent viral life strategies and their relationship to emerging diseases. *Virology* 272:1-6. doi: 10.1006/viro.2000.0381
- Vincenot CE, Florens FBV, Kingston T (2017) Can we protect island flying foxes? *Science* 355:1368-1370. doi: 10.1126/science.aam7582
- Wacharapluesadee S, Boongird K, Wanghongsa S, Ratanasetyuth N, Supavonwong P, Saengsen D, Gongal GN, Hemachudha T (2010) A longitudinal study of the prevalence of Nipah virus in *Pteropus lylei* bats in Thailand: Evidence for seasonal preference in disease transmission. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 10:183-190. doi: 10.1089/vbz.2008.0105
- Wacharapluesadee S, Duengkae P, Chaiyes A, Kaewpom T, Rodpan A, Yingsakmongkon S, Petcharat S, Phengsakul P, Maneorn P, Hemachudha T (2018) Longitudinal study of age-specific pattern of coronavirus infection in Lyle's flying fox (*Pteropus lylei*) in Thailand. *Virol J* 15:38. doi: 10.1186/s12985-018-0950-6
- Walsh JF, Molyneux DH, Birley MH (1993) Deforestation: Effects on vector-borne disease. *Parasitology* 106:S55-S75. doi: 10.1017/S0031182000086121
- Walther G-R, Post E, Convey P, Menzel A, Parmesan C, Beebee TJC, Fromentin J-M, Hoegh-Guldbergs O, Bairlein F, Parmesan C, Beebee TJC, Fromentin J-M, Hoegh-Guldberg O, Bairlein F (2002) Ecological responses to recent climate change. *Nature* 416:389-395. doi: 10.1038/416389a 416389a [pii]
- Wang L-F, Anderson DE (2019) Viruses in bats and potential spillover to animals and humans. *Curr Opin Virol* 34:79-89. doi: 10.1016/j.coviro.2018.12.007
- Wang L-F, Cramer G (2014) Emerging zoonotic viral diseases. *Rev sci tech Off int Epiz* 33:569-581. doi: 10.20506/rst.33.2.2311

- Wang L, Su S, Bi Y, Wong G, Gao GF, Yuhai Bi, Wong G, Gao GF (2018) Bat-origin coronaviruses expand their host range to pigs. *Trends Microbiol* 26:466-470. doi: 10.1016/j.tim.2018.04.003
- Wang LF, Shi Z, Zhang S, Field H, Daszak P, Eaton BT (2006) Review of bats and SARS. *Emerg. Infect. Dis.* 12:1834-1840. doi: 10.3201/eid1212.060401
- Wang Q, Vlasova AN, Kenney SP, Saif LJ (2019) Emerging and re-emerging coronaviruses in pigs. *Curr. Opin. Virol.* 34:39-49. doi: 10.1016/j.coviro.2018.12.001
- Ward JM (1970) Morphogenesis of a virus in cats with experimental feline infectious peritonitis. *Virology* 41:191-194. doi: 10.1016/0042-6822(70)90070-X
- Warrell DA (2013) Animals hazardous to humans. In: Magill AJ, Hill DR, Solomon T, Ryan ET (éd) *Hunter's tropical medicine and emerging infectious disease*. W.B. Saunders, p 938-965.
- Webster RG (2004) Wet markets - A continuing source of Severe Acute Respiratory Syndrome and Influenza? *Lancet* 363:234-236. doi: 10.1016/S0140-6736(03)15329-9
- Webster RG, Bean W, Gorman O, Chambers T, Kawaoka Y (1992) Evolution and ecology of Influenza A viruses. *Am Soc Microbiol* 56:152-179. doi: 0146-0749/92/010152-28\$02.00/0
- Weigler BJ, Baldock FC, Girjes AA, Carrick FN, Lavin MF (2013) Evaluation of an enzyme immunoassay test for the diagnosis of *Chlamydia psittaci* infection in free-ranging koalas (*Phascolarctos cinereus*) in Southeastern Queensland, Australia. *J Wildl Dis* 24:259-263. doi: 10.7589/0090-3558-24.2.259
- Wertheim JO, Chu DKW, Peiris JSM, Kosakovsky Pond SL, Poon LLM (2013) A case for the ancient origin of coronaviruses. *J Virol* 87:7039-45. doi: 10.1128/JVI.03273-12
- Wilkie DS, Carpenter JF (1999) Bushmeat hunting in the Congo Basin: An assessment of impacts and options for mitigation. *Biodivers Conserv* 8:927-955. doi: 10.1023/A:1008877309871
- Wilkinson DA, Duron O, Cordonin C, Gomard Y, Ramasindrazana B, Mavingui P, Goodman SM, Tortosa P (2016) The bacteriome of bat flies (Nycteribiidae) from the Malagasy region: A community shaped by host ecology, bacterial transmission mode, and host-vector specificity. *Appl Environ Microbiol* 82:1778-1788. doi: 10.1128/AEM.03505-15
- Wilkinson DA, Marshall JC, French NP, Hayman DTS (2018) Habitat fragmentation, biodiversity loss and the risk of novel infectious disease emergence. *J R Soc Interface* 15:20180403. doi: 10.1098/rsif.2018.0403
- Wilkinson DA, Mélade J, Dietrich M, Ramasindrazana B, Soarimalala V, Lagadec E, le Minter G, Tortosa P, Heraud J-M, de Lamballerie X, Goodman SM, Dellagi K, Pascalis H (2014) Highly diverse morbillivirus-related paramyxoviruses in wild fauna of the Southwestern Indian Ocean islands: Evidence of exchange between introduced and endemic small mammals. *J Virol* 88:8268-77. doi: 10.1128/JVI.01211-14

- Wilkinson DA, Temmam S, Lebarbenchon C, Lagadec E, Chotte J, Guillebaud J, Ramasindrazana B, Héraud JM, de Lamballerie X, Goodman SM, Dellagi K, Pascalis H (2012) Identification of novel paramyxoviruses in insectivorous bats of the Southwest Indian Ocean. *Virus Res* 170:159-163. doi: 10.1016/j.virusres.2012.08.022
- Williamson MM, Hooper PT, Selleck PW, Westbury HA, Slocombe RF (2000) Experimental Hendra virus infection in pregnant guinea-pigs and fruit bats (*Pteropus poliocephalus*). *J Comp Pathol* 122:201-207. doi: 10.1053/jcpa.1999.0364
- Willoughby AR, Phelps KL, Olival KJ (2017) A comparative analysis of viral richness and viral sharing in cave-roosting bats. *Diversity* 9:35. doi: 10.3390/d9030035
- Wolfe ND, Dunavan CP, Diamond J (2007) Origins of major human infectious diseases. *Nature* 447:279-283. doi: 10.1038/nature05775
- Wong S, Lau S, Woo P, Yuen K-YY (2007) Bats as a continuing source of emerging infections in humans. *Rev Med Virol* 17:67-91. doi: 10.1002/rmv.520
- Woo PCY, Huang Y, Lau SKP, Yuen K-Y, Woo PCY, Huang Y, Lau SKP, Yuen K-Y (2010) Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses* 2:1804-1820. doi: 10.3390/v2081803
- Woo PCY, Lau SKP, Chu C-M, Chan K-H, Tsoi H-W, Huang Y, Wong BHL, Poon RWS, Cai JJ, Luk W-K, Poon LLM, Wong SSY, Guan Y, Peiris JSM, Yuen K-Y (2005) Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* 79:884-895. doi: 10.1128/jvi.79.2.884-895.2005
- Woo PCY, Lau SKP, Lam CSF, Tsang AKL, Hui S-W, Fan RYY, Martelli P, Yuen K-Y (2014) Discovery of a novel bottlenose dolphin coronavirus reveals a distinct species of marine mammal coronavirus in Gammacoronavirus. *J Virol* 88:1318-1331. doi: 10.1128/jvi.02351-13
- Wood CL, Lafferty KD (2013) Biodiversity and disease: a synthesis of ecological perspectives on Lyme disease transmission. *Trends Ecol Evol* 28:239-247. doi: 10.1016/j.tree.2012.10.011
- Wood CL, Lafferty KD, DeLeo G, Young HS, Hudson PJ, Kuris AM (2014) Does biodiversity protect humans against infectious disease? *Ecology* 95:817-832. doi: 10.1890/13-1041.1
- Woodroffe R, Donnelly CA, Jenkins HE, Johnston WT, Cox DR, Bourne FJ, Cheeseman CL, Delahay RJ, Clifton-Hadley RS, Gettinby G, Gilks P, Hewinson RG, McInerney JP, Morrison WI (2006) Culling and cattle controls influence tuberculosis risk for badgers. *Proc Natl Acad Sci* 103:14713-14717. doi: 10.1073/pnas.0606251103
- Woolhouse MEJ, Gowtage-Sequeria S (2005) Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerg Infect Dis* 11:1842-1847. doi: 10.3201/eid1112.050997
- Woolhouse MEJ, Haydon DT, Antia R (2005) Emerging pathogens: The epidemiology and evolution of species jumps. *Trends Ecol Evol* 20:238-244. doi: 10.1016/j.tree.2005.02.009

- Wynne JW, Wang L-F (2013) Bats and viruses: friend or foe? *PLoS Pathog* 9:e1003651 . doi: 10.1371/journal.ppat.1003651
- Xia L, Yang Y, Wang J, Jing Y, Yang Q (2018) Impact of TGEV infection on the pig small intestine. *Virologica Sinica* 15:102. doi: 10.1186/s12985-018-1012-9
- Yinda CK, Ghogomu SM, Conceição-Neto N, Beller L, Deboutte W, Vanhulle E, Maes P, Van Ranst M, Matthijssens J (2018) Cameroonian fruit bats harbor divergent viruses, including rotavirus H, bastroviruses, and picobirnaviruses using an alternative genetic code. *Virus Evol* 3:vey008. doi: 10.1093/ve/vey008
- Yoon SW, Webby RJ, Webster RG (2014) Evolution and ecology of Influenza A viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 385:359-375. doi: 10.1007/82_2014_396
- Young CCW, Olival KJ (2016) Optimizing viral discovery in bats. *PLoS One* 11:e0149237. doi: 10.1371/journal.pone.0149237
- Zhang SY, Cui J, Han NIJ, Streicker D, Li G, Tang XC, Shi ZL, Hu ZH, Zhao GP, Fontanet A, Guan Y, Wang LF, Jones G, Field HE, Daszak P (2007) Evolutionary relationships between bat coronaviruses and their hosts. *Emerg Infect Dis* 13:1526-1532.
- Zhang Z, Shen L, Gu X (2016) Evolutionary dynamics of MERS-CoV: Potential recombination, positive selection and transmission. *Sci Rep* 6:25049. doi: 10.1038/srep25049
- Zhou P, Fan H, Lan T, Yang X Lou, Shi WF, Zhang W, Zhu Y, Zhang YW, Xie QM, Mani S, Zheng XS, Li B, Li JM, Guo H, Pei GQ, An XP, Chen JW, Zhou L, Mai KJ, Wu ZX, Li D, Anderson DE, Zhang LB, Li SY, Mi ZQ, He TT, Cong F, Guo PJ, Huang R, Luo Y, Liu XL, Chen J, Huang Y, Sun Q, Zhang XLL, Wang YY, Xing SZ, Chen YS, Sun Y, Li J, Daszak P, Wang LF, Shi ZL, Tong YG, Ma JY (2018) Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin. *Nature* 556:255-259. doi: 10.1038/s41586-018-0010-9
- Zhou P, Tachedjian M, Wynne JW, Boyd V, Cui J, Smith I, Cowled C, Ng JHJ, Mok L, Michalski WP, Mendenhall IH, Tachedjian G, Wang L-F, Baker ML (2016) Contraction of the type I IFN locus and unusual constitutive expression of IFN- α in bats. *Proc Natl Acad Sci* 113:2696-2701. doi: 10.1073/pnas.1518240113
- Zohdy S, Schwartz TS, Oaks JR (2019) The coevolution effect as a driver of spillover. *Trends Parasitol* 35:399-408. doi: 10.1016/j.pt.2019.03.010
- Zuk M, McKean KA (1996) Sex differences in parasite infections: Patterns and processes. *Int J Parasitol* 26:1009-1024. doi: 10.1016/S0020-7519(96)80001-4

Annexes

Annexe 1. Synthèse d'agents biologiques (virus, bactéries et champignons) pathogènes ou non-pathogènes détectés chez les chauves-souris (synthèse réalisée en mai 2019). (Mühldorfer 2013 ; Warrell 2013 ; Chen et al. 2014).

	Viruses	
Virus à ARN simple brin, polarité positive	Astroviridae	Bat astrovirus
	Caliciviridae	Bat calicivirus
		Bat norovirus
	Coronaviridae	229E-related bat coronavirus
		Bat coronavirus
		Bat SARS coronavirus
		Bat SARS-like coronavirus
		Middle East respiratory syndrome coronavirus
		NL63-related bat coronavirus
		Porcine epidemic diarrhea virus
		SARS-related bat coronavirus
		Swine acute diarrhea syndrome related coronavirus
	Flaviviridae	Bat pegivirus
		Bat flaviridae sp
		Bat flavivirus
		Bat GB virus
		Bat GB-like virus
		Bat hepacivirus
		Bat pegivirus
		Bat pestivirus
		Batu Cave virus
		Bukalasa bat virus
		Carey Island virus
		Dakar bat virus
		Dengue virus 1
		Dengue virus 2
		Dengue virus 4
		Entebbe bat virus
		Japanese encephalitis virus
		Phnom Penh bat virus
		Rio Bravo virus
		Sokoluk virus
Tamana bat virus		
Usutu virus		
West Nile virus		
Yokose virus		
Zika virus		
Hepeviridae	Bat hepevirus	
	Orthohepevirus	
Picornaviridae	Bat crohivirus	
	Bat hepatovirus	
	Bat icavirus	
	Bat kobuvirus	

		Bat kunsagivirus
		Bat picornavirus
		Bat sapelovirus
		Hepatitis A
		Kobuvirus
		Parechovirus
		Picorna-like virus
		Picornaviridae virus
		Tescho virus
		Washington bat picornavirus
	Togaviridae	Chikungunya virus
		Venezuelan equine encephalitis virus
Virus à ARN simple brin, polarité négative	Bornaviridae	Bat bornavirus
	Filoviridae	Bat filovirus
		Bombali ebolavirus
		Lloviu virus
		Marburg virus
		Mengla virus
		Zaire ebolavirus
	Hantaviridae	Andes orthohantavirus
		Brno virus
		Dakrong virus
		Dode virus
		Hantavirus
		Huangpi virus
		Laibin mobatvirus
		Laibin virus
		Longquan virus
		Makokou virus
		Mouyassue virus
		Puumala orthohantavirus
		Quezon virus
		Seoul orthohantavirus
	Xuan son virus	
	Nairoviridae	Bat nairovirus
		Gossas virus
		Issyk-Kul virus
		Kasokero virus
		Leopards Hill virus
		Uzun Agach virus
		Yogue virus
	Orthomyxoviridae	Bat Influenza A virus
	Paramyxoviridae	Achimota virus
		Alston virus
Bat paramyxoviridae sp		
Bat paramyxovirus		
Bat rubulavirus		
Cedar virus		
Hendra virus		
Hervey virus		

		Mapuera virus
		Menangle virus
		Nipah virus
		Porcine rubulavirus
		Sosuga virus
		Teviot virus
		Tioman virus
		Tuhoko virus
		Yeppoon virus
	Peribunyaviridae	Bat bunyavirus
		Kaeng Khoi virus
		Mojui dos Campos virus
	Phenuiviridae	Malsoor virus
		Rift Valley virus
		Toscana virus
	Rhabdoviridae	Aravan virus
		Bat lyssavirus
		Bat rhabdoviridae
		Bat rhabdovirus
		Bat rhabdovirus 1
		Bat rhabdovirus 2
		Benxi virus
		Bokeloh bat lyssavirus
		Duvenhage virus
		European bat lyssavirus
		European bat lyssavirus 1
		European bat lyssavirus 2
		Fikirini bat rhabdovirus
		Gannoruwa bat lyssavirus
		Irkut virus
		Kern Canyon virus
		Khujand virus
		Kotalahti bat lyssavirus
		Kumasi rhabdovirus
		Lagos bat virus
		Lleida bat lyssavirus
		Mount Elgon bat virus
		Oita virus
		Rabies virus
		Shimoni bat virus
		Taiwan bat lyssavirus
		Vaprio virus
		West Caucasian bat virus
		Anelloviridae
	Circoviridae	Bat associated circovirus
		Bat circovirus
		Bat cyclovirus
	Parvoviridae	Bat adeno-associated virus
		Bat associated picorna-like virus
		Bat bocaparvovirus

Virus à ADN, simple brin		Bat bocavirus
		Bat bufavirus
		Bat dependoparvovirus
		Bat parvovirus
Retrovirus	Hepadnaviridae	Bat hepadnavirus
		Bat hepatitis B virus
	Retroviridae	Bat hepatitis virus
		Bat gammaretrovirus
Virus à ARN, double brin	Picobirnaviridae	Limbe picobirna-like virus
		Lysoka partiti-like virus
	Reoviridae	Fomede virus
		Banna virus
		Bat orbivirus
		Bat orthoreovirus
		Bat rotavirus
		Bat rotavirus A
		Broome virus
		Bukakata virus
		Cangyuan orthoreovirus
		Ife virus
		Jiangxi orthoreovirus
		Mammalian Orthoreovirus
		Nelson Bay orthoreovirus NBV
		Pulau reovirus
		Tai Forest reovirus
		Xi river reovirus
		Virus à ADN, double brin
Herpesviridae	Bat cytomegalovirus	
	Bat herpesvirus	
	Bat rhadinovirus	
	Bat roseolovirus	
Bat simplexvirus		
Papillomaviridae	Bat papillomaviridae	
	Bat papillomavirus	
Polyomaviridae	Bat polyomavirus	
	Poxviridae	Bat poxvirus
	Bacteria	
		<i>Bartonella</i> spp.
		<i>Borrelia</i> spp.
		<i>Brucella</i> spp.
		<i>Campyobacter</i> spp

Clostridium spp.
Escherichia coli
Grahamella spp.
Leptospira sp.
Listeria spp.
Neorickettsia spp.
Pasteurella spp.
Rickettsia spp.
Salmonella spp.
Shigella spp.
Thyphimurium sp.
Vibrio spp.
Yersinia spp.

	Fungi	
--	--------------	--

Histoplasma capsulatum
Pseudogymnoascus destructans
Scopulariopsis spp.
Geomyces spp.
Trychophyton spp.
Aphanoascus spp.
Myceliophthora spp.
Chrysosporium spp.

LETTER TO THE EDITOR

Astroviruses in bats, Madagascar

Camille Lebarbenchon¹, Beza Ramasindrazana^{1,2}, Léa Joffrin¹, Sandra Bos¹, Erwan Lagadec¹, Gildas Le Minter¹, Yann Gomard¹, Pablo Tortosa¹, David A Wilkinson¹, Steven M Goodman^{2,3} and Patrick Mavingui¹

Emerging Microbes & Infections (2017) 6, e58; doi:10.1038/emi.2017.47; published online 21 June 2017

Dear Editor,

Astroviruses (AstVs) (family *Astroviridae*) are positive-sense, single-stranded RNA viruses that infect a large diversity of mammalian and avian species.¹ In humans, eight serotypes have been described worldwide, accounting for 2%–9% of all acute non-bacterial gastroenteritis cases in children.² AstVs have been detected from over 80 non-human host species, including a large diversity of bat species in Asia, Europe and Africa,³ and recent phylogenetic analyses suggest that the long-term evolution of AstVs is determined by frequent cross-species transmission events.^{4,5} During the past decade, numerous AstVs with potential zoonotic transmission have been described, highlighting the need for improved knowledge on their biology to prevent future health threats.²

Bats are recognized as a major reservoir of infectious agents. Madagascar shelters over 46 bat species, of which nearly 80% are endemic, occupying different types of day roosts, including natural and synanthropic sites. Recent investigations have shown that the compositions of Malagasy bat species assemblages are correlated with factors associated with the diversity and transmission of infectious agents, such as paramyxoviruses and *Leptospira*.^{6,7} The detection of new Betacoronaviruses in endemic Malagasy fruit bats also underlined the urgent need to better understand bat-associated infectious agents, and thus assess the potential for spillover to human populations in this major biodiversity hotspot.⁸

Herein, Malagasy bats were sampled for the detection of AstVs in the context of a multilevel research program examining the systematics and biogeography of these animals and their associated infectious agents. Bats were trapped at two locations (Ambohitantely and Anjohibe) using mist nets, harp traps and butterfly nets. In Anjohibe, several different species were trapped in a large cave network, whereas in Ambohitantely, two species were sampled at different sites: *Myotis goudoti* in a cave roost and *Mormopterus jugularis* in a public school. Rectal and buccal swabs were obtained using sterile rayon-tipped applicators (Puritan, Guilford, ME, USA). Pooled swabs from each individual bat (one rectal+one buccal swab) were placed in the same tube containing 1.5 mL of brain heart infusion medium (Conda, Madrid, Spain) supplemented with penicillin G (1000 units/mL), streptomycin (1 mg/mL), kanamycin (0.5 mg/mL), gentamicin

(0.25 mg/mL) and amphotericin B (0.025 mg/mL), immediately frozen in liquid nitrogen, and subsequently transferred and stored in a –80 °C freezer.

Samples were vortexed and centrifuged at 1500g for 15 min. RNA extraction was performed using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA). Reverse transcription was performed on 10 µL of RNA using the ProtoScript II Reverse Transcriptase and Random Primer 6 (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) under the following thermal conditions: 70 °C for 5 min, 25 °C for 10 min, 42 °C for 50 min and 65 °C for 20 min. cDNAs were tested for the presence of the AstV RNA-dependent RNA-polymerase (RdRp) gene using a pan-AstV semi-nested polymerase chain reaction (PCR) assay.⁹ PCRs were performed with the GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) in an Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). After electrophoresis on a 1.5% agarose gel stained with 2% GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA), PCR products of the expected size were submitted for direct Sanger sequencing (Genoscreen, Lille, France).

Overall, 40 of 178 bats tested positive for the presence of AstV RdRp (mean detection rate \pm 95% confidence interval: 22.5% \pm 6.13%). This detection rate was consistent with rates reported in other studies using the same PCR assay.^{9,10} Six of the nine bat species tested positive (Supplementary Table S1), with significant variation between species ($\chi^2=63.3$, $P<0.001$). A difference in the mean detection rates between the Ambohitantely (1.96% \pm 3.81%) and the Anjohibe (30.7% \pm 8.02%) sites was also observed ($\chi^2=23.2$, $P<0.001$). This result may be affected by a sampling bias between the two sites (51 bats sampled in Ambohitantely versus 127 in Anjohibe) or may reflect species- and site-related variation in AstV infection. Repeated sampling of the same bat populations would be needed to examine potential seasonal variations in virus transmission between hosts and locations.

A Bayesian Markov Chain Monte Carlo coalescent analysis was performed with 31 sequences obtained in this study (GenBank accession numbers KY575644–KY575674) and 83 reference AstV RdRp partial nucleotide sequences. Sequences (395 bp) were aligned using CLC Sequence Viewer version 7.7.1 (CLC Bio, Aarhus, Denmark). The coalescent analysis was performed with the program

¹University of Reunion Island, UMR PIMIT (Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical), INSERM 1187, CNRS 9192, IRD 249. GIP CYROI, 2 Rue Maxime Rivière, 97490 Sainte-Clotilde, La Réunion, France; ²Association Vahatra, BP 3972, Antananarivo 101, Madagascar and ³Field Museum of Natural History, 1400 South Lake Shore Drive, Chicago, IL 60605, USA

Correspondence: C Lebarbenchon
E-mail: camille.lebarbenchon@univ-reunion.fr

Received 9 February 2017; revised 28 April 2017; accepted 1 May 2017

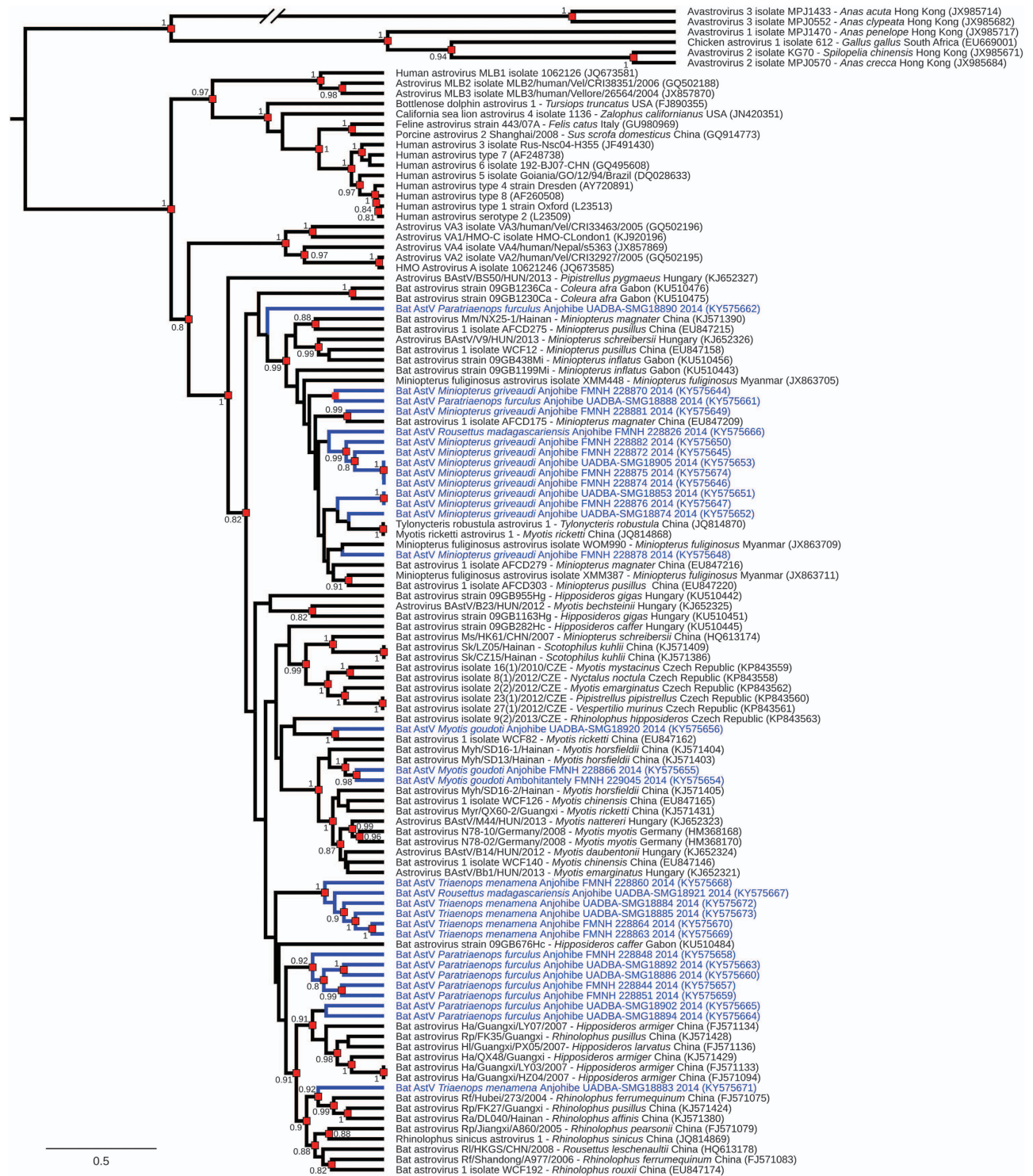


Figure 1 Maximum clade credibility tree from 114 Astrovirus (AstV) RNA-dependent RNA-polymerase partial nucleotide sequences (395 bp). Blue branches indicate bat AstVs detected on Madagascar. Sequence accession numbers are indicated in parentheses, and virus origin (host bat species and sampling location) is detailed for animal-origin AstVs. Posterior probabilities are reported when >0.8 (red squares). Sequences derived from this study are indicated in blue.

BEAST 1.8.4,¹¹ with the general time-reversible evolutionary model, an estimation of the proportion of invariable sites (I) and of the nucleotide heterogeneity of substitution rates (α), as selected by Model Generator 0.85.¹² A strict molecular clock and a constant population size were selected. The analysis was performed with a chain length of

60 million generations sampled every 1000 iterations; the first 10% of trees were discarded as burn-in.

Analysis of the 31 RdRp partial sequences of AstVs obtained from Malagasy bats revealed high genetic diversity (pairwise distance up to 38%). High sequence diversity is commonly described in bat AstVs,³

with studies reporting potentially novel AstV species in these hosts.^{9,13,14} The coalescent analysis provided further evidence of this considerable diversity and the low degree of host restriction (Figure 1). For instance, the two viruses detected in *Rousettus madagascariensis* were more genetically related to AstVs found in *Miniopterus griveaudi* and in *Triaenops menamena* than to each other. The close proximity of bat roosting sites in the Anjohibe cave network may favor virus transmission between species and, more broadly, the infection of a large diversity of hosts sharing these habitats. The sequence detected in *Myotis goudoti* at Ambohitantely was closely related to one of the two sequences detected in the same species at Anjohibe, further suggesting that AstVs may easily spread within bat populations. Low levels of host restriction and limited phylogenetic clustering between viruses detected at distant locations have also been reported in other studies in Asia, Europe and Africa,³ although the ecological drivers of AstV epidemiology and evolution remain to be determined.⁴

This report suggests that Malagasy bats may act as reservoirs of a large diversity of AstVs. Further epidemiological work is necessary to identify hosts and ecological factors involved in AstV infection among bats. Additional sequencing may also provide important information on the origin and evolutionary history of these viruses. AstVs are important agents of acute gastroenteritis among children <24 months of age on Madagascar, where simultaneous circulation of multiple genotypes has been reported.¹⁵ Comprehensive source-attributed case-control studies will be necessary to assess the risk of zoonotic transmission of bat-origin AstVs.

ACKNOWLEDGEMENTS

Malalanirina Rakotomanga and Andrianiaina Randrenjarison are thanked for their assistance in the field. Research permits for animal sampling were issued by the Direction du Système des Aires Protégées, Direction Générale de l'Environnement et des Forêts, and Madagascar National Parks, following regulations of Malagasy national authorities (permit NO 238/14/MEEF/SG/DGF/DCB.SAP/SCB and 268/14/MEEF/SG/DGF/DCB.SAP/SCB). Field research was funded by the 'Fond Européen de Développement Régional: ParamyxOI' (Programme Opérationnel de Coopération Territoriale NO 33857), and molecular analyses were funded by the Université de La Réunion. BR's post-doctoral fellowship was supported by the 'Run Emerge' European Union's Seventh Framework Program (FP7/2007-2013; Grant agreement NO 263958), the 'Fonds de Coopération Régionale, Prefecture de La Réunion' and The Field Museum of Natural History, Chicago, through the Ralph and Marian Falk Medical Research Trust. The funding agencies did not have any involvement in the study design, implementation or publishing of this study,

and the research presented herein represents the opinions of the authors but not necessarily the opinions of the funding agencies.

- 1 De Benedictis P, Schultz-Cherry S, Burnham A *et al*. Astrovirus infections in humans and animals – molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infect Genet Evol* 2011; **11**: 1529–1544.
- 2 Bosch A, Pinto RM, Guix S. Human astroviruses. *Clin Microbiol Rev* 2014; **27**: 1048–1074.
- 3 Fischer K, dos Reis VP, Balkema-Buschmann A *et al*. Towards understanding the transmission dynamics of a neglected virus family. *Viruses* 2017; **9**: 34.
- 4 Mendenhall IH, Smith GJD, Vijaykrishna D. Ecological drivers of virus evolution: astrovirus as a case study. *J Virol* 2015; **89**: 6978–6981.
- 5 Karlsson EA, Small CT, Freiden P *et al*. Non-human primates harbor diverse mammalian and avian astroviruses including those associated with human infections. *PLoS Pathog* 2015; **11**: 1–17.
- 6 Mélade J, Wieseke N, Ramasindrazana B *et al*. An eco-epidemiological study of Morbilli-related paramyxovirus infection in Madagascar bats reveals host-switching as the dominant macro-evolutionary mechanism. *Sci Rep* 2016; **6**: 23752.
- 7 Gomard Y, Dietrich M, Wieseke N *et al*. Malagasy bats shelter a considerable genetic diversity of pathogenic *Leptospira* suggesting notable host-specificity patterns. *FEMS Microbiol Ecol* 2016; **92**: 1–12.
- 8 Razanajatovo NH, Nomenjanahary LA, Wilkinson DA *et al*. Detection of new genetic variants of Betacoronaviruses in endemic frugivorous bats of Madagascar. *Virol J* 2015; **12**: 42.
- 9 Chu DKW, Poon LLM, Guan Y *et al*. Novel astroviruses in insectivorous bats. *J Virol* 2008; **82**: 9107–9114.
- 10 Fischer K, Zeus V, Kwasnitschka L *et al*. Insectivorous bats carry host specific astroviruses and coronaviruses across different regions in Germany. *Infect Genet Evol* 2016; **37**: 108–116.
- 11 Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 2007; **7**: 214.
- 12 Keane TM, Creevey CJ, Pentony MM *et al*. Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol Biol* 2006; **6**: 29.
- 13 Kemenesi G, Dallos B, Gördöl T *et al*. Molecular survey of RNA viruses in Hungarian bats: discovering novel astroviruses, coronaviruses, and caliciviruses. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2014; **14**: 846–855.
- 14 Rougeron V, Suquet E, Maganda GD *et al*. Characterization and phylogenetic analysis of new bat astroviruses detected in Gabon, Central Africa, 2016. *Acta Virol* **60**: 386–392.
- 15 Papaventsis DC, Dove W, Cunliffe NA *et al*. Human astrovirus gastroenteritis in children, Madagascar, 2004–2005. *Emerg Infect Dis* 2008; **14**: 844–846.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017


Supplementary Information for this article can be found on the *Emerging Microbes & Infections* website (<http://www.nature.com/emi>)

SHORT REPORT

Open Access



Bat Astrovirus in Mozambique

Flora Hoarau¹, Gildas Le Minter¹, Léa Joffrin¹, M. Corrie Schoeman², Erwan Lagadec¹, Beza Ramasindrazana^{1,3,7}, Andréa Dos Santos⁴, Steven M. Goodman^{3,5}, Eduardo S. Gudo⁶, Patrick Mavingui¹ and Camille Lebarbenchon^{1*} 

Abstract

Astroviruses (AstVs) are responsible for infection of a large diversity of mammalian and avian species, including bats, aquatic birds, livestock and humans. We investigated AstVs circulation in bats in Mozambique and Mayotte, a small island in the Comoros Archipelago located between east Africa and Madagascar. Biological material was collected from 338 bats and tested for the presence of the AstV RNA-dependent RNA-polymerase gene with a pan-AstV semi-nested polymerase chain reaction assay. None of the 79 samples obtained from Mayotte bats (*Pteropus seychellensis comorensis* and *Chaerephon pusillus*) tested positive; however, 20.1% of bats sampled in Mozambique shed AstVs at the time of sampling and significant interspecific variation in the proportion of positive bats was detected. Many AstVs sequences obtained from a given bat species clustered in different phylogenetic lineages, while others seem to reflect some level of host-virus association, but also with AstVs previously reported from Malagasy bats. Our findings support active circulation of a large diversity of AstVs in bats in the western Indian Ocean islands, including the southeastern African coast, and highlight the need for more detailed assessment of its risk of zoonotic transmission to human populations.

Keywords: Mammastrovirus, Mayotte, Mozambique, Madagascar, *Triaenops afer*

Astroviruses (AstVs) are small non-enveloped RNA viruses, transmitted via the fecal-oral route. They have been detected from over 80 vertebrate host species [1], and represent a significant source of morbidity and economic losses. Worldwide, AstVs account for 2 to 9% of all acute non-bacterial gastroenteritis in children [2]; they are also responsible for diseases in livestock, poultry and domestic pets [3]. In wild animals, AstVs have been mostly detected in bats [4] and in aquatic birds [5], although detection in other host types have been reported, such as in marine mammals [6] and non-human primates [7].

Current knowledge on the epidemiology of AstVs in African bats is limited [8, 9]. In a previous study, we detected high genetic diversity of AstVs in Malagasy bats [10]. Detection of AstVs on other islands of the western Indian Ocean has not been reported. The goal of this study was to investigate AstV circulation in bats in Mozambique and on Mayotte, a small island in the Comoros archipelago located between east Africa and Madagascar.

Biological material was collected on Mayotte at several locations (Bandrele, Chiconi, Coconi, Kwale, Mangajou, Passamainty, Sohoabe, Tsoundzou), in November–December 2014, and in Mozambique (Inhassoro district) in February and May 2015. Bats were captured using mist nets and harp traps. On Mayotte, rectal swabs were obtained with sterile rayon-tipped applicators (Puritan, Guilford, ME, USA) from 21 *Pteropus seychellensis comorensis*, and droppings were collected from 58 *Chaerephon pusillus*. Swabs and droppings were placed in 1.5 mL of Virus Transport Media (VTM; [10]), and were immediately frozen in liquid nitrogen. In Mozambique, one rectal and one buccal swab were collected for each sampled bat. The two swabs were then placed in the same tube, containing 1.5 mL of VTM, and were immediately frozen in liquid nitrogen. Sampled bat species and number of tested samples are presented in Table 1.

RNA extraction was performed with the QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA). Reverse transcription was performed on 10 µL of RNA using the ProtoScript II Reverse Transcriptase and Random Primer 6 (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) using a previously published protocol [10]. cDNAs were

* Correspondence: camille.lebarbenchon@univ-reunion.fr

¹Université de La Réunion, UMR Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT), INSERM 1187, CNRS 9192, IRD 249, 2 rue Maxime Rivière (GIP CYROI), 97490 Sainte-Clotilde, La Réunion, France

Full list of author information is available at the end of the article



Table 1 Family, species day roosts, and number of bats sampled and tested for the presence of Astroviruses, in Mozambique

Family	Species	Day roosts	N tested	N positive
Hipposideridae	<i>Hipposideros caffer</i>	Caves	57	10
Miniopteridae	<i>Miniopterus mossambicus</i>	Caves	21	2
Molossidae	<i>Mops condylurus</i>	Houses	52	1
Nycteridae	<i>Nycteris thebaica</i>	Caves	14	4
Rhinolophidae	<i>Rhinolophus lobatus</i>	Caves	9	0
	<i>Rhinolophus mossambicus</i>	Caves	20	0
	<i>Rhinolophus rhodesiae</i>	Caves	31	0
Rhinycteridae	<i>Triaenops afer</i>	Caves	51	35
Vespertilionidae	<i>Neoromicia nana</i>	Rolled-up banana leaves	2	0
	<i>Scotophilus viridis</i>	Free-flying	2	0

tested for the presence of the AstV RNA-dependent RNA-polymerase (RdRp) gene using a pan-AstV semi-nested polymerase chain reaction (PCR) assay [10, 11]. PCRs were performed with the GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) in an Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Electrophoresis were performed on 1.5% agarose gels stained with 2% GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA). Chi square tests were conducted to investigate the effect of the host species, sampling period (month), and sex, on the probability of successful detection of AstV RdRp genes. Statistical analyses were conducted with R, version 3.2.3 [12].

PCR products of the expected size were submitted for direct Sanger sequencing (Genoscreen, Lille, France). The 31 sequences obtained in this study were aligned with 112 reference AstV RdRp partial nucleotide sequences, with CLC Sequence Viewer version 7.7.1 (CLC Bio, Aarhus, Denmark). A maximum-likelihood analysis was performed. Phylogenetic trees were constructed by maximum likelihood with the software PhyML 3.1 [13]. The evolutionary model was selected by Model Generator 0.85 (GTR + I + Γ , $I = 0.10$, $\alpha = 0.71$; [14]), and nodal supports were assessed with 1000 bootstrap replicates. A Bayesian Markov Chain Monte Carlo coalescent analysis was also performed, with the program BEAST, version 1.8.4 [15], and the Shapiro-Rambaut-Drummond-2006 (SRD06) nucleotide substitution model [16]. A strict molecular clock and a constant population size were selected. The analysis was performed with a chain length of 60 million generations sampled every 1000 iterations, with first 10% trees discarded as burn-in. The maximum clade credibility tree was visualized with FigTree, version 1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

None of the 79 samples collected on Mayotte tested positive for the presence of AstV. Although this negative result may be affected by the relatively small sample size and differences in sampling protocols (swabs vs

droppings), it may also suggest temporal variation in AstVs shedding and circulation in bat populations, as previously documented [17]. Additional studies are thus needed before concluding that AstVs do not circulate in Mayotte bats.

In Mozambique, 52 of the 259 bats tested positive for the presence of AstV RdRp (mean detection rate \pm 95% confidence interval: $20.1\% \pm 4.9\%$). This detection rate was similar to other studies using the same PCR assay, including the one we reported on Malagasy bats ($22.5\% \pm 6.1\%$; [10]). For the Mozambique samples, five of the ten bat species tested positive (Table 1 and Additional file 1 for details), with significant variation between species ($\chi^2 = 104$, $P < 0.001$). A high detection rate was found in *Triaenops afer* ($68.6\% \pm 12.7\%$), as compared to other species (Table 1). Significant variation was also found between the two sampling sessions ($\chi^2 = 9$, $P < 0.005$) with a higher detection rate in May ($25.3\% \pm 6.5\%$) than in February ($10.1\% \pm 6.3\%$), in particular for *T. afer* ($\chi^2 = 13$, $P < 0.001$; $20\% \pm 24.7\%$ in February, and $80.5\% \pm 12.1\%$ in May). This variation may be associated with factors related with bat population dynamics facilitating or limiting virus transmission (e.g. population size, density, age structure, body condition [18, 19]). No significant difference was found in AstV detection rate between males and females ($\chi^2 = 0.4$, $P < 0.5$).

High genetic diversity was detected among AstVs sequences obtained from Mozambican bats (pairwise distance up to 45%), without strong support for host family or species restriction (Fig. 1 and Additional file 2 for details), as commonly described for bat AstVs [8, 10, 11, 20, 21]. Most of the detected viruses clustered in large phylogenetic lineages, in particular for *Triaenops afer* and *Hipposideros caffer*, although statistical support was limited. Sequences of AstVs detected in *Nycteris thebaica* and *Mops condylurus* were mostly highly divergent and not included in larger genetic lineages comprising viruses of same bat family or the same geographic area (Fig. 1).

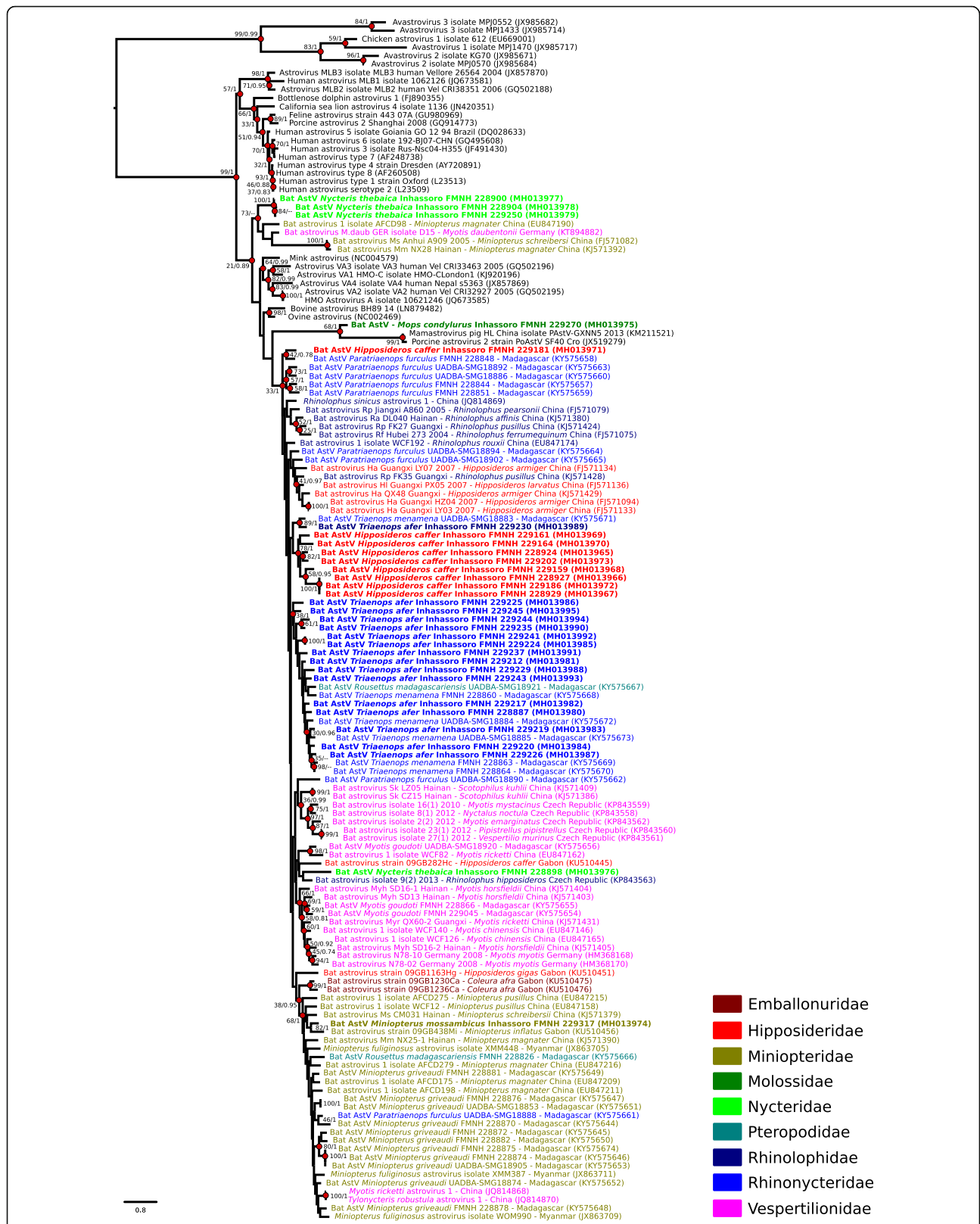


Fig. 1 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Fig. 1 Maximum Likelihood (ML) consensus tree derived from 143 Astrovirus (AstV) RNA-dependent RNA-polymerase partial nucleotide sequences (380 bp). Colored circles indicate nodes with bootstrap values > 70 in the ML tree, or posterior probabilities higher than 0.7 in the maximum clade credibility tree. Sequence names in bold indicate bat AstVs detected in this study, and were colored according to the bat family. Scale bar indicates mean number of nucleotide substitutions per site

The limited genetic information available for AstVs in public databases [1], as well as the high saturation of their genome [22], considerably affects the resolution of phylogenetic trees. Current understanding of the long-time evolutionary history of *Astroviridae* therefore remains limited. In addition, ecological factors involved in AstV infection in bats need to be better assessed. High temporal dynamics of viral infection has been documented before [17], and the risk of spillover to other hosts, including humans, has also been demonstrated to coincide with changes in bat behavior and population structure [23]. The high propensity of AstVs for host shifts highlight the need for a better assessment of zoonotic transmission risk to human populations, particularly in relationship to some unique aspects of bat immunology and ecology.

Additional files

Additional file 1: Detailed results of Astrovirus detection in samples from Mozambique. (ODS 30 kb)

Additional file 2: List of the bat families and species included in the phylogenetic tree. (PDF 44 kb)

Abbreviations

AstV: Astrovirus; PCR: Polymerase chain reaction; RdRp: RNA-dependent RNA-polymerase; VTM: Virus Transport Media

Acknowledgements

We thank Koussay Dellagi and Hervé Pascalis for the development and the management of the 'partenariat Mozambique-Réunion dans la recherche en santé: pour une approche intégrée d'étude des maladies infectieuses à risque épidémique (MoZaR)' research program.

Funding

Field research was funded by the 'Partenariat Mozambique-Réunion dans la recherche en santé: pour une approche intégrée d'étude des maladies infectieuses à risque épidémique (MoZaR)' (Fond Européen de Développement Régional, Programme Opérationnel de Coopération Territoriale) and by the 'Centre National de la Recherche Scientifique' (Projets Exploratoires Premier Soutien BATMAN). Molecular analyses were funded by tutorship institutions of the UMR PIMIT. LJ is supported by a 'Région Réunion, European Regional Development Funds (FEDER 2014-2020)' PhD fellowship. BR's post-doctoral fellowship was supported by the 'Run Emerge' European Union's Seventh Framework Program (FP7/2007-2013; Grant agreement NO 263958), the 'Fonds de Coopération Régionale, Prefecture de La Réunion' and The Field Museum of Natural History, Chicago, through the Ralph and Marian Falk Medical Research Trust. CL is supported by a 'Chaire mixte: Université de La Réunion - INSERM'. The funding agencies did not have any involvement in the study design, implementation or publishing of this study, and the research presented herein represents the opinions of the authors but not necessarily the opinions of the funding agencies.

Availability of data and materials

Sequences generated in this study have been deposited in GenBank under the accession numbers MH013965 to MH013995.

Authors' contributions

CL conceived and designed the study. EL, GLM, and BR collected biological material on Mayotte. SMG, GLM, ADS, and MCS collected biological material in Mozambique. FH and LJ performed the molecular analyses. FH and CL analyzed the data and wrote the paper. ESG and PM contributed to the project management between French and Mozambican institutions and to the first draft of the paper. All authors edited, read, and approved the final manuscript.

Ethics approval

All procedures have been evaluated and approved by an ethic committee (Agreement number A974 001; Comité d'éthique du CYROI number 114; Cyclotron Reunion Océan Indien, Sainte Clotilde, Reunion Island), and authorized by the French Ministry of Education and Research (Reference numbers 03584.01 and APAFIS#2638-2015110616208322v1). On Mayotte, research permits were issued by the 'Direction de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement' (Arrêté n°158/DEAL/SEPR/2014). In Mozambique, research permits were issued by the Museum of Natural History (Ref. 01/MHN/E.27/2015) and the Ministry of Health (N°S/N/SDI/0233/15).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Université de La Réunion, UMR Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT), INSERM 1187, CNRS 9192, IRD 249, 2 rue Maxime Rivière (GIP CYROI), 97490 Sainte-Clotilde, La Réunion, France. ²School of Life Sciences, Biological Sciences Building, University of Kwa-Zulu Natal, South Ring Road, Westville Campus, Kwa-Zulu Natal 3630, South Africa. ³Association Vahatra, BP 3972, 101 Antananarivo, Madagascar. ⁴Veterinary Faculty, Eduardo Mondlane University, Maputo, Mozambique. ⁵Field Museum of Natural History, 1400 South Lake Shore Drive, Chicago 60605, USA. ⁶Instituto Nacional de Saúde, Maputo, Mozambique. ⁷Present Address: Institut Pasteur de Madagascar, Ambatofotsikely, 101 Antananarivo, Madagascar.

Received: 8 March 2018 Accepted: 3 June 2018

Published online: 20 June 2018

References

- Mendenhall IH, Smith GJD, Dhanasekaran V. Ecological drivers of virus evolution: Astrovirus as a case study. *J Virol*. 2015;89:6978–81.
- Bosch A, Pinto RM, Guix S. Human Astroviruses. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27:1048–74.
- De Benedictis P, Schultz-Cherry S, Burnham A, Cattoli G. Astrovirus infections in humans and animals - molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infect. Genet. Evol*. 2011;11:1529–44.
- Fischer K, dos Reis VP, Balkema-buschmann A. Bat Astroviruses: towards understanding the transmission dynamics of a neglected virus family. *Viruses*. 2017;9:34.
- Chu DKW, Leung CYH, Perera HKK, Ng EM, Gilbert M, Joyner PH, et al. A novel group of avian astroviruses in wild aquatic birds. *J Virol*. 2012;86:13772–8.
- Rivera R, Nollens HH, Venn-Watson S, Gulland FMD, Wellehan JFX. Characterization of phylogenetically diverse astroviruses of marine mammals. *J Gen Virol*. 2010;91:166–73.

7. Karlsson EA, Small CT, Freiden P, Feeroz MM, Matsen FA, San S, et al. Non-human primates harbor diverse mammalian and avian Astroviruses including those associated with human infections. *PLoS Pathog.* 2015;11: e1005225.
8. Rougeron V, Suquet E, Maganda GD, Jiolle D, Mombo IM, Bourgarel M, et al. Characterization and phylogenetic analysis of new bat astroviruses detected in Gabon, Central Africa. *Acta Virol.* 2016;60:386–92.
9. Waruhiu C, Ommeh S, Obanda V, Agwanda B, Gakuya F, Ge XY, et al. Molecular detection of viruses in Kenyan bats and discovery of novel astroviruses, caliciviruses and rotaviruses. *Virol Sin.* 2017;32:101–14.
10. Lebarbenchon C, Ramasindrazana B, Joffrin L, Bos S, Lagadec E, Le MG, et al. Astroviruses in bats, Madagascar. *Emerg Microbes Infect.* 2017;6:e58.
11. Chu DKW, Poon LLM, Guan Y, Peiris JSM. Novel astroviruses in insectivorous bats. *J Virol.* 2008;82:9107–14.
12. R Core Team R. A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2015.
13. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol.* 2010;59:307–21.
14. Keane TM, Creevey CJ, Pentony MM, Naughton TJ, McInerney JO. Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol Biol.* 2006;6:29.
15. Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol.* 2007;7:214.
16. Shapiro B, Rambaut A, Drummond AJ. Choosing appropriate substitution models for the phylogenetic analysis of protein-coding sequences. *Mol. Biol. Evol.* 2006;23:7–9.
17. Drexler JF, Corman VM, Wegner T, Tateno AF, Zerbinati RM, Gloza-Rausch F, et al. Amplification of emerging viruses in a bat colony. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:449–56.
18. Seltmann A, Corman V, Rasche A, Drosten C, Czihak G, Bernard H, et al. Seasonal fluctuations of Astrovirus, but not coronavirus shedding in bats inhabiting human-modified tropical forests. *EcoHealth.* 2017;14:272–84.
19. Mendenhall IH, Skiles MM, Neves ES, Borthwick SA, Low DHW, Liang B, et al. Influence of age and body condition on astrovirus infection of bats in Singapore: an evolutionary and epidemiological analysis. *One Heal.* 2017;4: 27–33.
20. Kemenesi G, Dallos B, Gorfal T, Boldogh S, Estok P, Kurucz K, et al. Molecular survey of RNA viruses in hungarian bats: discovering novel astroviruses, coronaviruses, and caliciviruses. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2014;14:846–55.
21. Lacroix A, Duong V, Hul V, San S, Davun H, Omaliss K, et al. Diversity of bat astroviruses in Lao PDR and Cambodia. *Infect. Genet. Evol.* 2017;47:41–50.
22. Lukashov VV, Goudsmit J. Evolutionary relationships among Astroviridae. *J. Gen. Virol.* 2002;83:1397–405.
23. Plowright RK, Foley P, Field HE, Dobson AP, Foley JE, Eby P, et al. Urban habituation, ecological connectivity and epidemic dampening: the emergence of Hendra virus from flying foxes (*Pteropus* spp.). *Proc Biol Sci.* 2011;278:3703–12.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



1 **Astrovirus in Reunion Free-tailed Bat (*Mormopterus francoismoutoui*)**

2

3 Léa Joffrin, Axel O. G. Hoarau, Erwan Lagadec, Patrick Mavingui, Camille Lebarbenchon*

4

5 Université de La Réunion, UMR Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT),
6 INSERM 1187, CNRS 9192, IRD 249, GIP CYROI, 2 rue Maxime Rivière, Saint Denis, La
7 Réunion, France.

8

9 * camille.lebarbenchon@univ-reunion.fr

10 **Abstract**

11 Astroviruses (AstVs) are RNA viruses responsible for infection of a large diversity of avian and
12 mammalian species, including bats, livestock, and humans. We investigated AstV infection in a
13 free-tailed bat species, *Mormopterus francoismoutoui*, endemic to Reunion Island. A total of 190
14 guano samples were collected in a maternity colony during 19 different sampling sessions, between
15 June 2016 and June 2017. Biological material was tested for the presence of the AstV RNA-
16 dependent RNA-polymerase (RdRp) gene with a pan-AstV semi-nested polymerase chain reaction
17 assay. In total, 15 guano samples (7.9%) tested positive, with high genetic diversity of the partial
18 RdRp gene sequences among positive samples. A phylogenetic analysis further revealed that the
19 detected viruses were genetically related to AstVs reported in reptiles, dogs, and pigs, but did not
20 cluster with AstVs commonly found in bats. Although more investigation need to be conducted to
21 assess the level of infected bats in the studied population, our findings suggest that Reunion free-
22 tailed bats are exposed to AstV, and that cross-species transmission may occur with other hosts
23 sharing the same habitat.

12 **Introduction**

13

14 Astroviruses (AstVs) are positive-sense single-stranded RNA viruses and have been detected in a
15 large diversity of mammalian and avian species (De Benedictis, Schultz-Cherry, Burnham, &
16 Cattoli, 2011). In humans, eight serotypes have been described worldwide, accounting for 2%–9%
17 of all acute non-bacterial gastro-enteritis cases in children (Bosch, Pinto, & Guix, 2014). AstVs are
18 also responsible for diseases in livestock, poultry and domestic pets (De Benedictis et al., 2011). In
19 wild animals, they have been mostly described in bats (Fischer, dos Reis, & Balkema-Buschmann,
20 2017) and in aquatic birds (Chu et al., 2012), although detection in other hosts has been reported,
21 such as in marine mammals (Rivera, Nollens, Venn-Watson, Gulland, & Wellehan, 2010) and non-
22 human primates (Karlsson et al., 2015). In addition to this large host diversity, the evolutionary
23 history of AstVs is characterized by frequent cross-species transmission events (Mendenhall, Smith,
24 & Dhanasekaran, 2015), supporting limited host specificity and a risk of spillover and emergence in
25 humans (Bosch et al., 2014).

26

27 AstVs have been reported in African insectivorous bats, in particular in species of the Miniopteridae
28 and Rhinonycteridae families (Hoarau et al., 2018; Rougeron et al., 2016; Waruhiu et al., 2017;
29 Yinda et al., 2018). Detection rates varies greatly depending on the study design and the tested
30 species (Fischer et al., 2017), and the prevalence of individual shedding AstVs within bat
31 populations is also highly variable. For instance, we estimated prevalence of shedding bats ranging
32 from 20% to 81% in *Triaenops afer* in Mozambique, depending on the time of sample collection
33 (Hoarau et al., 2018). Such a strong seasonality has been reported in both tropical and temperate
34 regions and could be associated to bat population dynamics, in particular in maternity colonies (*e.g.*
35 increase in the population size and density during the formation of the colony (Drexler et al., 2011).
36 Body condition and co-infection with other viruses have also been identified as risk factors for AstV
37 infection in bats (Mendenhall et al., 2017; Selmann et al., 2017).

38

39 The islands of the Western Indian Ocean host eleven of the eighteen bat families described
40 worldwide, with a highly contrasted diversity pattern between islands. Madagascar shelters over 46
41 bat species, of which nearly 80% are endemic. In contrast, the small oceanic islands surrounding
42 Madagascar are inhabited by a limited number of bat species. For instance, only three species are
43 present on Reunion Island and only one of them, the Reunion free-tailed bat (RFTB; *Mormopterus*
44 *francoismoutoui*; Molossidae), is endemic to the island.

45

46 RFTB is also the most abundant bat species on Reunion Island. This small insectivorous species
47 roost in large colonies in natural caves and synanthropic habitats such as bridges and houses
48 (Goodman et al., 2008). Based on guano sampling in a RFTB maternity colony, we investigated the
49 temporal variation in AstV shedding during 13 consecutive months, with a particular emphasis on
50 the parturition period. Partial sequencing of the AstV RNA-dependent RNA-polymerase (RdRp)
51 gene and phylogenetic analyses were performed to assess the diversity and the origin of the detected
52 viruses.

53

54 **Material and methods**

55

56 The study was conducted in the main RFTB colony known to date on Reunion island, a natural cave
57 (30 m³) in the West coast of the island (21,111°S, 55,259°E). The colony is monospecific and
58 mostly composed of adult females during the early stages of the breeding season (October to
59 December), and of newborns and juveniles, after the parturition period, from mid-December to mid-
60 January onward (Dietrich et al., 2015). Between 40 000 and 50 000 flying adult bats have been
61 estimated before parturition; however, after the breeding season, the cave remains totally empty
62 from bats (between May and September) (Dietrich et al., 2015).

63

64 A non-invasive sampling strategy was setup to avoid direct manipulation of bats and to limit colony
65 disturbance. During each sampling session, we collected guano samples in the narrowest part of the
66 cave entrance, in ten different points separated by 50 cm along a 4.5 m transect (Supplementary
67 Figures 1 and 2). Sterile open-ended 2 mL syringes were used to collect a core sample, in order to
68 obtain *c.* 130 mg of guano. Each guano sample was immediately mixed in 1.5 mL of Virus
69 Transport Media (VTM; *e.g.* Lebarbenchon et al., 2017). Samples were maintained in a cooler with
70 ice packs in the field and stored in a -80°C freezer within two hours.

71

72 In total, 190 samples were collected during 19 different sampling sessions between June 21st 2016,
73 and June 29th 2017. During each sampling session, the colony was visually monitored in order to
74 estimate the relative population size (*i.e.* no bat, less than half of the cave covered with bats, more
75 than half of the cave covered), and to assess the population age structure and timing of parturition
76 based on the presence of adults, newborns, and juveniles.

77

78 Samples were mixed and centrifuged at 1 500 g for 15 min. RNA extraction was performed on 140
79 µL of supernatant, with the QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA). Reverse-

80 transcription was done on 10 μ L of RNA using the ProtoScript II Reverse Transcriptase and
81 Random Primer 6 (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) following a previously published
82 protocol (Lebarbenchon et al., 2017). cDNAs were tested for the presence of the AstV RdRp gene
83 using a pan-AstV semi-nested polymerase chain reaction (PCR) assay (Chu, Poon, Guan, & Peiris,
84 2008). PCR products of the expected size were submitted for direct Sanger sequencing
85 (Genoscreen, Lille, France). Chi-square tests were conducted to investigate the effects of the
86 sampling date and of the sampling location in the transect, on the probability of successful detection
87 of AstV RdRp gene. Statistical analyses were conducted with R 3.4.4 (R Core Team, 2018).

88

89 A phylogenetic analysis was performed on the RdRp gene sequences obtained in this study
90 (GenBank accession numbers MK966904 to MK966918) and 79 reference RdRp sequences of
91 AstVs detected in a large diversity of bat species, in particular from Africa (Madagascar,
92 Mozambique, Gabon), as well as in other type of hosts (*e.g.* avian, human, livestock). Sequences
93 were aligned with CLC Sequence Viewer 8.0 (CLC Bio, Aarhus, Denmark). A maximum-likelihood
94 analysis was done with the software PhyML 3.1 (Guindon et al., 2010), with an evolutionary model
95 selected by Model Generator 0.85 (GTR + I + Γ ; I = 0.14, α = 0.83; (Keane, Creevey, Pentony,
96 Naughton, & McInerney, 2006), and 1 000 bootstraps.

97

98 **Results and discussion**

99

100 In total, 15 guano samples (7.9 %) tested positive for the presence of AstVs, without difference
101 between sampling location along the transect ($\chi^2 = 10.5$; $P = 0.31$). Significant differences in the
102 number of positive samples between sampling dates were detected ($\chi^2 = 46.7$; $P < 0.001$), with
103 AstVs mostly detected after the parturition period (late December), in February and March, when
104 the cave was occupied by juveniles (Figure 1). This pattern suggests a potential effect of the
105 population age structure (Mendenhall et al., 2017) rather than changes in size and density associated
106 to the formation of the colony (Drexler et al., 2011). A previous investigation on paramyxovirus and
107 *Leptospira* infection dynamics in the same bat colony revealed two peaks of infection: one during
108 the colony formation and the other two months after the birth pulse (Dietrich et al., 2015). The
109 second peak may coincide with the detection of most AstVs in February and March, and the first
110 one with the three positive samples detected during our two sampling session in December.
111 Although these results provide support for AstV RNA in the RFTB environment, our sampling
112 design precludes further conclusion on the prevalence of shedding bats in the population. Bat

113 individual sampling is needed to further support AstV infection in RFTB and identify population-
114 related factors involved in the temporal and spatial transmission dynamics of AstVs.

115

116

117

118

119

120

121

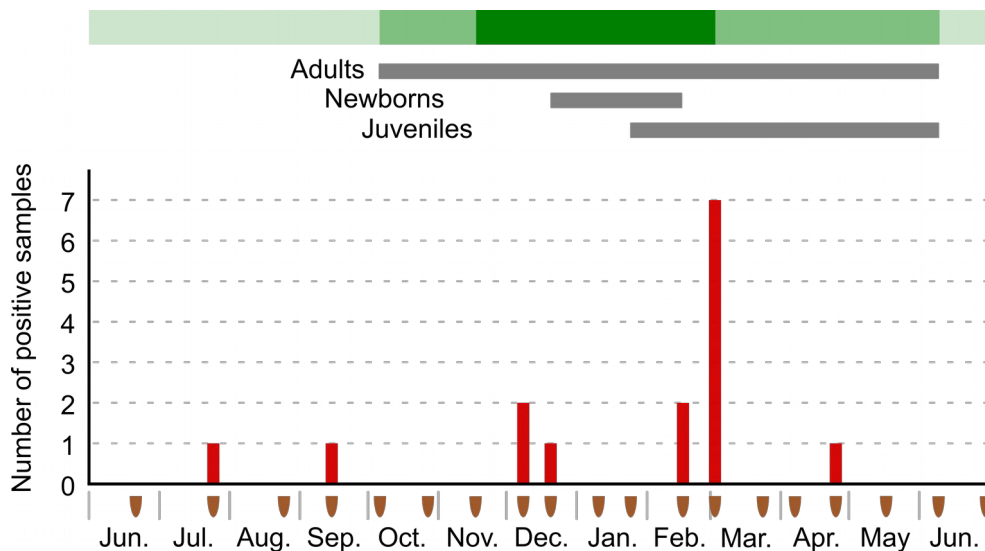
122

123

124

125

126



127 **Figure 1.** Number of Astrovirus positive guano samples as per sampling session (brown marks). Green shading
128 indicates the relative bat population size: light green: no bat inside the cave, mid-green: less than half of the cave
129 covered with bats, dark green: more than half of the cave covered with bats. Presence of adults, newborns, and juveniles
130 bats is represented by gray bars.

131

132 Two samples collected before the breeding season (in July and September), when the cave was free
133 of bats, also tested positive for AstV, and suggest a possible environmental persistence of AstV
134 RNA in bat guano. AstV persistence in the environment could potentially favor bat infection during
135 cave colonization at the beginning of the breeding season, but also create opportunity for virus
136 spillover to other hosts. Rats (*Rattus rattus*) have been sighted in and around the cave during the
137 study period, and previous studies have shown that paramyxoviruses may be transmitted between
138 rats and RFTB in the studied colony (Dietrich et al., 2015). Bat guano is also used as a fertilizer for
139 agricultural crops, worldwide, and is regularly harvested on a small scale by local farmer for
140 personal use (Mildenstein & de Jong, 2011). At our study site, bat guano was indeed harvested in
141 the cave entrance throughout the course of the breeding season. The detection of viral RNA do not
142 provide evidence of the maintenance of infectious particles in bat guano and virus isolation would
143 be required to experimentally assess the infectious ability of bat AstVs outside their hosts. However,
144 transmission routes of bat viruses to humans often remain unknown (Joffrin, Dietrich, Mavingui, &
145 Lebarbenchon, 2018) and given the high propensity of AstVs for cross-species transmission

146 (Mendenhall et al., 2015) our finding underlines that the risk of AstV spillover from bats to human
147 should be fully investigated.

148

149 Analysis of the 15 RdRp partial sequences revealed a high genetic diversity (up to 49% of partial
150 RdRp sequence differences). This finding is consistent with previous studies performed in
151 Madagascar (Lebarbenchon et al., 2017), continental Africa (Hoarau et al., 2018; Rougeron et al.,
152 2016; Waruhiu et al., 2017; Yinda et al., 2018), and other bat populations, worldwide. Such a high
153 level of sequence diversity in a single bat species is nevertheless surprising and higher than
154 sequence diversity measured for paramyxovirus and *Leptospira* in the same colony (Dietrich et al.,
155 2015). Current classification of AstV based on host species origin has been largely challenged for
156 the past years (Donato & Vijaykrishna, 2017). First, because AstVs isolated from different animal
157 species can be genetically similar (Hoarau et al., 2018; Lebarbenchon et al., 2017; Waruhiu et al.,
158 2017), but also because genetically different viruses can be isolated from a single species (Waruhiu
159 et al., 2017; Yi et al., 2018). To improve classification of AstV, the International Committee on
160 Taxonomy of Virus now recommends to compare AstV RdRp gene to capsid gene sequences (Bosch
161 et al., 2011).

162

163 The phylogenetic analysis further revealed that the detected viruses were genetically related to
164 AstVs found in reptiles, dogs, and pigs, but did not cluster in a single bat AstVs clade (Figure 2).
165 This result could reflect the limited number of AstV nucleotide sequences available from Molossid
166 bats in public database and, more broadly, from bats in tropical areas. Because our study was based
167 on environmental sampling, however, we cannot exclude that the detected viruses came from other
168 hosts than RFTB. As previously mentioned, rats, but also feral dogs (*Canis lupus familiaris*), and
169 zebu (*Bos taurus indicus*), have been regularly sighted close to the cave entrance. Avian species
170 such as house sparrow (*Passer domesticus*), Madagascar turtle-dove (*Nesoenas picturatus*), and
171 common myna (*Acridotheres tristis*) have also been observed near to the cave, and can be in direct
172 contact with bat guano. Further investigations involving the sampling of individual bats and other
173 host species in the cave surroundings, as well as sequencing of the AstV capsid gene, could provide
174 information on the level of potential cross-species transmission in this ecosystem.



176 **Figure 2.** Maximum likelihood consensus tree derived from 94 Astrovirus (AstV) RNA-dependent RNA-polymerase
 177 partial nucleotide sequences (393 bp). Black dots indicate nodes with bootstrap values higher than 50. Red: sequences
 178 generated in this study. Scale bar: mean number of nucleotide substitutions per site.

179 **Conflicts of interests**

180

181 The authors have no conflict of interests.

182

183 **Acknowledgments**

184

185 We thank Muriel Dietrich and Nicolas Diotel for their assistance in the field. Léa Joffrin is
186 supported by a “Région Réunion, European Regional Development Funds (FEDER 2014-2020)”
187 PhD fellowship, Axel Hoarau by a “Ministère de l’Enseignement supérieur, de la Recherche et de
188 l’Innovation” PhD fellowship, and Camille Lebarbenchon by a “Chaire Mixte Institut National de la
189 Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) – Université de La Réunion”.

190 **References**

191

192 Bosch, A., Guix, S., Krishna, N. K., Méndez, E., Monroe, S. S., Pantin-Jackwood, M., & Schultz-
193 Cherry, S. (2011). Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy
194 of Viruses. In A. M. Q. King, E. Lefkowitz, M. J. Adams, & E. Carstens (Eds.), *Virus*
195 *Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego:
196 Elsevier.

197 Bosch, A., Pinto, R. M., & Guix, S. (2014). Human Astroviruses. *Clinical Microbiology Reviews*,
198 27(4), 1048–1074.

199 Chu, D. K. W., Leung, C. Y. H., Perera, H. K. K., Ng, E. M., Gilbert, M., Joyner, P. H., ... Poon, L.
200 L. M. (2012). A novel group of avian astroviruses in wild aquatic birds. *Journal of Virology*,
201 86(24), 13772–13778.

202 Chu, D. K. W., Poon, L. L. M., Guan, Y., & Peiris, J. S. M. (2008). Novel astroviruses in
203 insectivorous bats. *Journal of Virology*, 82(18), 9107–9114.

204 De Benedictis, P., Schultz-Cherry, S., Burnham, A., & Cattoli, G. (2011). Astrovirus infections in
205 humans and animals - molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions.
206 *Infection, Genetics and Evolution*, 11(7), 1529–1544.

207 Dietrich, M., Wilkinson, D. A., Benlali, A., Lagadec, E., Ramasindrazana, B., Dellagi, K., &
208 Tortosa, P. (2015). Leptospira and paramyxovirus infection dynamics in a bat maternity
209 enlightens pathogen maintenance in wildlife. *Environmental Microbiology*, 17(11), 4280–4289.

210 Donato, C., & Vijaykrishna, D. (2017). The broad host range and genetic diversity of mammalian
211 and avian astroviruses. *Viruses*, 9(5), 1–18.

212 Drexler, J. F., Corman, V. M., Wegner, T., Tateno, A. F., Zerbinati, R. M., Gloza-Rausch, F., ...
213 Drosten, C. (2011). Amplification of emerging viruses in a bat colony. *Emerging Infectious*
214 *Diseases*, 17(3), 449–456.

215 Fischer, K., dos Reis, V. P., & Balkema-buschmann, A. (2017). Bat Astroviruses: towards
216 understanding the transmission dynamics of a neglected virus family. *Viruses*, 9, 34.

217 Goodman, S. M., Jansen van Vuuren, B., Ratrimomanarivo, F., Probst, J., Bowie, R., Group, E. G.,
218 & Re, L. (2008). Specific status of populations in the mascarene islands referred to
219 *Mormopterus acetabulosus* (chiroptera: molossidae), with description of a new species.
220 *Journal of Mammalogy*, 89(5), 1316–1327.

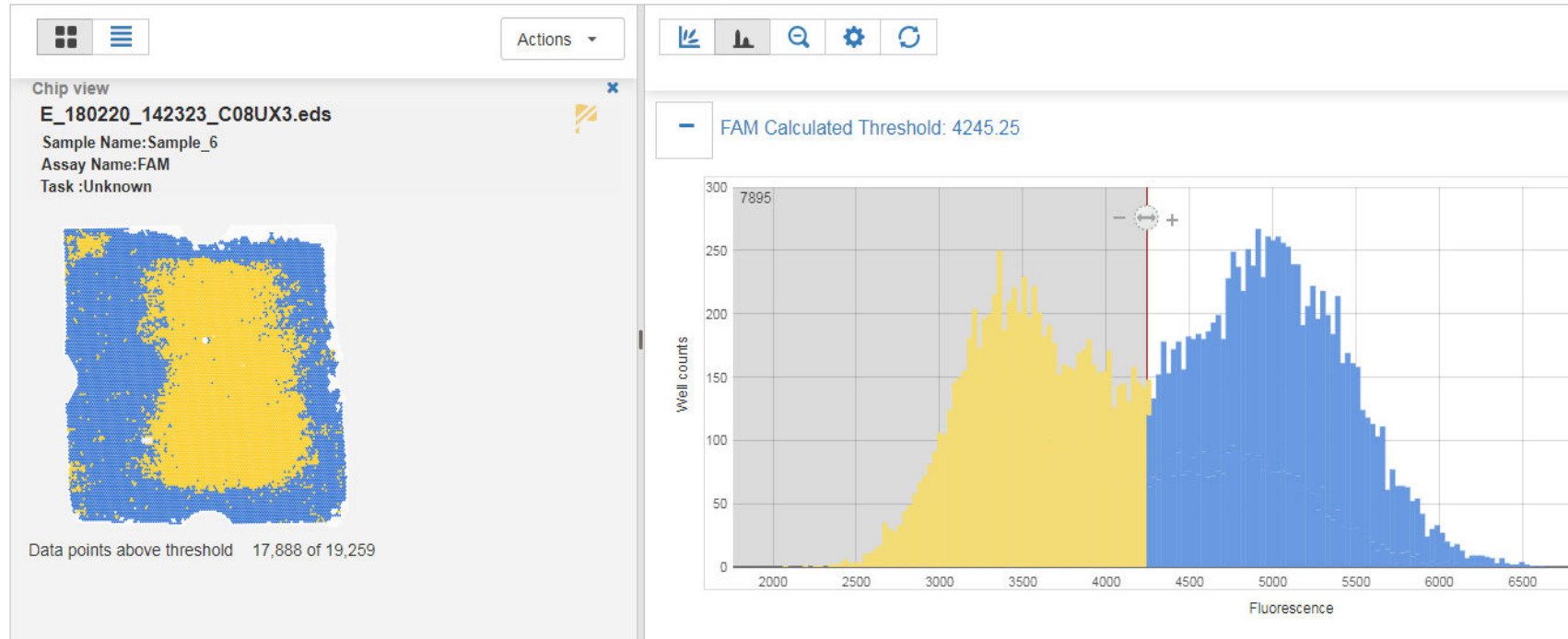
- 221 Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., ... Gascuel, O.
222 (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing
223 the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307–21.
- 224 Hoarau, F., Le Minter, G., Joffrin, L., Schoeman, M. C., Lagadec, E., Ramasindrazana, B., ...
225 Lebarbenchon, C. (2018). Bat astrovirus in Mozambique. *Virology Journal*, 15(1), 1–5.
- 226 Joffrin, L., Dietrich, M., Mavingui, P., & Lebarbenchon, C. (2018). Bat pathogens hit the road: But
227 which one? *PLOS Pathogens*, 14(8), e1007134.
- 228 Karlsson, E. A., Small, C. T., Freiden, P., Feeroz, M. M., Matsen, F. A., San, S., ... Schultz-Cherry,
229 S. (2015). Non-human primates harbor diverse mammalian and avian astroviruses including
230 those associated with human infections. *PLoS Pathogens*, 11(11), e1005225.
- 231 Keane, T. M., Creevey, C. J., Pentony, M. M., Naughton, T. J., & McInerney, J. O. (2006).
232 Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows
233 that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evolutionary Biology*, 6,
234 29.
- 235 Lebarbenchon, C., Ramasindrazana, B., Joffrin, L., Bos, S., Lagadec, E., Le Minter, G., ...
236 Mavingui, P. (2017). Astroviruses in bats, Madagascar. *Emerging Microbes & Infections*, 6,
237 e58.
- 238 Mendenhall, I. H., Skiles, M. M., Neves, E. S., Borthwick, S. A., Low, D. H. W., Liang, B., ...
239 Smith, G. J. D. (2017). Influence of age and body condition on astrovirus infection of bats in
240 Singapore: An evolutionary and epidemiological analysis. *One Health*, 4, 27–33.
- 241 Mendenhall, I. H., Smith, G. J. D., & Dhanasekaran, V. (2015). Ecological drivers of virus
242 evolution: Astrovirus as a case study. *Journal of Virology*, 89(14), 6978–6981.
- 243 Mildenstein, T., & de Jong, C. (2011). Natural history, ecological and socio-economic value of bats.
244 In S. H. Newman, H. Field, J. Epstein, & C. de Jong (Eds.), *Investigating the role of bats in*
245 *emerging zoonoses* (FAO Animal, pp. 15–28). Rome: Food and Agriculture Organisation of the
246 United Nations.
- 247 R Core Team. (2018). R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for*
248 *Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

- 249 Rivera, R., Nollens, H. H., Venn-Watson, S., Gulland, F. M. D., & Wellehan, J. F. X. (2010).
250 Characterization of phylogenetically diverse astroviruses of marine mammals. *Journal of*
251 *General Virology*, 91(1), 166–173.
- 252 Rougeron, V., Suquet, E., Maganda, G. D., Jiolle, D., Mombo, I. M., Bourgarel, M., ... Leroy, E. M.
253 (2016). Characterization and phylogenetic analysis of new bat astroviruses detected in Gabon,
254 Central Africa. *Acta Virologica*, 60, 386–392.
- 255 Seltmann, A., Corman, V., Rasche, A., Drosten, C., Czirjak, G., Bernard, H., ... Voigt, C. (2017).
256 Seasonal fluctuations of astrovirus, but not coronavirus shedding in bats inhabiting human-
257 modified tropical forests. *Ecohealth*, 14, 272–284.
- 258 Waruhiu, C., Ommeh, S., Obanda, V., Agwanda, B., Gakuya, F., Ge, X. Y., ... Shi, Z. L. (2017).
259 Molecular detection of viruses in Kenyan bats and discovery of novel astroviruses,
260 caliciviruses and rotaviruses. *Virologica Sinica*, 32(2), 101–114.
- 261 Yi, S., Niu, J., Wang, H., Dong, G., Guo, Y., Dong, H., ... Hu, G. (2018). Molecular
262 characterization of feline astrovirus in domestic cats from Northeast China. *PLOS ONE*,
263 13(10), e0205441.
- 264 Yinda, C. K., Ghogomu, S. M., Conceição-Neto, N., Beller, L., Deboutte, W., Vanhulle, E., ...
265 Matthijnsens, J. (2018). Cameroonian fruit bats harbor divergent viruses, including rotavirus
266 H, bastroviruses, and picobirnaviruses using an alternative genetic code. *Virus Evolution*, 4(1),
267 1–15.

Annexe 5. Exemple de sortie du logiciel QuantStudio 3D AnalysisSuite® Cloud (ThermoFisher) pour l'analyse des puces de PCR digitale. En jaune les puits sans fluorescence détectée, et en bleu les puits avec fluorescence (sonde FAM).

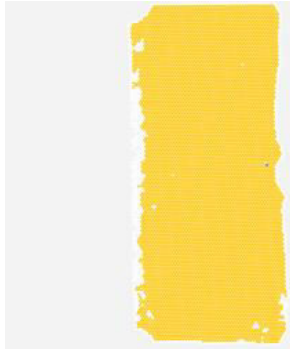
Assay	Target	Sample	Chip	Copies/Rxn	CI Copies/Rxn	Copies/ μ L	CI Copies/ μ L	# of Neg	# qualified by QT	# of Filled	Run Date
FAM	FAM	Sample_6	E_180220_142323_C08UX3.eds	0.822	0.805 -- 0.839	1088.6	1066.8 -- 1110.9	7895	17888	19259	Feb 20, 2018 18:23

Review Quality and Calls Double click a chip to view and adjust the quality threshold until you have an acceptable balance of data quantity and quality.

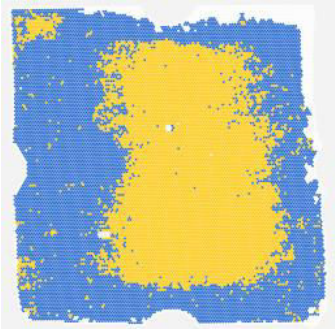


Dans cet exemple de puce, les résultats quantitatifs semblent indiquer que la quantification absolue est interprétable, avec 19 259 puits remplis sur 20 000 puits (« # of Filled »), 17 888 puits sur 20 000 puits exploitables (« # qualified by QT »), et un nombre de copies par microlitre compris dans la gamme de 200 copies/ μ L à 2000 copies/ μ L recommandée par le fabricant ThermoFisher (« Copies/ μ L »). De plus, l'observation de la distribution de la fluorescence en bas à droite se rapproche d'une distribution bimodale de la fluorescence. Cependant, l'observation de la puce (« Chip view ») en bas à gauche montre une répartition spatiale non homogène de la fluorescence, avec une large zone sans fluorescence. Ce résultat suggère alors une anomalie. En effet, lors du dépôt du liquide d'immersion, le manipulateur a effleuré la matrice de la puce en son centre, et ce minime impact a suffi à provoquer cette anomalie de répartition.

Annexe 6. Exemples d'anomalies observées pendant les essais de PCR digitale.



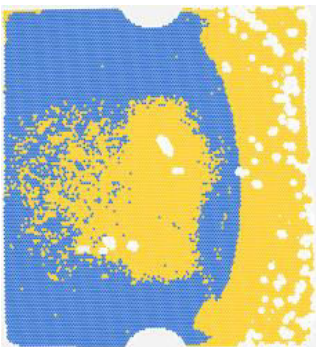
Exemple 1 : anomalie causée par une mauvaise disposition de la lame de chargement ou par un dépôt non homogène du mix PCR sur la lame de chargement par le manipulateur. Ici, le mix PCR n'a été déposé que sur un côté de la puce.



Exemple 2 : anomalie causée par un impact de pipette du manipulateur au centre de la puce lors du dépôt du liquide d'immersion.



Exemple 3 : anomalie causée à priori par l'évaporation du mix PCR dans certain puits et due vraisemblablement à un manque de liquide d'immersion lors du dépôt du liquide d'immersion soit avant avoir sceller la puce, soit lors du remplissage après que la puce ait été scellée.



Exemple 4 : puce combinant plusieurs anomalies (au moins impact de pipette et évaporation).

LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussigné(e) Léa JOFFRIN en ma qualité de doctorant(e) de l'Université de La Réunion, déclare être conscient(e) que le plagiat est un acte délictueux passible de sanctions disciplinaires. Aussi, dans le respect de la propriété intellectuelle et du droit d'auteur, je m'engage à systématiquement citer mes sources, quelle qu'en soit la forme (textes, images, audiovisuel, internet), dans le cadre de la rédaction de ma thèse et de toute autre production scientifique, sachant que l'établissement est susceptible de soumettre le texte de ma thèse à un logiciel anti-plagiat.

Fait à Saint-Denis le : 31/10/2019

Signature :



Extrait du Règlement intérieur de l'Université de La Réunion
(validé par le Conseil d'Administration en date du 11 décembre 2014)

Article 9. Protection de la propriété intellectuelle – Faux et usage de faux, contrefaçon, plagiat

L'utilisation des ressources informatiques de l'Université implique le respect de ses droits de propriété intellectuelle ainsi que ceux de ses partenaires et plus généralement, de tous tiers titulaires de ces droits.

En conséquence, chaque utilisateur doit :

- utiliser les logiciels dans les conditions de licences souscrites ;
- ne pas reproduire, copier, diffuser, modifier ou utiliser des logiciels, bases de données, pages Web, textes, images, photographies ou autres créations protégées par le droit d'auteur ou un droit privatif, sans avoir obtenu préalablement l'autorisation des titulaires de ces droits.

La contrefaçon et le faux

Conformément aux dispositions du code de la propriété intellectuelle, toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle d'une œuvre de l'esprit faite sans le consentement de son auteur est illicite et constitue un délit pénal.

L'article 444-1 du code pénal dispose : « Constitue un faux toute altération frauduleuse de la vérité, de nature à causer un préjudice et accomplie par quelque moyen que ce soit, dans un écrit ou tout autre support d'expression de la pensée qui a pour objet ou qui peut avoir pour effet d'établir la preuve d'un droit ou d'un fait ayant des conséquences juridiques ».

L'article L335_3 du code de la propriété intellectuelle précise que : « Est également un délit de contrefaçon toute reproduction, représentation ou diffusion, par quelque moyen que ce soit, d'une œuvre de l'esprit en violation des droits de l'auteur, tels qu'ils sont définis et réglementés par la loi. Est également un délit de contrefaçon la violation de l'un des droits de l'auteur d'un logiciel (...) ».

Le plagiat est constitué par la copie, totale ou partielle d'un travail réalisé par autrui, lorsque la source empruntée n'est pas citée, quel que soit le moyen utilisé. Le plagiat constitue une violation du droit d'auteur (au sens des articles L 335-2 et L 335-3 du code de la propriété intellectuelle). Il peut être assimilé à un délit de contrefaçon. C'est aussi une faute disciplinaire, susceptible d'entraîner une sanction.

Les sources et les références utilisées dans le cadre des travaux (préparations, devoirs, mémoires, thèses, rapports de stage...) doivent être clairement citées. Des citations intégrales peuvent figurer dans les documents rendus, si elles sont assorties de leur référence (nom d'auteur, publication, date, éditeur...) et identifiées comme telles par des guillemets ou des italiques.

Les délits de contrefaçon, de plagiat et d'usage de faux peuvent donner lieu à une sanction disciplinaire indépendante de la mise en œuvre de poursuites pénales.