



HAL
open science

Dynamiques de co-infections virales chez les chauves-souris du sud-ouest de l'océan Indien

Axel Hoarau

► **To cite this version:**

Axel Hoarau. Dynamiques de co-infections virales chez les chauves-souris du sud-ouest de l'océan Indien. Biologie animale. Université de la Réunion, 2022. Français. NNT : 2022LARE0012 . tel-04136998

HAL Id: tel-04136998

<https://theses.hal.science/tel-04136998v1>

Submitted on 22 Jun 2023

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

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

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

**Dynamiques de co-infections virales chez les
chauves-souris du sud-ouest de l'océan Indien**

Présentée et soutenue publiquement par

Axel HOARAU

Le 21 juin 2022, devant le jury composé de :

| | | |
|---------------------------------|--|------------------------------------|
| Dr. Nathalie CHARBONNEL | Directrice de recherche, INRA, Montpellier | Rapporteur |
| Dr. Philippe CHRISTE | Professeur agrégé, Université de Lausanne | Rapporteur et Président du jury |
| Dr. Julien CAPPELLE | Chercheur, CIRAD, Montpellier | Examineur |
| Dr. Virginie ROUGERON | Chargée de Recherche, CNRS, Montpellier | 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 :

Unité Mixte de Recherche, Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (UMR PIMIT), Université de La Réunion, Inserm 1187, CNRS 9192, IRD 249.

Avant-propos :

Cette thèse a été réalisée au sein de l'École Doctorale Sciences Technologies Santé de l'Université de La Réunion (ED542) et a été financée par un contrat doctoral. Les travaux de cette thèse ont été menés au sein de l'Unité Mixte de Recherche Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (UMR PIMIT ; Université de La Réunion, Inserm 1187, CNRS 9192, IRD 249) dirigée par le Dr. Patrick MAVINGUI. Les recherches ont été financées par le programme de Fonds Européens de Développement Régional FEDER INTERREG V Océan Indien « VIROPTERE » et par les tutelles de l'UMR PIMIT.



Remerciements

« LA THÈSE », si un jour on m'avait dit que je me lancerai dans cette aventure folle... Moi qui m'étais destiné à faire des études courtes on peut voir que les plans ont... comment dire... légèrement changés. Ces quatre années ont été palpitantes. Elles m'ont fait grandir sur le plan scientifique et sur le plan personnel. Elles m'ont fait vibrer, aiguïser ma curiosité, et m'ont fait porter un regard différent sur le monde. Néanmoins, à ce jour, il m'est impossible de m'imaginer faire ce parcours seul. Je pense qu'il faudrait même être insensé pour ne serait-ce que l'envisager. La thèse, c'est avant tout une histoire d'accompagnement. Je pense bien entendu aux directeurs, aux collègues, mais aussi aux amis, à la famille sans qui tout serait bien plus difficile. Car, avouons-le, la thèse c'est des hauts et des bas, des élans d'euphorie, et souvent aussi des coups de mou. Mais à mes yeux la thèse reste un moment précieux, une aventure singulière et je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui y ont contribué de près ou de loin.

Tout d'abord, je souhaiterais remercier chaleureusement les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux. Merci au Dr. Julien CAPPELLE, au Dr. Nathalie CHARBONNEL, au Dr. Philippe CHRISTE et au Dr. Virginie ROUGERON.

Ensuite, mes pensées vont bien évidemment à mes directeurs, les Dr. Patrick MAVINGUI et Camille LEBARBENCHON qui m'ont fait confiance dès le début de cette aventure, et sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Merci pour votre patience et votre pédagogie. Je tenais aussi particulièrement à vous remercier pour votre disponibilité et votre écoute. J'ai toujours trouvé une oreille attentive à chaque fois que je suis venu toquer à vos portes, et ce, même si vous étiez très occupés. Vous avez toujours été d'un soutien sans failles quelques soient les démarches et problèmes évoqués. Vous m'avez toujours accompagné au front, vous m'avez guidé. Vous m'avez également permis de m'épanouir dans mon travail mais aussi dans mon bien être personnel. Vous m'avez transmis de nombreuses valeurs qui je pense sont essentielles dans le métier que nous exerçons. Vous avez bien souvent plus cru en moi que je n'ai pu le faire moi-même. Vous êtes des chercheurs que j'admire énormément et vous possédez des qualités humaines rares. Je vous suis infiniment reconnaissant.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de suivi de thèse, les Dr. Muriel DIETRICH, Steve GOODMAN et Benjamin ROCHE, qui m'ont également accompagné durant ces années et qui m'ont prodigué de précieux conseils.

Spécifiquement, merci à Muriel pour m'avoir donné l'opportunité de participer aux missions de terrain et aux captures de chauves-souris. J'ai beaucoup appris à tes côtés. Tu m'as permis d'avoir une vision éthique des études de terrain. Les nuits passées dans le noir à guetter nos amis les Petits Molosses resteront pour moi de très bons souvenirs. Je me suis régalé. Merci également pour tous les échanges que nous avons pu avoir, pour l'aide que tu as pu m'apporter en statistiques, en phylogénie, ou pour les conseils que tu as pu me donner pour faire avancer mes travaux. Une pensée et une petite caresse aussi pour les chachats qui m'ont gâté par leurs ronrons et leurs câlins réconfortants.

Merci à Steve GOODMAN pour les échanges que nous avons pu avoir au cours de ces dernières années. Je regrette grandement que la crise COVID ne nous ait pas permis de plus interagir. J'aurais beaucoup apprécié pouvoir mener des missions à Madagascar à vos côtés, découvrir cette île si spéciale et sa richesse. Malheureusement, malgré de nombreuses opportunités, cela n'a jamais pu aboutir. Je souhaitais néanmoins vous remercier pour votre disponibilité, vos conseils, votre contribution pour améliorer mes travaux. Merci également de m'avoir donné l'opportunité de participer à la réédition du livre « *The natural history of Madagascar* ». Cela a été très formateur, et j'ai hâte de pouvoir découvrir les contributions de nos nombreux collègues.

Merci Benjamin pour ta patience, ton écoute. Merci infiniment pour tes conseils et ton implication dans le projet. La modélisation ce n'est pas si simple mais j'ai pu grâce à toi avancer sur cette voie et me passionner pour ces équations qui donneraient envie à certains de s'arracher les cheveux. Je sais que j'ai encore beaucoup à apprendre et j'espère pouvoir approfondir mes connaissances sur le sujet. Je vais tacher de garder l'étincelle que ce domaine a fait naître en moi, en espérant un jour devenir un bon modélisateur. Mais... pas si simple de dompter les rouages du codage.

Ensuite, je tiens à remercier les membres de la bat team qui m'ont accompagné dans mes aventures. Merci à Muriel, Camille, Léa et Gildas. Merci pour votre bonne humeur, pour votre disponibilité, pour votre présence à mes côtés sur mes terrains

parfois ... pas du tout fructueux. Merci aussi aux autres collègues qui ont pu me tenir compagnie de temps à autres sur le terrain au cours de ces années, notamment Marie, Riana, Céline, Samantha.

Merci à Marie et à ses petites mains d'avoir traité les milliers d'échantillons qui me permettent aujourd'hui de présenter ce travail dont je suis fier. Merci infiniment pour ton aide. Tu as énormément contribué à cette thèse et tu as été d'un support indéniable, au-delà bien évidemment du support technique et logistique.

Je tenais aussi à remercier mes stagiaires de master Dana AL HALABI et Maëlle TEYSSEIRE que j'ai pris plaisir à encadrer, et qui elles aussi ont contribué aux résultats présentés dans cette thèse.

Merci à l'ensemble des collègues de PIMIT avec qui j'ai pris plaisir à échanger, et auprès desquels j'ai appris de nombreuses choses au cours de ces années passées au laboratoire. Spécifiquement, merci aux collègues de l'équipe DYSIIS qui ont toujours montré de l'intérêt pour mes travaux, qui m'ont toujours posé des questions pertinentes, et qui ont été là lorsque j'avais des interrogations.

Merci aux collègues avec qui j'ai pu partager les pauses, les déjeuners à la cafétéria, ou tout autre moment de convivialité et de bonne humeur : Dana, Jason, Layla, Jonathan, Marie, Riana, Tatiana, Jérémy, Fiona, Clément, Magali (et je pense en oublier).

Merci à Magali avec qui j'ai pu beaucoup interagir. Tu es un pilier important de ce laboratoire. J'admire ton franc parlé et j'aime ta spontanéité (tu n'as peur de rien ni de personne ;)). Je suis content que tu aies pu enfin intégrer de manière pérenne le laboratoire. Tu es un atout non négligeable pour PIMIT. Je te remercie pour nos longues discussions, pour tes conseils scientifiques et techniques, pour m'avoir écouté de nombreuses fois râler à cause des couacs au labo. Merci pour m'avoir accueilli au comptoir du couloir, pour la porte dans le front (hahaha) et aussi pour les points eppendorf ;) Restes fidèle à toi-même.

J'ai également une pensée pour toi David, la force tranquille. Bien que discret tu es également un atout précieux pour PIMIT. Tu possèdes un savoir incroyable. Tu es touche à tout et tu es bon dans chacun des domaines que tu explores. Tu es également une pédagogie folle. On ressent ton envie de partager. Tu es extrêmement

patient, tu parles avec passion et tu es impliqué dans ce que tu entreprends. Je te remercie pour les nombreuses discussions scientifiques que nous avons pu avoir. J'ai passé à chaque fois un moment très agréable et très enrichissant. Je te remercie pour ton aide dans le codage sous R, pour les analyses phylogénétiques qui ont pris parfois des heures, pour ta participation pour la finalisation des figures pour le chapitre sur les virus circulant chez les mammifères de Madagascar. Merci pour les idées que tu as pu m'apporter pour la modélisation, et pour tes conseils.

Merci aux collègues qui ont quitté le laboratoire, mais qui ont su par leur présence enrichir mon expérience à PIMIT. J'ai une pensée pour Yann, pour Céline, pour Gildas, pour Erwan, Colette, Léa.

Merci aux collègues de la plateforme CYROI qui ont pu contribuer également à mon passage à PIMIT, avec qui j'ai pu apprécier les pauses, les discussions, ou qui m'ont aussi épaulé dans mes démarches au cours de ces dernières années. J'ai une pensée particulière pour Colette, pour Anaëlle, et pour Imade.

J'ai également une pensée pour l'ensemble des collègues du bureau des sardines (anciens et actuels) : Elodie, Colette, Léa, Anne, Eva, Sarah, Marie, Jonathan, Cyrille, Aude, David, Riana, Tatiana, Dana, Layla, Jason, Alawiya, Daed, Grégoire, Fenia, Jade. Notre bureau porte bien son nom. Il est toujours bien animé. Néanmoins la cohésion qui peut y exister, le fait que nous soyons plusieurs à expérimenter la thèse, ses moments de doutes, les baisses de moral, font que l'on se sent moins seul. Heureusement il y a également des moments d'euphorie collective. J'ai pu créer de belles amitiés avec certains d'entre vous. Et à vous particulièrement, merci pour votre présence et pour votre soutien.

Léa, mon binôme depuis le début. Tu as été présente à chaque fois que j'en avais besoin. Tu m'as beaucoup apporté, tu m'as soutenu sur de nombreux points, et les souvenirs de ta présence au bureau restent parmi les meilleurs de mon passage à PIMIT. J'ai toujours sous la main la playlist de vidéos anti-déprime que nous avons construite et elle me suivra encore longtemps. Merci pour ton écoute, pour ta bonne humeur, pour ta gentillesse, ta générosité.

Ramanantsalamaaaaaaaa, mon ami ! Viroptèrrrrre. Mon voisin de bureau ! J'ai été très content de faire ta connaissance. J'ai passé de très bons moments en ta présence que ça soit au labo ou en dehors. C'est dommage que l'on n'ait pas pu partir

en mission ensemble à Madagascar. Je ne sais pas où le futur nous mènera, mais j'espère que nos chemins se recroiseront ! Bonne continuation mon ami !

Au groupe de Roger et les chatons. Comment vous dire ? Vous avez été un pilier pour ma thèse. Pour certains d'entre vous vous avez été présents dès mes débuts à PIMIT en tant que stagiaire. Vous m'avez soutenu et surtout supporté. On a passé des moments vraiment incroyables. Je me dis qu'on doit tous avoir un grain mais au final en additionnant les grains ça a donné un bon cary. Attention aux gaz du coup :) car quand on est tous présents ça donne un mélange détonnant.

À Jason, l'unique, le seul, le beau, le simple, le modeste, celui que tout le monde aime et qui aime tout le monde (tu auras reconnu d'où vient mon inspiration haha). Mais je dirais aussi la grosse tête (à toi de deviner laquelle ;)), au plus rapide, au plus fertile, au plus économe aussi haha. Mais avant tout à mon ami, à mon frère. Merci pour ta bonne humeur sans faille, pour ton humour, pour ton franc parlé. À ton rire inimitable, à ta voix portante. À tes talents de cracheur d'eau (et de grain de riz). Merci de toujours sauter au-dessus des barrières et de toujours franchir les limites lorsque tu as quelque chose à dire. Tu es un mec génial que tout le monde aimerait avoir dans sa vie !

À Jonathan (Yonatàn), el amigo, el hermano, « *Hola de la casaaaaa buena* ». Merci pour tes entrées fracassantes dans le bureau. Merci pour ton charisme incroyable, la beauté capillaire que tu dégages (néanmoins y a quand même une perte de densité au niveau des tempes je trouve :P). Tu as été présent dès mes premiers pas en tant que stagiaire à PIMIT. Et je t'avoue dès le début tu m'as paru être un fou venu d'une autre planète. Entre autres, tu parles une langue que peu de personnes peuvent comprendre. Il n'est pas rare d'entendre des gargouillis étranges lorsque l'on se promène dans les couloirs du laboratoire haha (RrrRrrrh). Tu détiens également un estomac magique. Dès que de la nourriture y entre, elle disparaît immédiatement. Je n'ai jamais vu une telle sorcellerie ! Pourtant je suis fan de Harry Potter haha. Par ailleurs tu possèdes également un accent de yab inimitable. En outre tu es sans nul doute une personne unique ! Merci pour nos nombreuses pauses, pour nos fous rires, pour nos délires étranges, pour nos pintes de l'effet haha et pour tout ce que tu as pu faire pour moi. Ton écoute et ta présence ont été importantes à mes yeux. Keep going on.

À Roger ! Pardon... je voulais dire Marie (désolé j'ai révélé ta véritable identité). Certains murmureront Kraken ou encore monstre en voulant parler de toi... (Bande de méchants garçons). À mes yeux tu es une fille rayonnante, très drôle, toujours de bonne humeur, toujours à l'écoute, toujours de bon conseil, et qui même si elle a un emploi du temps ministériel trouvera du temps lorsque ses amis en ont besoin, pour être auprès d'eux et les aider du mieux qu'elle peut. Après, je l'avoue, peut-être je murmurerais fofolle. Mais il s'agit d'une folie douce, le genre de folie qui fait du bien au moral et qui met du baume au cœur. Depuis notre premier gala d'impro, ou encore notre premier camembert rôti, il s'en est passé des choses ! Des pauses caspases 12, des pauses café, des pauses fromages... Je retiendrai longtemps les débats entre Jason et toi à la cafet ! Ou encore les siestes discrètes. Je retiendrai aussi tes talents de cuisinière, tes talents artistiques (au bout des ongles), et tes talents de coiffeuse ! Merci pour le réconfort que tu m'as apporté au cours de ces années.

Aux Formaggis ! Mon deuxième pilier au cours de cette thèse. Votre arrivée a été un peu plus tardive mais bien que courte l'aventure à vos côtés a également été très belle ! Cette dernière année de thèse a été riche en rebondissements et votre présence un rayon de soleil de plus parmi ceux prodigués par les amis que j'ai pu me faire ici. Merci pour nos nombreuses excursions, pour nos soirées jeux, pour nos soirées bouffes, pour nos soirées videocall, et nos défis farfelus.

Jason, bien entendu nous nous retrouvons une fois de plus. J'aurais beaucoup de choses à dire encore à ton sujet, mais je pense que le contenu serait plus grand que celui de ma thèse. Mais bon « *Can you give me an Oh YeaAAaAAh ?* ».

Dana, la fille qui aime les virus autant qu'elle les déteste. Une fille discrète, mais qui a un fort caractère et qui est déterminée dans ce qu'elle entreprend. Tu es un adversaire redoutable lors des soirées jeu de société ! Merci pour les bons moments qu'on a pu passer ensemble. Merci pour l'initiation au maté. Merci de m'avoir encouragé dans mon apprentissage de l'arabe (je sais que mon accent est mauvais même si tu me dis « C'est très bien Axeeeel »). Merci pour m'avoir de nombreuses fois fait rire quand tu te disputais avec Jason ! Je me souviendrai aussi de tous les bonbons sucrés que tu as subtilisés.

Layla : « Axoul, on mange ? ». Merci pour l'énergie communicative que tu dégages, merci pour ta bonne humeur et le sourire que tu transmets aux gens. Merci

pour ta folie elle aussi qui met du baume au cœur. Merci pour ta spontanéité. Merci pour les bons petits plats que tu as pu me cuisiner pour me remonter le moral lorsque ça n'allait pas, ou tout simplement pour nourrir mon estomac d'ogre. Je te remercie également pour ton écoute, pour ta patience, ta compréhension et ton empathie, tes conseils, tes questions ardues sur mon sujet qui m'ont fait souvent me creuser la tête au-delà de la vision que je pouvais avoir sur certains points. Merci d'avoir supporté mes accès d'ondes négatives, et mes moments de doutes. Tu sais apporter de la lumière même dans les moments les plus sombres. Merci aussi de m'avoir initié à l'arabe. Sans un bon prof je n'aurais pas pu progresser autant. J'admire beaucoup ton adaptabilité, tes capacités de réflexion (disons le tu as un cerveau incroyable), ta facilité à apprendre les langues, tes facilités de communication. Les sciences et la pédagogie coulent dans tes veines, c'est indéniable. Je pense également que tu fais partie de la génération prometteuse des sardines ! Keep going on.

Tatiana, « Tu as passé un bon weekend ? » ou celle qui trouve que c'est DUUUUR de bosser à La Réunion. Merci également à toi pour ta présence à mes côtés au cours de cette thèse. Je t'en veux encore un petit peu pour Mafate (je n'oublie pas haha). Néanmoins je dois avouer que d'autres points aident à compenser. Merci pour les nombreuses fois où tu m'as fait mouriiiiir de rire. Il y en a tellement que je vois flew lorsque j'essaie de tous me les remémorer (:P). Merci de me rappeler que mes blagues sont nulles. Merci de faire appel à moi (je suis digne de confiance je le sais) pour relire tes mails. Merci de me faire visiter La Réunion au travers de tes story insta. Merci pour les randos, pour les soirées, et pour l'énergie que tu dégages et qui me rappelle que je n'en aurai jamais autant :(. Tu es une pile inusable.

Je remercie également mes amis de longue date qui ont aussi supporté mes doutes, mes plaintes et qui m'ont toujours encouragé à poursuivre : Morgane, Anaïs, Carole, Fantine, Fanny, Vincent, Alice. J'espère que tonton vous rend fiers. Votre présence a été précieuse et je mesure la chance que j'ai d'avoir des amis comme vous.

Je remercie ma famille pour leur soutien sans faille, pour leur présence réconfortante, pour leur implication. Tout ce chemin parcouru n'aurait pu se faire sans vous. Merci à vous !

Je tenais à remercier Cindy aussi. Sans toi, cette thèse n'aurait pas pu se passer dans les meilleures conditions. Un Dr. HOARAU de plus et ce en grande partie grâce à ton aide. Merci !

Merci Ricco pour ta compagnie durant les longues nuits de travail. Je n'aurais jamais pensé que ta petite présence pouvait avoir autant d'importance au quotidien.

Merci à la femme qui a pu partager mon quotidien au cours de ce moment délicat de la vie. J'aurais beaucoup à te dire. Comme évoqué la thèse c'est des hauts et des bas, cela joue beaucoup sur le moral. Ces derniers mois ont été particulièrement difficiles et stressant. Cela s'est beaucoup ressenti jusque dans la sphère privée. Je n'ai pas toujours été des plus agréables à vivre au quotidien et malgré tout tu as été d'un soutien indéniable, d'une patience incroyable. Ta présence à mes côtés a été un moteur pour surmonter ces épreuves. J'admire la façon que tu as de gérer les choses. Je me dis que j'ai vraiment beaucoup de chance de t'avoir auprès de moi. Je n'aurais pas pu imaginer les choses autrement. Merci d'être qui tu es, merci pour ce que tu dégages, merci pour ta confiance. Tu es une personne formidable, altruiste, généreuse, tu as le cœur sur la main. Merci de faire partie de ma vie.

Enfin, je tenais à te dédier cette thèse, Sophie. Toi qui nous as été enlevée bien trop tôt. Toi qui as toujours cru en moi. Toi qui m'as toujours fait confiance. Ton départ a laissé de grandes déchirures dans mon cœur. Ces blessures ne guériront jamais vraiment, mais je me suis fait la promesse de poursuivre mes rêves afin que tu sois fière de moi, peu importe où tu sois. Merci d'avoir fait partie de ma vie, merci pour la confiance et l'amour inconditionnel que tu as pu me porter. Je garderai toujours en tête la joie de vivre que tu dégageais, ton sourire malicieux, et ta compagnie réconfortante.

Résumé

Les zoonoses représentent un problème majeur de santé publique. Elles correspondent à 60% des maladies infectieuses émergentes, et près de 70% d'entre elles proviennent de la faune sauvage. Les chauves-souris sont réservoirs de nombreux agents infectieux. Plusieurs virus qu'elles hébergent ont été impliqués dans l'émergence de maladies sévères chez l'Homme (e.g. virus Nipah, virus Marburg, SARS-CoV), soulignant l'importance de mieux appréhender l'épidémiologie des agents infectieux au sein des communautés animales. Le sud-ouest de l'océan Indien est un point chaud de biodiversité, et abrite une richesse spécifique élevée en chauves-souris. Plusieurs travaux ont mis en évidence la circulation d'une grande diversité de virus zoonotiques chez ces mammifères, dans plusieurs des territoires de la région. Néanmoins, la majorité des études menées à l'heure actuelle s'est axée sur la recherche d'une seule famille virale à la fois. De plus, les dynamiques de transmission sont restées peu investiguées. Dans cette thèse, au travers d'approches de biologie moléculaire (détection moléculaire) et de modélisation mathématique, nous avons pu caractériser l'effet de la diversité et de la structure des communautés de chauves-souris, sur les dynamiques de co-infections des coronavirus (CoV), paramyxovirus (PMV) et astrovirus (AstV). Dans une première partie, sur la base d'une méta-analyse regroupant 871 échantillons provenant de 28 espèces échantillonnées à Madagascar, Mayotte, au Mozambique, et à La Réunion, nous avons mis en évidence l'existence de co-infections et d'interactions entre les familles virales testées, chez certaines espèces de Madagascar et du Mozambique. Dans une seconde partie, en nous focalisant sur une espèce endémique de La Réunion, le Petit Molosse (*Mormopterus francoismoutoui*), nous avons pu caractériser les dynamiques de co-circulation des trois virus dans deux colonies de maternité. Nous avons mené une étude longitudinale rassemblant 3422 échantillons collectés sur quatre années. Nous avons pu mettre en évidence une circulation saisonnière marquée et des patrons d'infection répétables chaque année, pour chacun des virus. Notamment, nous avons observé la présence de pics d'excrétion virale pour les CoV et les PMV précédant la parturition, et quelques semaines après les naissances, suggérant un fort lien entre les variations de la structure et de la taille des populations en lien avec la saisonnalité de reproduction, et les dynamiques infectieuses. Enfin, nous avons confirmé le lien entre la saisonnalité de reproduction et la saisonnalité d'infection aux CoV chez cette espèce au moyen d'un modèle épidémiologique. Nous avons pu reproduire les dynamiques infectieuses observées et témoigner de l'implication des femelles gestantes et des juvéniles dans les pics d'excrétion. L'ensemble de ces travaux souligne la nécessité d'investiguer spontanément les co-infections dans les communautés de chauves-souris, et l'importance des études longitudinales pour révéler les variations dans les dynamiques infectieuses. Par ailleurs, ces travaux soulignent également l'efficacité des approches combinées, entre recherche observationnelle et modélisation, pour mieux appréhender les mécanismes qui sous-tendent les dynamiques d'infection dans les communautés d'animaux sauvages.

Mots-clés : chauves-souris, astrovirus, coronavirus, paramyxovirus, co-infection, méta-analyse, étude longitudinale, saisonnalité d'infection, modélisation épidémiologique

Abstract

Zoonoses represent a major threat for public health. Sixty percent of emerging infectious diseases are zoonoses, and nearly 70% originate from wildlife. Bats are major hosts of infectious agents. During the past decades, many bat-borne viruses have been involved in the emergence of severe diseases in humans (e.g. Nipah virus, Marburg virus, SARS-CoV), emphasizing the need for a better assessment of virus epidemiology in animal communities. The southwestern Indian Ocean region is a biodiversity hotspot, and hosts a large diversity of bat species. Several studies have highlighted the circulation of viruses with a zoonotic potential, in these mammals. However, most of the studies have focused on the exploration of a single viral family. In addition, transmission dynamics remain poorly investigated. In this work, we combined molecular approach (molecular detection) and mathematical modeling to characterize the effect of population structure and diversity on the co-infection dynamics of coronaviruses (CoVs), paramyxoviruses (PMVs) and astroviruses (AstVs), within several bat species of the region. In a first part, through a meta-analysis comprising 871 samples from 28 species sampled on Madagascar, Mayotte, Mozambique and Reunion Island, we described the existence of co-infections and interactions between the tested viral families, in species from Madagascar and Mozambique. In a second part, focusing on an endemic species from Reunion Island: the Reunion free-tailed bat (*Mormopterus francoismoutoui*), we were able to decipher the co-circulation dynamics of the three viruses, in two maternity colonies. We conducted a longitudinal study over four consecutive years, and collected 3422 samples. Infection dynamics was seasonal, and repeatable infection patterns were observed each year, in particular for CoVs and PMVs. Finally, we confirmed the link between seasonality of reproduction and the seasonality of infection using an epidemiological model. We modeled CoV infection dynamics and demonstrated the involvement of pregnant females and juveniles in the appearance of excretion peaks. This work supports the need to investigate co-infections in bat communities, and underlines the importance of longitudinal studies to capture variations in infection dynamics. Furthermore, we also highlight the effectiveness of combined approaches, between traditional research and modeling, to better understand the mechanisms underlying infection dynamics in wildlife communities.

Keywords: bats, astrovirus, coronavirus, paramyxovirus, co-infection, meta-analysis, longitudinal study, seasonality of infection, epidemiological modeling

Liste des publications scientifiques

Publications dans des journaux à comité de lecture international

Article 1 : Hoarau A.O.G., Mavingui P., et Lebarbenchon C. 2020. « Coinfections in Wildlife: Focus on a neglected aspect of infectious disease epidemiology ». PLOS Pathogens 16 (9): e1008790. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008790>.

Article 2 : Hoarau A.O.G., Goodman S.M., Al Halabi D., Ramasindrazana B., Lagadec E., Le Minter G., Köster M., *et al.* 2021. « Investigation of astrovirus, coronavirus and paramyxovirus co-infections in bats in the Western Indian Ocean ». Virology Journal 18 (1): 205. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01673-2>.

Article 3 : Hoarau A.O.G., Köster M., Dietrich M., Le Minter G., Joffrin L., Ramanantsalama R.V., Mavingui P., and Lebarbenchon C. *En préparation*. « Bat virus on a tropical island: Shedding dynamics and co-infections in maternity colonies ».

Article 4 : Hoarau A.O.G., Mavingui P., Roche B., and Lebarbenchon C. *En préparation*. « Highly predictable coronavirus shedding pulses in a tropical bat maternity colony ».

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| Remerciements | 5 |
| Résumé | 15 |
| Abstract | 17 |
| Liste des publications scientifiques..... | 19 |
| Table des matières | 21 |
| Liste des figures | 25 |
| Liste des annexes..... | 29 |
| Liste des abréviations..... | 31 |
| I. Introduction générale..... | 33 |
| I.1. Les maladies infectieuses émergentes | 35 |
| <i>I.1.1. Généralités</i> | <i>35</i> |
| <i>I.1.2. Incidence et nature des agents infectieux émergents.....</i> | <i>36</i> |
| <i>I.1.3. Facteurs impliqués dans l'émergence des zoonoses</i> | <i>38</i> |
| <i>I.1.4. Étapes de l'émergence des zoonoses.....</i> | <i>39</i> |
| I.2. Les chauves-souris, réservoirs de maladies infectieuses émergentes..... | 41 |
| <i>I.2.1. Caractéristiques biologiques et écologiques</i> | <i>41</i> |
| <i>I.2.2. Les chauves-souris, réservoirs d'agents infectieux</i> | <i>42</i> |
| <i>I.2.3. Virus zoonotiques associés aux chauves-souris</i> | <i>44</i> |
| <i>I.2.4. Modes de transmission des agents infectieux des chauves-souris à l'Homme</i> <i>.....</i> | <i>51</i> |
| I.3. Les chauves-souris et leurs virus dans le sud-ouest de l'océan Indien..... | 54 |
| <i>I.3.1. Diversité des chauves-souris dans la région</i> | <i>54</i> |
| <i>I.3.2. Virus associés aux chauves-souris des îles du sud-ouest de l'océan Indien</i> <i>.....</i> | <i>61</i> |
| I.4. Objectifs des travaux de thèse..... | 65 |

| | |
|--|-----|
| II. Chapitre I..... | 69 |
| Co-infections dans la faune sauvage : cas des chauves-souris du sud-ouest de l’océan Indien..... | 69 |
| II.1. Importance des co-infections dans l’épidémiologie des maladies infectieuses | 71 |
| <i>II.1.1 Définition et incidence</i> | 71 |
| <i>II.1.2. Interactions entre agents infectieux</i> | 71 |
| <i>II.1.3. Effets des co-infections sur les conditions physiologiques</i> | 72 |
| <i>II.1.4. Importance de l’investigation des co-infections en épidémiologie</i> | 74 |
| <i>II.1.5. Approches pour étudier les co-infections</i> | 75 |
| <i>II.1.6. Résumé de l’étude (Article 1)</i> | 75 |
| <i>II.1.7. Article 1 : “Coinfection in wildlife: Focus on a neglected aspect of infectious disease epidemiology”</i> | 76 |
| II.2. Co-infections chez les chauves-souris du sud-ouest de l’océan Indien | 82 |
| <i>II.2.1. Résumé de l’étude (Article 2)</i> | 82 |
| <i>II.2.2. Article 2 : “Investigation of astrovirus, coronavirus and paramyxovirus co-infections in bats in the western Indian Ocean ”</i> | 84 |
| III. Chapitre II..... | 93 |
| Dynamique temporelle de co-infections aux coronavirus, paramyxovirus et astrovirus chez le Petit Molosse de La Réunion | 93 |
| III.1. Saisonnalité et dynamique d’infection | 95 |
| III.2. Saisonnalité de la reproduction et dynamiques d’infection chez les chauves-souris | 97 |
| <i>III.2.1. Contexte de notre étude</i> | 98 |
| <i>III.2.2. Résumé de l’étude (Article 3)</i> | 102 |
| <i>III.2.3. Article 3 : “Bat virus on a tropical island: shedding dynamics and co-infections in maternity colonies”</i> | 103 |
| IV. Chapitre III | 129 |

| | |
|--|-----|
| Modélisation de la dynamique d'infection aux coronavirus dans une colonie de Petit Molosse de La Réunion | 129 |
| IV.1. La modélisation en épidémiologie..... | 131 |
| IV.1.1. <i>Rôles de la modélisation</i> | 132 |
| IV.1.2. <i>Modèles en compartiments : principe de fonctionnement</i> | 133 |
| IV.2. Modélisation des dynamiques infectieuses chez les chauves-souris | 135 |
| IV.2.1. <i>Généralités</i> | 135 |
| IV.2.2. <i>Modèles mécanistes chez les chauves-souris</i> | 135 |
| IV.2.3. <i>Modèles associés aux coronavirus de chauves-souris</i> | 136 |
| IV.3. Modélisation de la transmission des coronavirus chez le Petit Molosse de La Réunion..... | 137 |
| IV.3.1. <i>Contexte</i> | 137 |
| IV.3.2. <i>Résumé de l'étude (Article 4)</i> | 138 |
| IV.3.3. <i>Article 4 : « Highly predictable coronavirus shedding pulses in a tropical bat maternity colony »</i> | 138 |
| V. Discussion générale et perspectives | 159 |
| V.1. Co-infections virales chez les chauves-souris | 162 |
| V.2. Saisonnalité de l'infection et changements d'hôtes | 166 |
| V.3. Habitats, contacts avec les populations humaines, et risque d'émergence . | 170 |
| V.4. Risques zoonotiques et conservation des chauves-souris | 173 |
| VI. Références | 177 |
| VII. Annexes..... | 213 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1. Exemples de maladies infectieuses émergentes et ré-émergentes entre 1940 et 2017 (National Institute of Allergies and Infectious Diseases 2017). En bleu : maladies ré-émergentes, en rouge : maladies strictement émergentes, en noire : maladies qui pourraient être utilisées à des fins de bioterrorisme. | 36 |
| Figure 2. Exemples de facteurs d'émergences de zoonoses chez l'Homme (1940-2005) (Keesing <i>et al.</i> 2010). | 39 |
| Figure 3. Exemple d'impacts des activités humaines (ici l'urbanisation) sur les maladies infectieuses (Baker <i>et al.</i> 2021). | 39 |
| Figure 4. Illustration des principales étapes de l'émergence d'un agent infectieux (Wolfe <i>et al.</i> 2007). Les quatre agents infectieux représentés ont atteint différentes étapes du processus. | 40 |
| Figure 5. Proportion des familles virales les plus fréquemment documentées chez les chauves-souris. Synthèse faite à partir de la base de données « <i>Database of bat-associated viruses</i> » en décembre 2021 (Chen <i>et al.</i> 2014). | 44 |
| Figure 6. Proportion des familles de chauves-souris pour lesquelles des données génétiques virales sont disponibles. Synthèse faite à partir de la base de données « <i>Database of bat-associated viruses</i> » en décembre 2021 (Chen <i>et al.</i> 2014). | 45 |
| Figure 7. Origine des coronavirus et diversité des hôtes documentés (adapté de Chan <i>et al.</i> 2013). | 46 |
| Figure 8. Relations phylogénétiques au sein des coronavirus (Wilkinson <i>et al.</i> 2020) | 46 |
| Figure 9. Diversité des paramyxovirus retrouvés chez les chauves-souris (Drexler <i>et al.</i> 2012). a) Les genres sont mis en évidence par des couleurs différentes. b) Les couleurs correspondant aux genres sont associées aux familles de chauves-souris dans lesquels ils ont été retrouvés. | 48 |

| | |
|---|----|
| Figure 10. Relations phylogénétiques au sein des astrovirus (Wohlgemuth <i>et al.</i> 2019). | 50 |
| Figure 11. Distribution géographique des sites d'étude rapportant la détection d'astrovirus chez les chauves-souris (Fischer <i>et al.</i> 2017). Les familles de chauves- souris dans lesquelles ont été détectés les astrovirus sont représentées par des cercles de couleurs..... | 51 |
| Figure 12. Voies de transmission possibles des pathogènes de chauves-souris à l'Homme (Joffrin <i>et al.</i> 2018)..... | 52 |
| Figure 13. Carte représentant les différentes îles de la région du sud-ouest de l'océan Indien. Carte créée à partir du logiciel libre QGIS version 3.22.1 et annotée manuellement via le logiciel libre Inkscape version 1.1.2. | 54 |
| Figure 14. Familles et espèces de chauves-souris décrites à Madagascar, et statuts de conservation associés (Construit à partir de : Goodman 2011 ; Goodman <i>et al.</i> 2011 ; Goodman, <i>et al.</i> 2012a ; Goodman <i>et al.</i> 2012b ; Goodman <i>et al.</i> 2015 ; Goodman <i>et</i> Ramasindrazana 2015 ; Goodman <i>et al.</i> 2016 ; Demos <i>et al.</i> 2021). Les étoiles simples indiquent les espèces endémiques de Madagascar, les étoiles doubles indiquent les espèces endémiques de Madagascar et de l'Archipel des Comores. Les lettres entre parenthèses indiquent le statut de conservation selon l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature. DD : données insuffisantes ; LC : préoccupation mineure ; NE : non évalué ; NT : quasi menacé ; VU : vulnérable (International Union for Conservation of Nature (IUCN) 2021). | 55 |
| Figure 15. Familles et espèces de chauves-souris décrites dans l'Archipel des Comores, statuts de conservation associés (Construit à partir de : O'Brien 2011). Les étoiles simples indiquent les espèces endémiques de l'Archipel des Comores, les étoiles doubles indiquent les espèces endémiques de Madagascar et de l'Archipel des Comores. Les lettres entre parenthèses indiquent le statut de conservation selon l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature. CR: en danger critique ; DD : données insuffisantes ; LC : préoccupation mineure ; VU : vulnérable (International Union for Conservation of Nature (IUCN) 2021). | 58 |

Figure 16. Familles et espèces de chauves-souris décrites dans l'Archipel des Seychelles, et statuts de conservation associés (Construit à partir de : O'Brien 2011). Les étoiles indiquent les espèces endémiques. Les lettres entre parenthèses indiquent le statut de conservation selon l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature. CR : en danger critique ; DD : données insuffisantes ; EN : en danger ; LC : préoccupation mineure ; VU : vulnérable (International Union for Conservation of Nature (IUCN) 2021)..... 59

Figure 17. Familles et espèces de chauves-souris décrites dans l'Archipel des Mascareignes, et statuts de conservation associés (Construit à partir de : O'Brien 2011). Les étoiles indiquent les espèces endémiques. Les lettres entre parenthèses indiquent le statut de conservation selon l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature. EN : en danger ; LC : préoccupation mineure (International Union for Conservation of Nature (IUCN) 2021). 61

Figure 18. Réseau d'interactions au sein d'une communauté composée de quatre agents infectieux chez des campagnols agrestes (*Microtus agrestis*) (adapté de Telfer *et al.* 2010). Les associations positives sont représentées par des flèches rouges et les négatives par des flèches bleues. L'intensité des interactions est proportionnelle à l'intensité des couleurs. 72

Figure 19. Différentes échelles d'interactions agent infectieux - agent infectieux (Hellard *et al.* 2015). a) À l'échelle de l'hôte, les agents infectieux peuvent interagir directement ou indirectement au travers de la compétition pour les ressources ou des réponses immunitaires de l'hôte. b) À l'échelle des populations, la transmission des agents infectieux est le résultat de plusieurs étapes clés. c) À l'échelle des méta-populations ou des communautés, la présence de plusieurs agents infectieux peut affecter la probabilité de transmission d'un agent infectieux donné à d'autres sous-populations de la même espèce ou d'espèces différentes. 74

Figure 20. Distribution géographique des échantillons inclus dans la méta-analyse. Les espèces échantillonnées pour chaque territoire sont référencées dans les encadrés. Le nombre d'échantillons est indiqué entre parenthèses. Carte créée à partir du logiciel libre QGIS version 3.22.1 et annotée manuellement via le logiciel libre Inkscape version 1.1.2. 83

| | |
|---|-----|
| Figure 21. Variation saisonnière de la prévalence d'infection aux virus influenza aux États-Unis parmi les individus testés par l'Organisation Mondiale de la Santé et par le Système national de surveillance des virus respiratoires et entériques (1994-2000) (Dowell 2001). | 95 |
| Figure 22. Le Petit Molosse de La Réunion (<i>Mormopterus francoismoutoui</i>). (A) Image d'un individu (Photo de Marc LEMENAGER). (B) Son cycle de reproduction au sein de la grotte de Trois-Bassins (Basé sur Dietrich <i>et al.</i> 2015b et Joffrin <i>et al.</i> 2022) | 100 |
| Figure 23. Colonies de maternité de Petit Molosse sélectionnées pour l'étude. (A) Colonie située dans une grotte sur la commune de Trois-Bassins. (B) Colonie située dans un transformateur électrique sur la commune de Sainte-Marie. | 102 |
| Figure 24. Évolution de l'utilisation des modèles mathématiques dans la littérature en épidémiologie (1991-2004) (Keeling et Rohani 2011). | 131 |
| Figure 25. Diagramme de flux d'un modèle SIR. S = sensibles, I = infectieux, R = rétablis. | 134 |
| Figure 26. Diagramme de flux d'un modèle SIRS. S= sensibles, I= infectieux, R= rétablis. Les individus rétablis peuvent redevenir sensibles suite à une perte d'immunité spécifique. | 134 |
| Figure 27. Distribution géographique des études de modélisation épidémiologique de virus de chauves-souris (Adapté de Gentles <i>et al.</i> 2020). Les pays ou régions dans lesquelles les études ont été menées sont mis en valeur. L'échelle de couleurs employée indique le nombre d'articles publiés. Les diagrammes indiquent le type de modèle employé (théorique, simulé à l'aide de paramètres dérivés de données, ou explicitement ajusté aux données) pour chaque zone géographique. | 136 |

Liste des annexes

- Annexe 1. Détection des coronavirus, paramyxovirus et astrovirus chez les chauves-souris à Madagascar, aux Comores, aux Seychelles et dans les Mascareignes.... 215
- Annexe 2. Joffrin L., Hoarau A.O.G., Lagadec E., Torrontegi O., Le Minter G., Dietrich M., Mavingui P. and Lebarbenchon C. Seasonality of coronavirus shedding in tropical bats. *Royal Society Open Science* 9 (2): 211600. 219
- Annexe 3. Protocoles d'échantillonnage dans les deux colonies de maternité du Petit Molosse. En haut : échantillonnage sur feuilles de Benchguard © en dessous de la colonie de Trois-Bassins dans la grotte. En bas : Echantillonnage de la colonie de Sainte-Marie. (A) Transformateur électrique. (B) Installation du dispositif de collecte. (C) Collecte des échantillons. 231
- Annexe 4. Hoarau A.O.G., Joffrin L., Dietrich M., Mavingui P., and Lebarbenchon C. Viral infection dynamics and diversity in two Reunion free-tailed bat colonies. Session poster à la conférence intertaniale "*Island Biology 2019*". 235
- Annexe 5. Hoarau A.O.G., Koster M., Le Minter G., Dietrich M., Mavingui P., and Lebarbenchon C. Viral coinfection dynamics in Reunion free-tailed bats (*Mormopterus francoismoutou*). Session poster à la conference internationale "*18th Ecology and Evolution of Infectious Diseases*" (EEID 2021). 239
- Annexe 6. Joffrin L., Hoarau A.O.G., Lagadec E., Köster M., Ramanantsalama R.V., Mavingui P., and Lebarbenchon C. 2021. Astrovirus in Reunion free-tailed bat (*Mormopterus francoismoutou*). *Viruses*. 13 (8), 1524. 243

Liste des abréviations

AstV : Astrovirus

CoV : Coronavirus

COVID-19 : « *Coronavirus disease 2019* » : Maladie à coronavirus 2019

DUUV : Virus Duvenhage

EBLV1 : « *European bat lyssavirus 1* » : Lyssavirus Européen de chauves-souris 1

LBV : « *Lagos Bat Virus* » : Virus Lagos de chauves-souris

MERS : « *Meadle East Respiratory Syndrom* » : Syndrome respiratoire du Moyen Orient

MIE : Maladie infectieuse émergente

OMS : Organisation mondiale de la santé

PMV : Paramyxovirus

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

SOOI : Sud-ouest de l'océan Indien

SARS : « *Severe acute respiratory syndrome* » : Syndrome respiratoire aigu sévère

UICN : Union Internationale pour la Conservation de la Nature

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VIS : Virus de l'immunodéficience simienne

I. Introduction générale

I.1. Les maladies infectieuses émergentes

I.1.1. Généralités

Les maladies infectieuses émergentes (MIE) sont définies comme des infections qui sont apparues récemment dans une population ou qui existent déjà, mais dont l'incidence et la portée géographique augmentent rapidement (Morse 1995). Ces maladies ont, au cours de l'histoire, marqué de nombreuses fois les populations humaines. Nous pouvons par exemple citer les trois grandes pandémies de peste, maladie causée par la bactérie *Yersinia pestis*, dont la plus grande, « *la Peste Noire* », a débuté au XIV^{ème} siècle et a causé près de 25 millions de morts en Europe, et 25 millions de morts en Asie et en Afrique (Wray 2005 ; Frith 2012). Nous pouvons également faire référence à l'introduction du virus responsable de la variole au Mexique, qui a causé plus de 10 millions de morts en 1520-1521, et qui a contribué à la disparition de la civilisation Aztèque (Crosby 2003 ; Morens *et al.* 2004). Enfin, nous pouvons aussi mentionner la pandémie de grippe espagnole due au virus Influenza H1N1, ayant sévi entre 1918 et 1920 en Europe, Amérique du Nord, et en Asie, et responsable de près de 50 millions de morts (Johnson et Mueller 2002).

Les progrès de la science, l'avènement de la théorie microbienne, l'amélioration des conditions d'hygiène, le développement de la vaccination, et la découverte des antibiotiques, ont donné un espoir pour lutter contre les maladies infectieuses à partir des années 1970 (Burnet et White 1972 ; Porter 1999 ; Morens *et al.* 2004). Cet espoir a notamment été nourri par l'éradication de la variole en 1980 (responsable de 300 millions de morts à l'échelle mondiale au XX^{ème} siècle), suite à des campagnes de vaccination massives (Strassburg 1982 ; Henderson 2011). Cependant, l'apparition de nouvelles affections durant la décennie 1970-1980 a vite remis en question cet optimisme général. Ainsi, l'émergence du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), a mené les politiques et scientifiques à reconsidérer l'importance des MIE (Stephens *et al.* 1998 ; Desselberger 2000). Aujourd'hui, à l'échelle globale, les MIE ont un impact considérable sur la santé, sur la croissance économique, et sur l'environnement (Binder 1999 ; Daszak 2000 ; Morens *et al.* 2004 ; Jones *et al.* 2008).

I.1.2. Incidence et nature des agents infectieux émergents

Entre 1940 et 2004, plus de 300 événements d'émergences de maladies infectieuses ont été recensés à travers le monde, principalement dans les régions intertropicales (Jones *et al.* 2008 ; Allen *et al.* 2017). L'incidence de ces infections n'a fait qu'augmenter au cours de cette période, accentuant l'accroissement de la menace représentée par ces infections (Jones *et al.* 2008). Entre 2004 et 2017, près d'une trentaine de nouvelles MIE sont apparues (National Institute of Allergies and Infectious Diseases, 2017) (Figure 1). Récemment, vers la fin de l'année 2019, nous avons assisté de manière marquante à l'émergence du coronavirus SARS-CoV-2 responsable de la pandémie de la COVID-19, qui a profondément bouleversé nos modes de vie (Rasmussen 2021 ; Holmes *et al.* 2021).

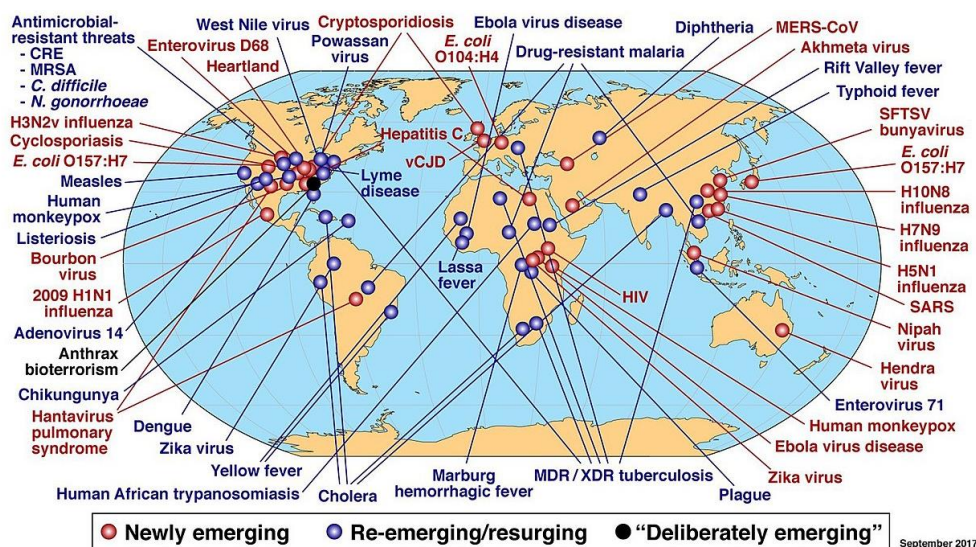


Figure 1. Exemples de maladies infectieuses émergentes et ré-émergentes entre 1940 et 2017 (National Institute of Allergies and Infectious Diseases 2017). En bleu : maladies ré-émergentes, en rouge : maladies strictement émergentes, en noire : maladies qui pourraient être utilisées à des fins de bioterrorisme.

Parmi les MIE recensées, certaines infections sont liées à des agents ayant fait leur apparition pour la première fois dans les populations humaines (Morse 1995 ; Jones *et al.* 2008). Nous pouvons citer le syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) caractérisé par des pneumonies atypiques causées par un coronavirus (le SARS-CoV), apparu fin 2002 dans la province du Guangdong en Chine. D'autres infections sont liées à des agents infectieux recombinants ou résistants. C'est notamment le cas de la malaria (ou paludisme). C'est une des maladies humaines les plus répandue dans les régions tropicales, et compte chaque année plus de 500 millions de cas à

l'échelle mondiale, essentiellement en Afrique (Wellems et Miller 2003). Elle est causée par les parasites du genre *Plasmodium* sp. (cinq espèces sont recensées) (Phillips *et al.* 2017) transmis à l'Homme par la piqûre des moustiques anophèles (*Anopheles* sp.) (Phillips *et al.* 2017) et est responsable de symptômes semblables à la grippe, de fièvres intenses, et peut conduire à des complications graves (e.g. ictère, convulsions, atteinte rénale), voire à la mort, avec plus d'un million de décès par an. Au cours de ces dernières années, de nombreux cas de cette maladie ont été reliés à l'apparition de souches devenues résistantes à la chloroquine ou à la mefloquine, habituellement utilisées en prophylaxie (Wellems et Miller 2003). Enfin, certaines infections sont associées à des agents infectieux existant déjà dans les populations humaines mais dont l'incidence a augmenté. C'est le cas de la maladie de Lyme qui peut entraîner des lésions neurologiques, articulaires ou cardiaques. Elle est causée par les bactéries du genre *Borrelia* sp. dont les principaux réservoirs sont les petits rongeurs et les oiseaux (Radolf *et al.* 2012). La transmission se fait par la piqûre de tiques infectées, appartenant au genre *Ixodes* sp. (Radolf *et al.* 2012). Cette maladie a connu une recrudescence ces dernières années, principalement aux États-Unis, où l'expansion de l'Homme dans les zones suburbaines et la perte de biodiversité ont contribué à l'augmentation de son incidence (Radolf *et al.* 2012 ; Keesing *et al.* 2010).

Enfin, les agents infectieux impliqués dans l'émergence de ces nouvelles maladies sont variés (e.g. parasites, champignons). Néanmoins, les bactéries et les virus sont les plus impliqués (Jones *et al.* 2008). La majorité des maladies infectieuses émergentes recensées sont des zoonoses (60%), causées par des agents infectieux qui peuvent se transmettre entre les animaux vertébrés et l'Homme. De surcroît, 72% d'entre eux sont associés à la faune sauvage, et ce nombre a augmenté de manière significative, jusqu'à constituer près de 52% des maladies ayant émergées entre 1900 et 2000 (Jones *et al.* 2008). Les zoonoses représentent ainsi une menace significative pour la santé humaine mais également pour la santé animale (Binder 1999 ; Daszak 2000 ; Jones *et al.* 2008). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime à des millions le nombre de décès dus aux zoonoses (World Health Organisation 2021a). C'est dans ce contexte qu'est né le concept « *One health* », signifiant « *une seule santé* », mettant en lien la santé humaine, la santé animale, et la santé environnementale, dans le but de mieux appréhender l'émergence des maladies

infectieuses afin de proposer des mesures adaptées de contrôle des zoonoses (Zinsstag *et al.* 2011).

1.1.3. Facteurs impliqués dans l'émergence des zoonoses

Les évènements d'émergences sont conditionnés par de multiples facteurs (Morse 1995 ; Desselberger 2000 ; Taylor *et al.* 2001 ; Morens *et al.* 2004 ; Wolfe *et al.* 2007 ; Morse *et al.* 2012). Dans un premier temps, nous pouvons considérer les facteurs intrinsèques aux agents infectieux. Ces derniers doivent être capables de franchir les barrières d'espèces, de s'adapter et se maintenir au sein d'un ou de plusieurs nouveaux hôtes. Une grande majorité des agents infectieux ayant émergé au cours de ces dernières décennies sont des virus, et principalement des virus à ARN (Jones *et al.* 2008). Ils ont la particularité d'avoir des taux de mutation élevés (de l'ordre de 10^{-3} mutations/site/an) du fait de l'absence d'une fonction correctrice de l'ARN polymérase impliquée dans la réplication (Holmes 2010). Ces virus sont également capables de réarrangements au niveau de leurs génomes, liés à des recombinaisons et, pour les virus au génome segmenté, à des réassortiments (Parrish *et al.* 2008 ; Longdon *et al.* 2014). Ces particularités confèrent aux virus à ARN une forte plasticité et ainsi de grandes capacités d'adaptation (Holmes 2010).

D'autre part, l'émergence des maladies infectieuses et particulièrement des zoonoses, est fortement liée aux activités humaines, aux changements anthropogéniques, démographiques et environnementaux (Figure 2 et Figure 3) (Jones *et al.* 2008 ; Woolhouse et Gowtage-Sequeria 2005 ; Daszak 2000 ; Weiss et McMichael 2004 ; Keesing *et al.* 2010 ; Baker *et al.* 2021). Par exemple, l'accroissement de l'occupation des territoires naturels par l'Homme, accompagné de la modification de l'environnement, et de la baisse de la biodiversité (e.g. fragmentation des habitats, élevages intensifs) a des répercussions importantes sur l'écologie des hôtes et des agents infectieux (Figure 2). En effet, la déforestation facilite les rencontres rendant plus fréquents les contacts entre les populations animales et les populations humaines, facilitant ainsi les échanges d'agents infectieux (Keesing *et al.* 2010). L'implantation d'élevages de porcs à proximité de vergers fréquentés par des chauves-souris frugivores, suite à la modification de leur habitat naturel, a par exemple été à l'origine de l'émergence du virus Nipah en Malaisie en 1998 (Chua *et al.* 1999). L'accroissement de la taille des populations humaines dans les zones urbaines et

l'amplification des échanges internationaux favorisent également la propagation des agents infectieux à l'échelle mondiale (Figure 3) (Morse 1995 ; Morse *et al.* 2012).

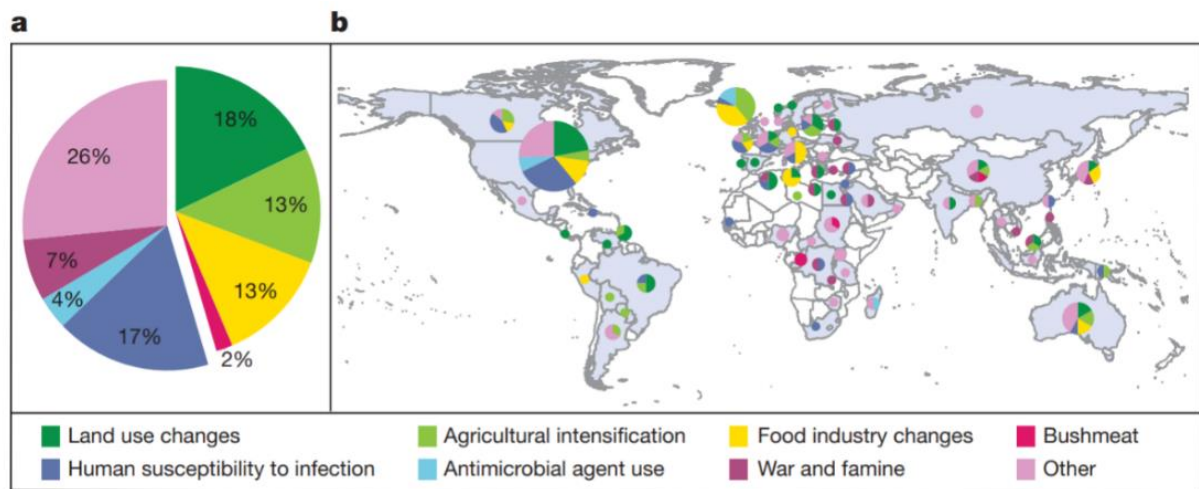


Figure 2. Exemples de facteurs d'émergences de zoonoses chez l'Homme (1940-2005) (Keesing *et al.* 2010).

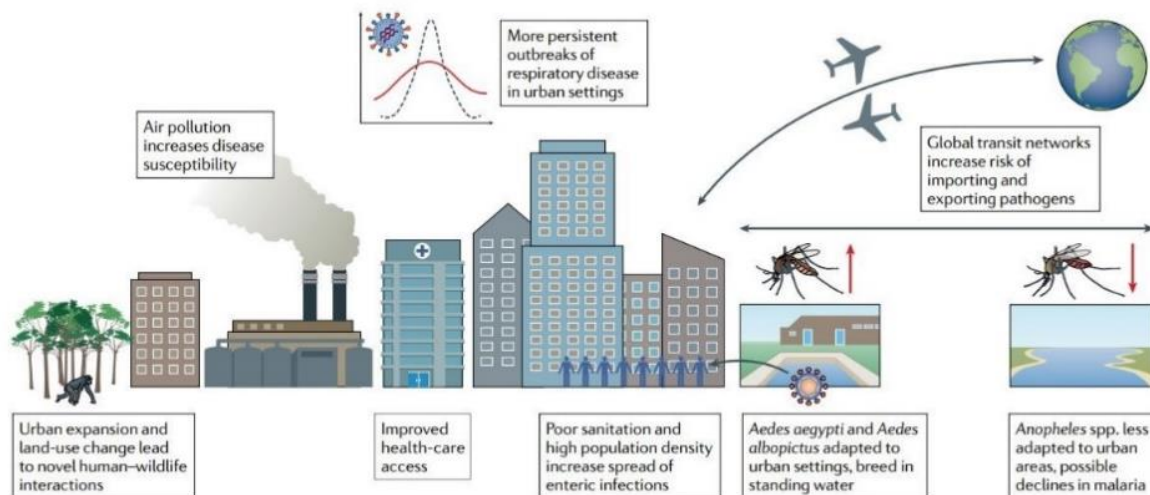


Figure 3. Exemple d'impacts des activités humaines (ici l'urbanisation) sur les maladies infectieuses (Baker *et al.* 2021).

1.1.4. Étapes de l'émergence des zoonoses

L'émergence de zoonoses est un phénomène complexe faisant intervenir de multiples étapes et obstacles (Wolfe *et al.* 2007 ; Morens et Fauci 2012 ; Plowright *et al.* 2017) (Figure 4). La propagation de l'agent infectieux du réservoir naturel vers l'Homme exige qu'il puisse franchir l'ensemble de ces obstacles (Plowright *et al.* 2017). Par conséquent, l'émergence de zoonoses reste un phénomène relativement rare, bien que les populations humaines soient constamment exposées à de nombreux

agents infectieux provenant d'autres espèces (Plowright *et al.* 2017 ; Parrish *et al.* 2008).

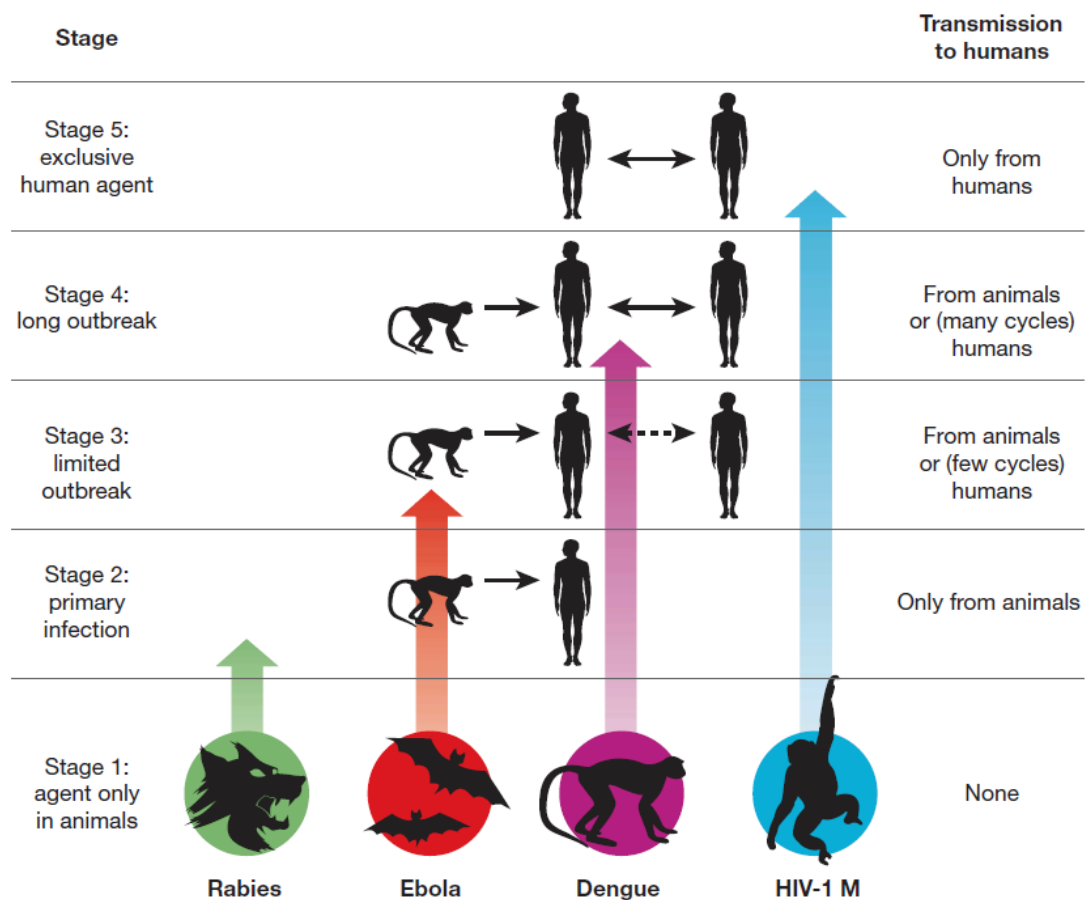


Figure 4. Illustration des principales étapes de l'émergence d'un agent infectieux (Wolfe *et al.* 2007). Les quatre agents infectieux représentés ont atteint différentes étapes du processus.

Lors de la première étape (ou pré-émergence), l'agent infectieux est exclusivement retrouvé au sein de l'espèce réservoir (sauvage ou domestique) (Wolfe *et al.* 2007). Au cours de cette phase, il peut arriver qu'il y ait une amplification de la circulation de l'agent infectieux entre individus de l'espèce (Morse *et al.* 2012). Ces modifications dans les dynamiques de transmission peuvent être reliées à des perturbations dans l'écologie de l'espèce, par exemple sous l'influence de facteurs anthropiques (*e.g.* changements liés à l'utilisation des terres). La seconde étape du processus, pouvant correspondre à une émergence localisée (Morse *et al.* 2012), est un franchissement de la barrière d'espèce par l'agent infectieux depuis l'animal vers l'Homme, on parle d'infection primaire (Wolfe *et al.* 2007 ; Morse *et al.* 2012). Elle peut découler d'un contact direct avec un animal infecté, ou avec des fluides corporels

contaminés. Cette transmission peut faire intervenir les espèces réservoirs de l'agent infectieux, mais également des hôtes intermédiaires faisant le lien entre les espèces réservoirs et l'Homme. C'est par exemple le cas du virus Nipah, cité précédemment, responsable d'une maladie sévère comprenant des symptômes respiratoires et neurologiques chez l'Homme, et apparu pour la première fois en 1998 en Malaisie, pour lequel la transmission des chauves-souris à l'Homme se serait effectuée par l'intermédiaire du porc (*Sus domesticus*) (Chua *et al.* 1999 ; Chua 2000). Après cette phase d'infection primaire, suit une phase de transmission interhumaine au cours de quelques cycles avant de disparaître (Wolfe *et al.* 2007). C'est par exemple le cas du virus Ébola qui cause des épidémies souvent très localisées et qui peuvent être rapidement endiguées (Wolfe *et al.* 2007). *A contrario*, une phase de transmissions interhumaines peut persister en parallèle à de nouvelles transmissions entre animal et Homme (Wolfe *et al.* 2007). Enfin, vient la dernière étape du processus (l'émergence pandémique) où la transmission de l'agent infectieux d'Homme à Homme et la diffusion du pathogène se font à une large échelle, souvent appuyées par les échanges internationaux (Morse *et al.* 2012). À ce stade, l'agent infectieux d'origine animale a pu accumuler de nombreuses modifications favorisant son adaptation à l'Homme (Wolfe *et al.* 2007). C'est par exemple le cas du VIH-1, originellement issu du virus de l'immunodéficience simienne (VIS) présent chez les primates, et qui aujourd'hui est devenu un virus exclusivement humain (Wolfe *et al.* 2007 ; Etienne et Peeters 2010).

I.2. Les chauves-souris, réservoirs de maladies infectieuses émergentes

I.2.1. Caractéristiques biologiques et écologiques

Les chauves-souris (Ordre : *Chiroptera*) sont les seuls mammifères capables de voler dans le règne animal. Elles ont une origine ancienne, probablement de la période de l'Éocène (il y a environ 50 millions d'années). Plus de 1400 espèces ont été décrites à ce jour (Teeling 2005 ; Simmons 2019), représentant 20% des espèces de mammifères. C'est le second ordre le plus diversifié en terme de richesse spécifique dans cette classe, après celui des rongeurs (Ordre : *Rodentia*) (Wang 2009 ; Simmons 2005). Elles ont la particularité de pouvoir voler sur de grandes distances, parfois supérieures à 2000 km, ce qui a pu au cours de l'histoire évolutive leur conférer la capacité de coloniser de nombreux territoires. Elles sont ainsi présentes sur

l'ensemble des continents à l'exception des régions polaires et de quelques îles océaniques (Schipper *et al.* 2008). Leur régime alimentaire est varié. On recense par exemple des chauves-souris insectivores, frugivores, nectarivores, hématophages, et parfois piscivores. Les chauves-souris peuvent nicher ou hiberner dans des habitats naturels (e.g. cavités, crevasses rocheuses, nids d'oiseaux, arbres), mais également dans des constructions humaines (e.g. ponts, tombes, mines, maisons). Leurs colonies peuvent être formées de plusieurs milliers d'individus et parfois dépasser plusieurs centaines de milliers, voire millions d'individus. Une des plus grandes colonies de chauves-souris connue à ce jour est une colonie de Tadarides du Brésil (*Tadarida brasiliensis*) située dans la grotte Bracken aux États-Unis, estimée à près de 20 millions d'individus (McCracken 1989). Les chauves-souris possèdent également une longévité exceptionnelle par rapport à leur petite taille (Foley *et al.* 2018). Le Murin de Brandt (*Myotis brandtii*), espèce pouvant atteindre à peine plus de six grammes, détient le record avec une durée de vie pouvant atteindre les 40 ans (Podlutzky *et al.* 2005). Les chauves-souris ont par ailleurs un rôle environnemental important et fournissent de nombreux services écosystémiques. Elles participent par exemple à la régulation des populations de ravageurs de cultures. Il a été estimé qu'elles pourraient permettre des économies de 3,7 à 53 milliards de dollars chaque année au secteur agricole aux États-Unis (Boyles *et al.* 2011). Enfin, les chauves-souris participent activement à la dispersion des graines de nombreuses espèces végétales, à la pollinisation *via* la dispersion de pollens, mais aussi à la fertilisation des sols (Kasso et Balakrishnan 2013 ; Boyles *et al.* 2011).

1.2.2. Les chauves-souris, réservoirs d'agents infectieux

Au sein de la faune sauvage, les chauves-souris sont connues comme étant des réservoirs naturels d'agents infectieux. Elles sont porteuses de bactéries (e.g. bactéries leptospires *Leptospira* sp., bactéries du genre *Bartonella* sp.) (Dietrich *et al.* 2015a ; Veikkolainen *et al.* 2014), de champignons (e.g. *Pseudogymnoascus destructans*) (Hoyt *et al.* 2021), de nématodes (e.g. les vers plats *Lecithodendrium linstowi* et *Pycnoporos heteroporus*) (Lord *et al.* 2012), ou encore de virus (e.g. virus de la rage) (Calisher *et al.* 2006). Malgré cette diversité, les virus restent les agents infectieux les plus documentés chez ces mammifères, et feront l'objet de notre attention dans cette thèse. Au total, plus de 200 virus ont été identifiés chez les chauves-souris. Parmi eux, certains ont été impliqués dans des émergences dans les

populations humaines, provoquant des pathologies sévères (e.g. virus Marburg, virus Nipah, virus Ébola) (Smith et Wang 2013 ; Moratelli et Calisher 2015). Au cours de ces dernières décennies, les résultats émanant des nombreuses études investiguant la circulation de virus chez les chauves-souris, ont renforcé l'idée qu'elles représentent un problème majeur de santé publique, parfois au détriment de leur conservation (López-Baucells *et al.* 2018). Une étude récente, mettant en évidence une corrélation positive entre la richesse spécifique au sein des ordres de mammifères et la richesse en virus zoonotiques, confirme que les chauves-souris sont potentiellement porteuses d'un grand nombre de virus pouvant être transmis à d'autres espèces vertébrées, dont l'Homme (Johnson *et al.* 2020).

Les chauves-souris sont dans la majorité des cas porteuses asymptomatiques de ces nombreux virus, c'est-à-dire que ces virus sont capables de se multiplier au sein de leurs organismes sans entraîner, *a priori*, d'effets sur leur physiologie et leur survie (Calisher *et al.* 2006). Cette aptitude pourrait être expliquée par de nombreux facteurs. Les chauves-souris appartiennent à un ordre ancien (Teeling 2005). Cette ancienneté pourrait être à l'origine d'une longue histoire de coévolution entre ces mammifères et les virus hébergés (Cui *et al.* 2019 ; Chan *et al.* 2013). Ainsi, sur une échelle évolutive relativement longue, les chauves-souris auraient développé une tolérance à certaines infections, et à certaines charges virales conséquentes, alors que pour d'autres espèces ces infections s'avèreraient létales (Calisher *et al.* 2006 ; O'Shea *et al.* 2014). Par ailleurs, la capacité des chauves-souris à voler serait à l'origine d'une baisse de leur réponse inflammatoire, et leur conférerait un système immunitaire atypique, les rendant insensibles à ces infections (Subudhi *et al.* 2019). De plus, le mode de vie des chauves-souris pourrait également être un des facteurs de maintien et de transmission des virus au sein des colonies. En effet, comme décrit précédemment, ces mammifères ont la particularité de former des colonies dont les effectifs et les densités sont très élevés. La promiscuité des individus favorise l'échange et la transmission d'agents infectieux (Luis *et al.* 2013). C'est notamment le cas dans les colonies de maternité, où plusieurs études ont pu mettre en avant l'amplification de ces échanges (Dietrich *et al.* 2015b ; Drexler *et al.* 2011). Enfin, cette capacité à voler sur de grandes distances pourrait également être à l'origine de la dispersion d'agents infectieux. Par exemple, en Europe, une étude a suggéré que les

migrations de la Pipistrelle de Nathusius (*Pipistrellus nathusii*) pourraient être un des mécanismes de dispersion du virus de la rage (Brosset 1990).

1.2.3. Virus zoonotiques associés aux chauves-souris

Parmi les 200 virus différents identifiés chez les chauves-souris (Smith et Wang 2013) certaines familles virales sont plus fréquemment documentées. Les séquences de génomes partiels ou complets de *Coronaviridae* (39%), de *Rhabdoviridae* (24%), de *Paramyxoviridae* (9%), et d'*Astroviridae* (6%), représentent la majorité des données génétiques disponibles à ce jour (Figure 5), soulignant un biais important dans les recherches portant sur les communautés virales associées aux chauves-souris. Ce biais reflète l'effort de détection envers les familles virales à potentiel zoonotique d'intérêt médical. De manière similaire, certaines familles de chauves-souris sont plus souvent investiguées que d'autres, car elles sont reconnues comme étant les réservoirs naturels de certains virus d'intérêt médical (e.g. investigation de *Filoviridae* au sein des chauves-souris du genre *Pteropus*, famille des Pteropodidae) (Chen *et al.* 2014 ; Database of bat-associated viruses 2021). Près de 90% des séquences de virus publiées à ce jour sont issues d'échantillons provenant de trois familles de chauves-souris : Vespertilionidae (44%), Rhinolophidae (21%), et Pteropodidae (21%) (Figure 6) (Chen *et al.* 2014 ; Database of bat-associated viruses 2021).

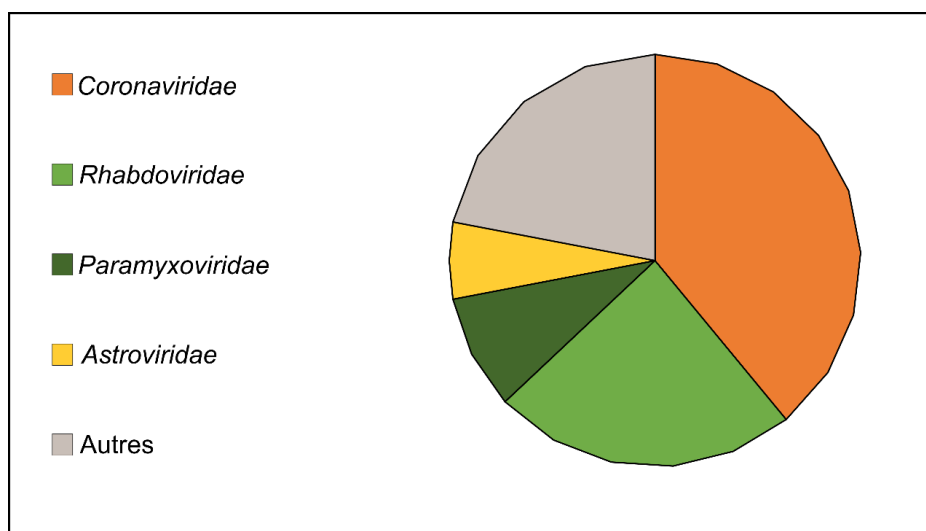


Figure 5. Proportion des familles virales les plus fréquemment documentées chez les chauves-souris. Synthèse faite à partir de la base de données « *Database of bat-associated viruses* » en décembre 2021 (Chen *et al.* 2014).

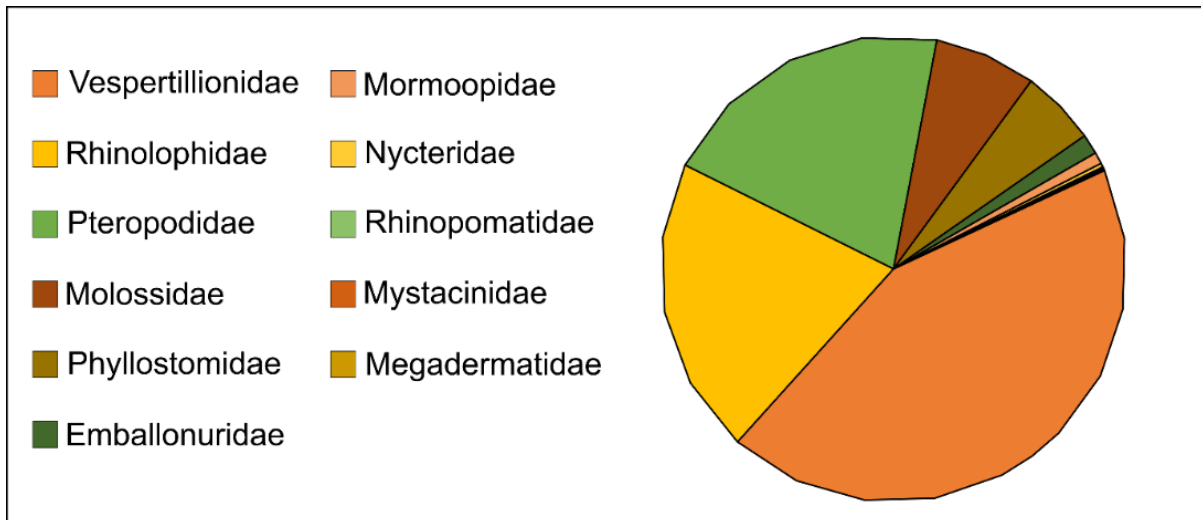


Figure 6. Proportion des familles de chauves-souris pour lesquelles des données génétiques virales sont disponibles. Synthèse faite à partir de la base de données « *Database of bat-associated viruses* » en décembre 2021 (Chen *et al.* 2014).

Dans les sections suivantes, nous nous intéresserons à la description des *Coronaviridae*, des *Paramyxoviridae* et des *Astroviridae*, spécifiquement étudiés dans le cadre de cette thèse.

1.2.3.1) Les Coronaviridae

La famille des *Coronaviridae* (coronavirus : CoV) regroupe des virus enveloppés à ARN simple brin de polarité positive. Cette famille est subdivisée en deux sous-familles : les *Letovirinae* et *Orthocoronavirinae*. Parmi les *Orthocoronavirinae* quatre genres sont recensés : *α-coronavirus*, *β-coronavirus*, *γ-coronavirus* et *δ-coronavirus* (Figure 7 et Figure 8) (Chan *et al.* 2013 ; Drexler *et al.* 2014 ; International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) 2021). Seuls les genres *α* et *β* sont spécifiques aux mammifères, bien que des *δ-coronavirus* aient été rapportés chez des porcs (Figure 7).

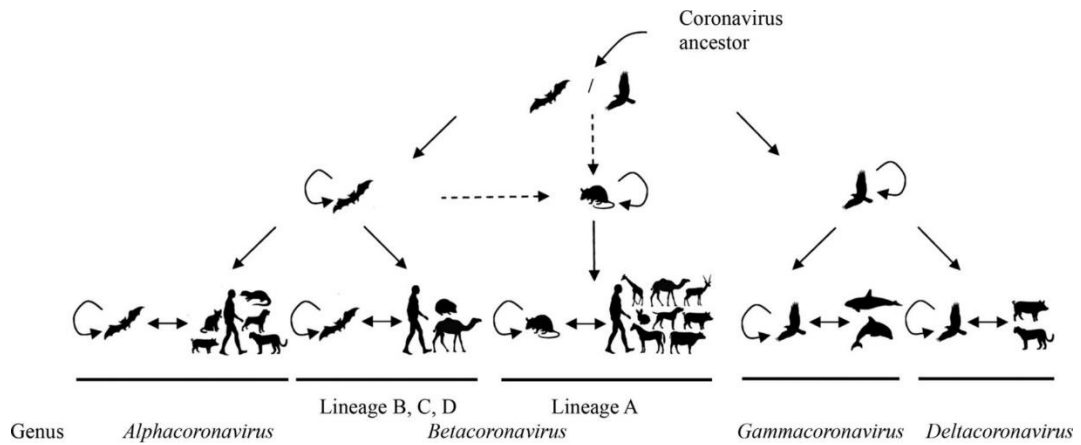


Figure 7. Origine des coronavirus et diversité des hôtes documentés (adapté de Chan *et al.* 2013).

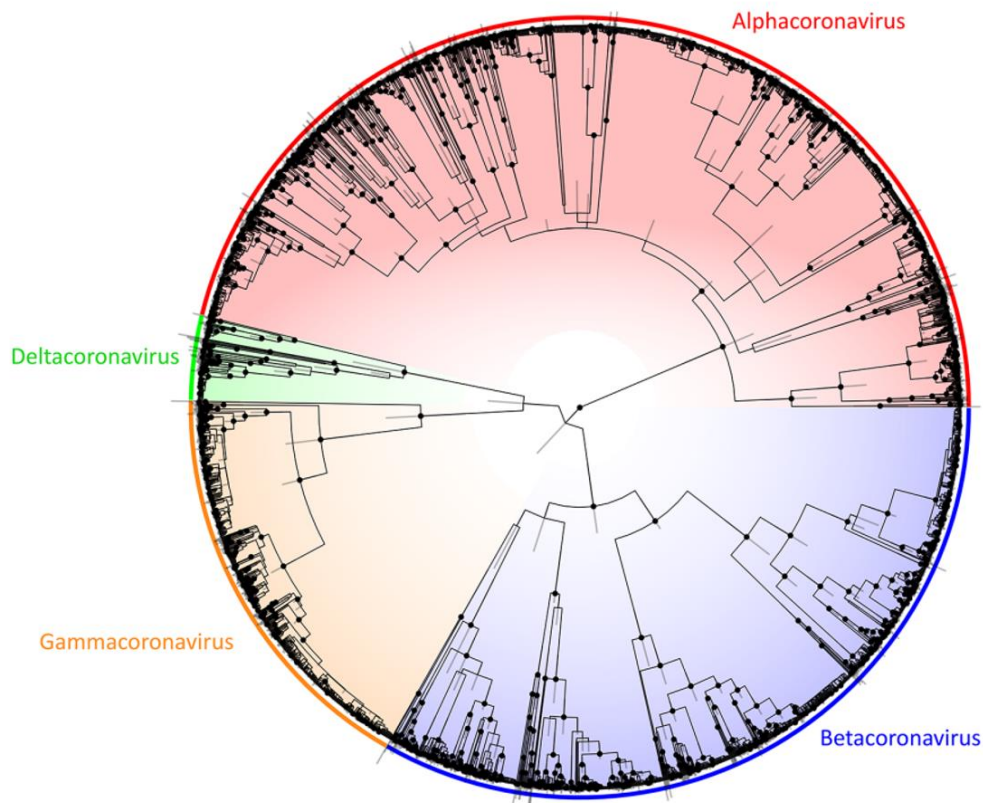


Figure 8. Relations phylogénétiques au sein des coronavirus (Wilkinson *et al.* 2020)

Les chauves-souris hébergent une grande diversité d' α -coronavirus et de β -coronavirus (e.g. Smith *et al.* 2016 ; Rizzo *et al.* 2017 ; Banerjee *et al.* 2019 ; Fan *et al.* 2019 ; Peel *et al.* 2019 ; Joffrin *et al.* 2020 ; Hernández-Aguilar *et al.* 2021 ; Bonilla-Aldana *et al.* 2021). Les coronavirus se transmettent principalement au travers d'aérosols contaminés par des particules infectieuses, mais peuvent également se transmettre par la voie fécale-orale. Ils sont responsables d'infections respiratoires ou

entériques (Saif 2004 ; Chan *et al.* 2013). Ces virus possèdent un taux moyen de mutations relativement élevé, de l'ordre de 10^{-4} substitutions par an et par site, mais sont également capables de recombinaisons (Lai *et al.* 1985 ; Keck *et al.* 1988 ; Zhang *et al.* 2005 ; Pyrc *et al.* 2006 ; Su *et al.* 2016). Ces particularités leur confèrent la capacité de se transmettre entre espèces différentes, mais également à l'Homme (Woo *et al.* 2009 ; Graham et Baric 2010). Au cours des deux dernières décennies, plusieurs coronavirus d'origine zoonotique et associés aux chauves-souris ont fait leur apparition dans les populations humaines. En 2002, le SARS-CoV, responsable de symptômes respiratoires voire de pneumonies sévères, a émergé en Chine dans la province du Guangdong, puis s'est propagé dans près de 30 pays, a infecté plus de 8000 personnes, et causé environ 800 décès. L'épidémie a été déclarée circonscrite par l'OMS à partir de juillet 2003 (World Health Organisation 2003). Le SARS-CoV aurait pour réservoir naturel les chauves-souris du genre *Rhinolophus* sp. (Li *et al.* 2005 ; Lau *et al.* 2005). Plusieurs études phylogénétiques ont mis en évidence la circulation de coronavirus présentant de fortes similarités avec le SARS-CoV chez ces chauves-souris. La civette masquée de l'Himalaya (*Paguma larvata*) aurait joué un rôle ponctuel d'hôte intermédiaire entre la chauve-souris et l'Homme lors de cette émergence. En 2012, un second coronavirus responsable du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (« *Middle East respiratory syndrome* » : MERS) et nommé MERS-CoV a fait son apparition en Arabie Saoudite, et s'est répandu dans plus de 25 pays. Aujourd'hui, des cas sporadiques sont encore signalés (European Centre for Disease Prevention and Control 2021a ; Food and agriculture organization of the United Nations 2021). Ce virus a infecté plus de 2000 personnes et causé plus de 700 décès, soit un taux de létalité très élevé (Food and agriculture organization of the United Nations 2021). Le MERS-CoV a été transmis à l'Homme par des camélidés, néanmoins, les chauves-souris pourraient être les hôtes de virus ancestraux proches du virus émergent (Reusken *et al.* 2014 ; Zumla *et al.* 2015). Plus récemment, un nouveau coronavirus, le SARS-CoV-2, a émergé. Responsable de la maladie à coronavirus 2019 (« *Coronavirus disease 2019* » : COVID-19), ce virus a été déclaré responsable d'une pandémie mondiale le 11 mars 2020, et cette dernière est encore en cours actuellement, en 2022. Cette pandémie sans précédent a provoqué plus de 500 millions d'infections déclarées et causé le décès de plus de six millions de personnes. L'origine du SARS-CoV-2 fait encore débat, cependant, de nombreux arguments soutiennent une origine zoonotique puisque des virus étroitement

apparentés ont été détectés chez les chauves-souris (Holmes *et al.* 2021 ; Wacharapluesadee *et al.* 2021 ; Temmam *et al.* 2021).

1.2.3.2) Les *Paramyxoviridae*

Les *Paramyxoviridae* (paramyxovirus : PMV) sont une grande famille de virus enveloppés à ARN simple brin de polarité négative. Cette famille est divisée en quatre sous-familles : les *Avulavirinae*, *Metaparamyxovirinae*, *Orthoparamyxovirinae*, et *Rubulavirinae*. Seuls les *Orthoparamyxovirinae* et *Rubulavirinae* peuvent affecter les mammifères (International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) 2021). Les paramyxovirus ont de nombreux modes de transmission : voie fécale-orale, aérosols, ou encore par contact avec des fluides corporels contaminés (*e.g.* urine). Ils sont responsables de symptômes et maladies diverses, par exemple des syndromes respiratoires, syndromes neurologiques, ou encore des troubles digestifs. Une grande diversité de PMV circule chez les chauves-souris à l'échelle mondiale (Figure 9) (Drexler *et al.* 2012).

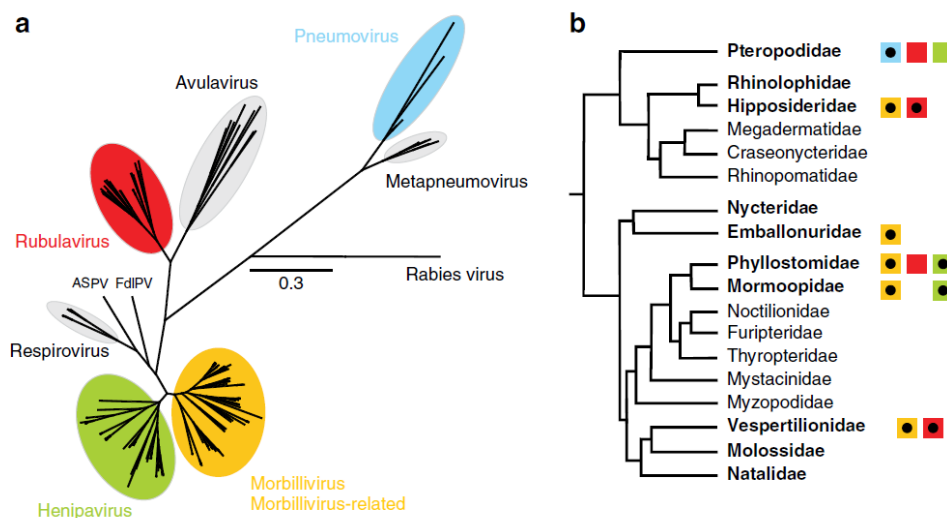


Figure 9. Diversité des paramyxovirus retrouvés chez les chauves-souris (Drexler *et al.* 2012). a) Les genres sont mis en évidence par des couleurs différentes. b) Les couleurs correspondant aux genres sont associées aux familles de chauves-souris dans lesquels ils ont été retrouvés.

Parmi les *Paramyxoviridae* hébergés par ces mammifères, deux virus sont connus pour avoir un impact significatif en termes de santé humaine. Ces deux virus appartiennent au genre des *Henipavirus*. Le virus Nipah, apparu pour la première fois chez l'Homme en Malaisie en 1998 est l'un d'entre eux. Bien que ce virus n'ait causé

que quelques épidémies en Asie et peu de cas, il peut être responsable de pathologies sévères. L'épidémie qui s'est déroulée de fin septembre 1998 à la mi-juin 1999 en Malaisie et à Singapour a affecté à la fois l'Homme et le porc (*Sus domesticus*). Près de 300 cas d'encéphalites ou de pathologies respiratoires ont été rapportés chez l'Homme et plus de 100 personnes en sont décédées (Chua *et al.* 1999). Chez le porc, les symptômes étaient essentiellement respiratoires, et plus d'un million d'animaux ont été abattus afin d'endiguer l'épidémie (Chua *et al.* 1999 ; Chua 2000). Des études ont pu mettre en évidence que les réservoirs naturels du virus Nipah sont les chauves-souris frugivores du genre *Pteropus* sp. (Yob *et al.* 2001). La transmission du virus entre ces dernières et les porcs se serait déroulée par contact direct avec des gouttelettes d'urine contaminées. La proximité des chauves-souris près des enclos présenterait un lien fort avec la perte des habitats naturels de ces espèces, les forçant à cohabiter à proximité des Hommes et de leurs infrastructures (Chua 2000). La transmission interhumaine a également été recensée bien que rare et restreinte au cadre familial (World Health Organisation 2021b). Depuis 1998, plusieurs épidémies ont été observées, notamment au Bangladesh et en Inde. En 2004, par exemple, ce virus a entraîné la mort d'une dizaine de personnes, suite à la consommation de jus de palmier dattier contaminé par des chauves-souris (Luby *et al.* 2006).

Le second virus nommé Hendra a été identifié pour la première fois dans une banlieue de Brisbane en Australie, dans le Queensland, en 1994, après le décès d'une vingtaine de chevaux et de deux personnes (Selvey *et al.* 1995 ; Murray *et al.* 1995). La même année, une seconde épidémie de Hendra a été signalée dans la ville de Mackay également localisée dans le Queensland. Durant cette seconde épidémie, deux chevaux et une personne sont décédés (Field *et al.* 2001). Ce virus est responsable de pathologies respiratoires ou neurologiques sévères chez ces deux hôtes. Comme pour le virus Nipah, bien que le nombre de cas soit faible, le taux de létalité est élevé (Ong et Wong 2015). La transmission des chevaux à l'Homme se serait faite principalement par l'exposition directe à des fluides corporels, tissus ou excréments contaminés. La transmission interhumaine n'a pas été décrite (Center for Disease Control and Prevention 2019). Des études ont révélé que les réservoirs naturels du virus sont des chauves-souris frugivores du genre *Pteropus* sp. (Halpin *et al.* 2000 ; Daszak *et al.* 2011 ; Drexler *et al.* 2012). La transmission du virus des chauves-souris aux chevaux se serait effectuée au travers de la contamination de la

nourriture des chevaux par des excréta de chauves-souris comme la salive, les urines ou encore des fèces (Plowright *et al.* 2011). Depuis 1994, plusieurs contaminations au virus Hendra ont été de nouveau observées, cantonnées principalement à l'état du Queensland en Australie. En juillet 2016, l'OMS faisait état de près de 50 épisodes infectieux, impliquant plus de 70 chevaux et près d'une dizaine de cas humains (World Health Organisation 2021c) avec un pic d'occurrence en 2011 (Plowright *et al.* 2014).

1.2.3.3) Les *Astroviridae*

La famille des *Astroviridae* (astrovirus : AstV) héberge des virus non-enveloppés à ARN simple brin de polarité positive. Cette famille est divisée en deux genres, *Avastrovirus* et *Mamastrovirus*, infectant respectivement des espèces aviaires et des espèces mammifères (Figure 10) (Mendez et Arias 2007 ; International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) 2021).

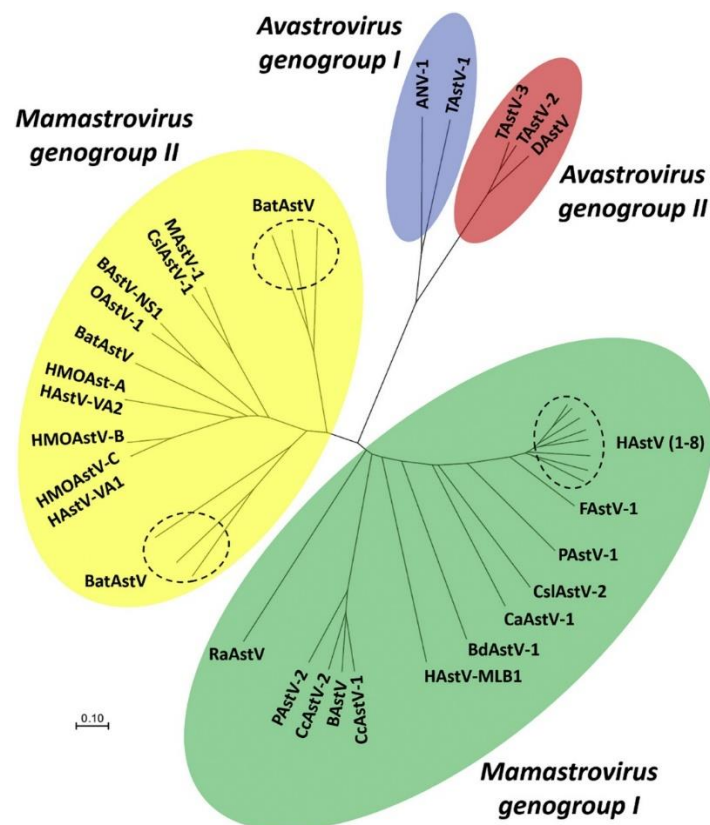


Figure 10. Relations phylogénétiques au sein des astrovirus (Wohlgemuth *et al.* 2019).

Ces virus sont transmis par la voie oro-fécale et peuvent être responsables de maladies entériques, principalement chez les jeunes enfants (De Benedictis *et al.* 2011 ; Bosch *et al.* 2014). Les astrovirus ont été décrits chez plus de 80 espèces de

vertébrés (Mendenhall *et al.* 2015). Plusieurs études ont mis en évidence la circulation de ces virus au sein de chauves-souris à l'échelle mondiale (Fischer *et al.* 2017) (Figure 11). À ce jour, aucun astrovirus de chauves-souris n'a été identifié comme responsable de maladies chez l'Homme. En revanche, des infections causées par des astrovirus aviaires et canins ont été détectées chez l'Homme, de façon ponctuelle, et suggèrent que des événements de transmission inter-espèces sont potentiellement sous-estimés à l'heure actuelle (Meyer *et al.* 2015). Par ailleurs, de nombreux animaux domestiques (*e.g.* chiens, chats), d'élevage (*e.g.* porcs, moutons, canards), ou commensaux à l'Homme (*e.g.* rats, pigeons, moineaux) ont été identifiés comme hôtes d'astrovirus (Donato et Vijaykrishna 2017). Le risque d'émergence et d'épidémie causées par des astrovirus d'origine zoonotique nécessite d'acquérir d'avantage de connaissances sur l'éco-épidémiologie et l'évolution de ces virus au sein des réservoirs (Bosch *et al.* 2014 ; Mendenhall *et al.* 2015).

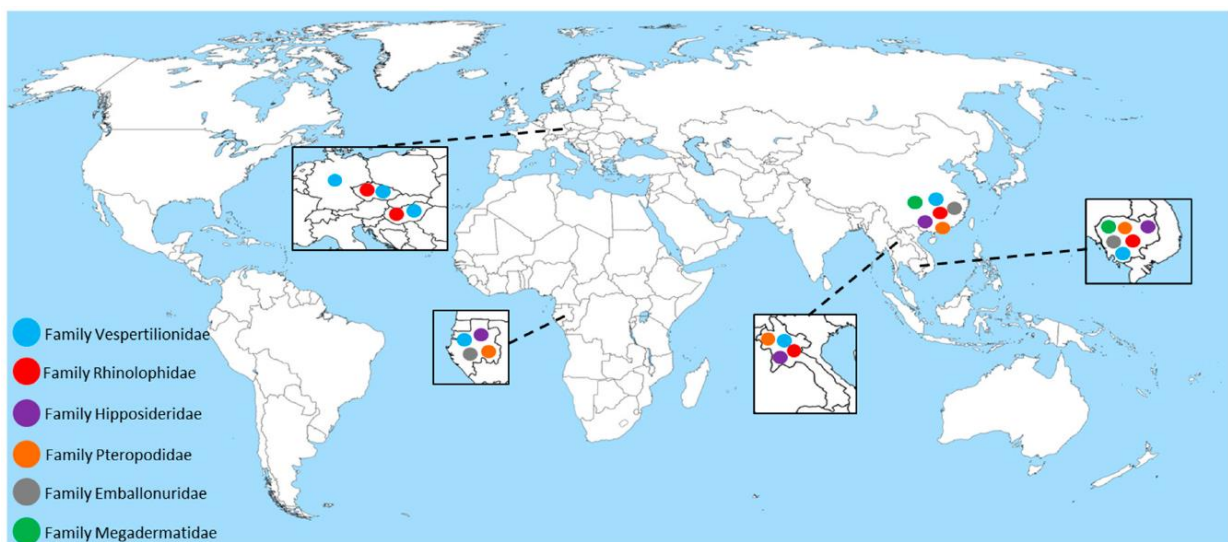


Figure 11. Distribution géographique des sites d'étude rapportant la détection d'astrovirus chez les chauves-souris (Fischer *et al.* 2017). Les familles de chauves-souris dans lesquelles ont été détectés les astrovirus sont représentées par des cercles de couleurs.

1.2.4. Modes de transmission des agents infectieux des chauves-souris à l'Homme

Les modes de transmission des agents infectieux des chauves-souris à l'Homme sont multiples (Figure 12) (Allocati *et al.* 2016 ; Joffrin *et al.* 2018). La transmission peut être directe, bien qu'anecdotique, elle peut par exemple se faire lors de morsures ou de griffures. Lors de la manipulation de chauves-souris sans protection physique adéquate, il peut arriver que celles-ci mordent pour se défendre. Ces

morsures accidentelles peuvent être à l'origine de la transmission de certains agents infectieux tels que les lyssavirus (Dato *et al.* 2016). Par ailleurs, les chauves-souris sont consommées dans plusieurs régions d'Afrique, d'Asie, mais aussi dans certaines îles du sud-ouest de l'océan Indien, entraînant un risque de transmission directe de pathogènes (Jenkins et Racey 2009 ; Han *et al.* 2015). Une enquête épidémiologique a mis en évidence que l'épidémie de maladie à virus Ébola ayant sévi en 2007 en République Démocratique du Congo, et ayant engendré près de 200 décès, aurait pour origine la consommation de viande de chauves-souris frugivores (notamment l'Hypsignathe Monstrueux : *Hypsignathus monstrosus*, et le Chien Volant de Franquet : *Epomops franqueti*), chassées massivement pour leurs apports protéiques (Leroy *et al.* 2005 ; 2009). De même, la transmission d'agents infectieux zoonotiques pourrait aussi se produire lors de la capture ou de la vente de ces animaux (Han *et al.* 2015).

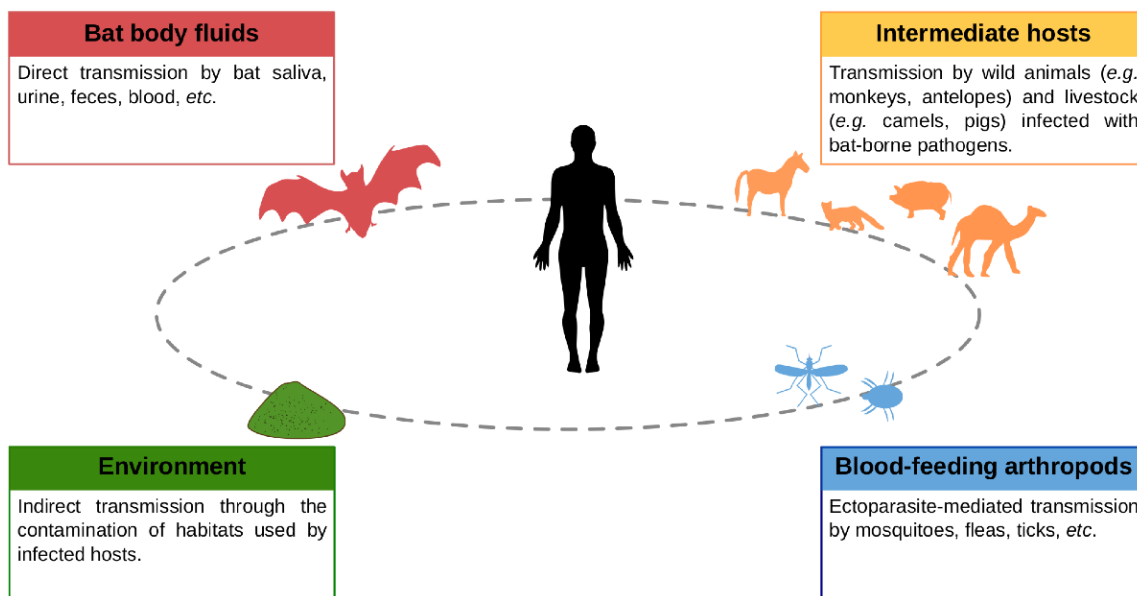


Figure 12. Voies de transmission possibles des pathogènes de chauves-souris à l'Homme (Joffrin *et al.* 2018).

La transmission des agents infectieux de chauves-souris peut également se produire de manière indirecte. Par exemple, les contaminations par contacts avec les déjections telles que l'urine et les fèces, ou à d'autres fluides corporels, sont connues pour être un mécanisme important de transmission des pathogènes (Joffrin *et al.* 2018). Ainsi, plusieurs cas de personnes infectées par le virus Marburg, responsable de fièvres hémorragiques, après une exposition à des déjections de chauves-souris

dans des grottes, suggèrent une transmission par des aérosols (Adjemian *et al.* 2011). La transmission indirecte peut également se produire lors de la consommation de denrées alimentaires contaminées par des fluides infectés. Comme évoqué plus tôt, la consommation de jus de palmier dattier contaminé, a été à l'origine de la transmission du virus Nipah à l'Homme (Luby *et al.* 2006 ; Rahman *et al.* 2012). Par ailleurs, bien que moins investiguée, la transmission d'agents infectieux entre chauves-souris et Hommes pourrait également s'effectuer par le biais de vecteurs. Par exemple, des bactéries *Bartonella mayotimonensis* identifiées comme agent étiologique d'endocardites chez l'Homme ont été détectées en Finlande dans le sang périphérique de Murins de Daubenton (*Myotis daubentonii*) ainsi que chez leurs ectoparasites suggérant que les chauves-souris pourraient être un réservoir de ces bactéries zoonotiques (Veikkolainen *et al.* 2014). Bien que les mécanismes de transmissions restent à être précisés, les ectoparasites pourraient jouer un rôle de vecteurs. Enfin, la transmission indirecte peut également faire intervenir un hôte dit « *intermédiaire* » entre l'espèce hôte réservoir, et l'Homme. Le SARS-CoV (hôte intermédiaire : civette masquée), le virus Nipah (hôte intermédiaire : le porc), et le virus Hendra (hôte intermédiaire : les chevaux) évoqués plus tôt en sont des illustrations (Li *et al.* 2005 ; Lau *et al.* 2005 ; Reusken *et al.* 2014 ; Chua *et al.* 1999 ; Chua 2000 ; Plowright *et al.* 2011).

I.3. Les chauves-souris et leurs virus dans le sud-ouest de l’océan Indien

I.3.1. Diversité des chauves-souris dans la région

La région du sud-ouest de l’océan Indien (SOOI) est composée d’un ensemble d’îles (Figure 13) qui diffèrent par leurs âges, leurs origines géologiques, leurs conditions environnementales, l’histoire et le contexte socio-économique des populations. La région fait également partie des 34 points chauds de biodiversité (Myers *et al.* 2000). Au sein de ces îles, on retrouve notamment Madagascar, l’archipel

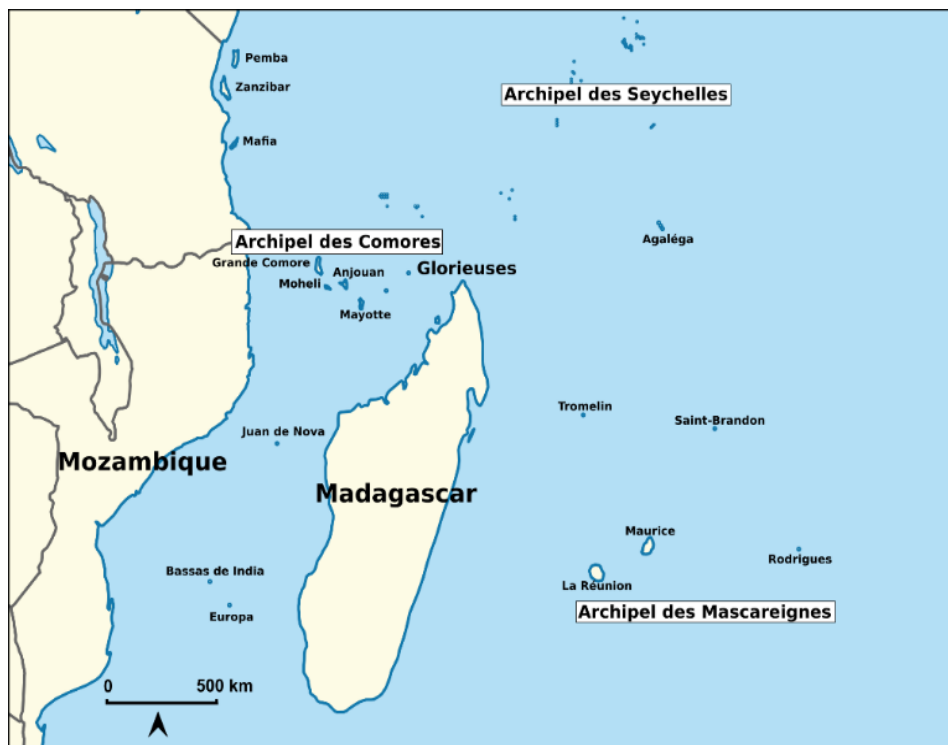


Figure 13. Carte représentant les différentes îles de la région du sud-ouest de l'océan Indien. Carte créée à partir du logiciel libre QGIS version 3.22.1 et annotée manuellement via le logiciel libre Inkscape version 1.1.2.

des Comores, l’archipel des Seychelles, l’archipel des Mascareignes, et enfin les îles Éparses (Figure 13). Plusieurs de ces territoires ont été colonisés par les chauves-souris. Le SOOI abrite près de la moitié des familles de chauves-souris décrites dans le monde, avec de surcroît un taux d’endémisme important (e.g. O’Brien 2011 ; Goodman 2011 ; Goodman *et al.* 2012a ; Goodman et Ramasindrazana 2015 ; Goodman *et al.* *Sous presse*). Cependant, en raison de la diversité de l’histoire géologique de la région, des différences marquées sont observées en termes de diversité spécifique entre les îles.

I.3.1.1) Madagascar

Madagascar est une île continentale qui s'est séparée de l'Afrique il y a environ 130 millions d'années. C'est la plus grande île de la région. Elle est divisée en cinq zones bioclimatiques caractérisées par des régimes météorologiques différents (e.g. sec, humide, montagnard, subaride, subhumide) (Goodman *et al.* 2013), et compte près de 14 types de végétations allant des mangroves côtières, formations buissonnantes, jusqu'aux différents types de forêts (Moat et Smith 2007). La diversité de ces biomes et l'âge ancien de l'île lui confèrent une grande richesse spécifique en termes de flore et de faune, mais également de forts taux d'endémisme (Cardiff et Jenkins 2016). Ainsi, Madagascar compte 46 espèces de chauves-souris réparties dans huit familles différentes, dont près de 85% sont endémiques

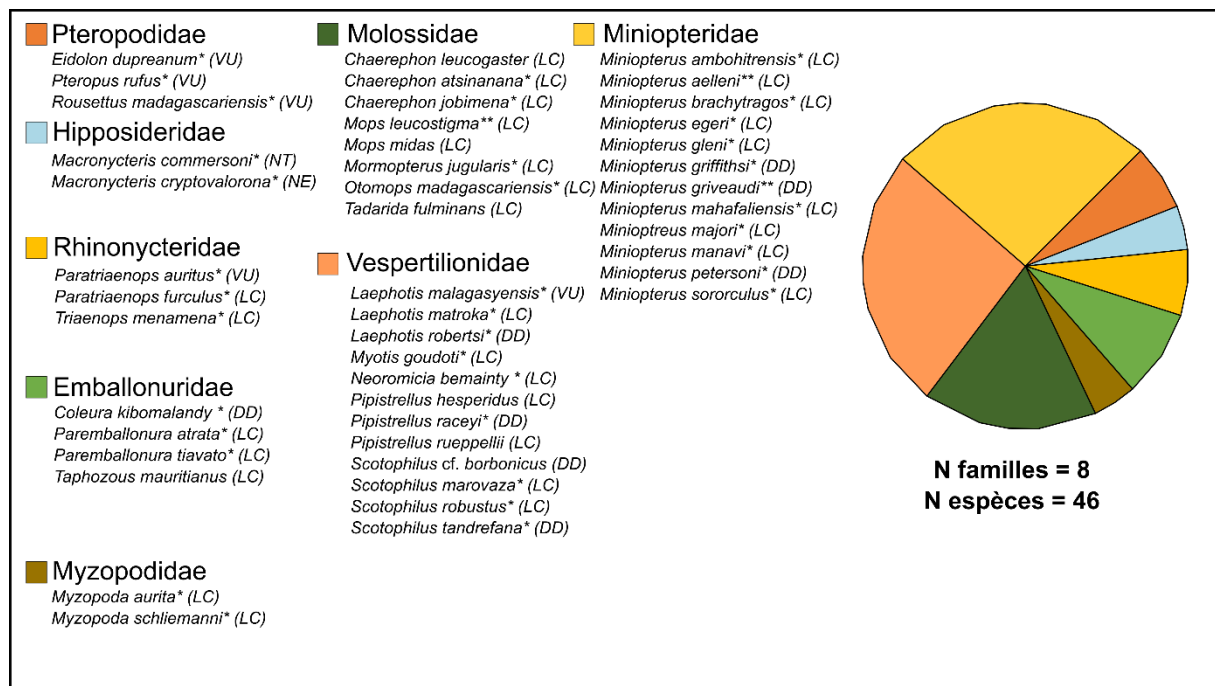


Figure 14. Familles et espèces de chauves-souris décrites à Madagascar, et statuts de conservation associés (Construit à partir de : Goodman 2011 ; Goodman *et al.* 2011 ; Goodman, *et al.* 2012a ; Goodman *et al.* 2012b ; Goodman *et al.* 2015 ; Goodman et Ramasindrazana 2015 ; Goodman *et al.* 2016 ; Demos *et al.* 2021). Les étoiles simples indiquent les espèces endémiques de Madagascar, les étoiles doubles indiquent les espèces endémiques de Madagascar et de l'Archipel des Comores. Les lettres entre parenthèses indiquent le statut de conservation selon l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature. DD : données insuffisantes ; LC : préoccupation mineure ; NE : non évalué ; NT : quasi menacé ; VU : vulnérable (International Union for Conservation of Nature (IUCN) 2021).

(Figure 14) (Goodman 2011 ; Goodman *et al.* 2011 ; Goodman *et al.* 2012a ; Goodman *et al.* 2012b ; Goodman *et al.* 2015 ; Goodman et Ramasindrazana 2015 ; Goodman *et al.* 2016 ; Demos *et al.* 2021 ; Goodman *et al.* *Sous presse*). Régulièrement, de

nouvelles espèces, ou des espèces cryptiques qui n'étaient pas auparavant reconnues comme des espèces distinctes, y sont décrites (Christidis *et al.* 2014 ; Goodman *et al.* 2015 ; Cardiff et Jenkins 2016). Au cours de ces dernières décennies, Madagascar a dû faire face à des changements environnementaux majeurs, liés aux activités humaines. Entre 1953 et 2004, 44% de la couverture forestière naturelle a disparu (Vieilledent *et al.* 2018) et environ 90% des espèces Malgaches dépendent des écosystèmes naturels et des forêts (Allnutt *et al.* 2008 ; Goodman et Benstead 2005). Entre 1953 et 2000, la déforestation a contribué à l'extinction de près de 10% des espèces Malgaches (Allnutt *et al.* 2008), et les forêts restantes sont très fragmentées, ce qui accroît la perte de biodiversité (Gibson *et al.* 2013 ; Murcia 1995). Néanmoins, parmi les 46 espèces de chauves-souris décrites à ce jour, 65% ont un statut de conservation correspondant à une préoccupation mineure selon l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN) (Figure 14) (International Union for Conservation of Nature (IUCN) 2021). Malgré tout, cinq espèces sont classées vulnérables (Figure 14) : la Roussette Paillée de Madagascar (*Eidolon dupreanum*), le Renard Volant de Madagascar (*Pteropus rufus*), la Roussette de Madagascar (*Rousettus madagascariensis*), le Triénope doré (*Paratriaenops auritus*), et la Sérotine de l'Isalo (*Laephotis malagasyensis*). Une espèce est classée comme quasi menacée : la Phyllorhine de Commerson (*Macronycteris commersoni*) ; et une autre a un statut de conservation non évalué : la Phyllorhine cryptide de Madagascar (*Macronycteris cryptovalorona*) (Figure 14). Ces espèces sont principalement menacées par les pressions anthropiques exercées sur l'environnement (e.g. perturbation des colonies, chasse) (Goodman 2011 ; International Union for Conservation of Nature (IUCN) 2021). Enfin, huit espèces présentent des données insuffisantes pour établir leur statut de conservation (Figure 14) : l'Emballonure de Madagascar (*Coleura kibomalandy*), la Sérotine de Robert (*Laephotis robertsi*), la Pipistrelle de Racey (*Pipistrellus raceyi*), la Scotophile de La Réunion (*Scotophilus cf. borbonicus*), la Scotophile de l'ouest de Madagascar (*Scotophilus tandrefana*), le Minioptère de Griffiths (*Miniopterus griffithsi*), le Minioptère de Griveaud (*Miniopterus griveaudi*), et le Minioptère de Peterson (*Miniopterus petersoni*). Parmi ces espèces, nombreuses ont été nouvellement décrites, rendant difficile l'évaluation du risque d'extinction (Goodman 2011). Madagascar est l'île qui comporte la plus grande richesse spécifique du SOOI, bien que la diversité spécifique dans la partie est de l'île soit plus faible que dans la partie ouest (Goodman *et al.* 2011 ; Cardiff et Jenkins 2016). Par comparaison, la richesse

spécifique en chauves-souris abritée à Madagascar est équivalente à celle de l'ensemble du continent Européen (Cardiff and Jenkins, 2016).

1.3.1.2) Archipel des Comores

L'archipel des Comores, d'origine volcanique, est constitué des îles de Grande Comore, Anjouan, Mohéli et Mayotte (Figure 13). L'âge de ces îles varie entre 0,5 et 10 millions d'années (Nougier *et al.* 1986). Ces quatre îles présentent des variations topologiques et climatiques importantes. Par exemple, sur Grande Comore, l'élévation géologique donne naissance à trois zones climatiques qui sont associées à différents patrons météorologiques et de végétation (Louette *et al.* 2004 ; Goodman *et al.* 2010). Au total, dix espèces de chauves-souris, appartenant à cinq familles ont été décrites dans l'archipel avec un taux d'endémisme de 70% (Figure 15) : la Roussette de Livingston (*Pteropus livingstonii*), la Roussette des Seychelles (*Pteropus seychellensis*), la Roussette des Comores (*Rousettus obliviosus*), le Taphien de Maurice (*Taphozous mauritanus*), le Molosse de Grandidier (*Chaerephon leucogaster*), le Tadaride (*Chaerephon pusillus*), le Grand Molosse Malgache (*Mops leucostigma*), le Minioptère d'Aellen (*Miniopterus aelleni*), le Minioptère de Griveaud (*Miniopterus griveaudi*), et le Murin d'Anjouan (*Myotis anjouanensis*) (Goodman *et al.* 2010). Au sein des quatre îles, des différences sont observées en termes de nombre de familles et d'espèces de chauves-souris. Anjouan est l'île qui abrite le plus grand nombre d'espèces, probablement dû à sa plus grande diversité écologique, son âge, ainsi que la présence de tunnels de lave pouvant abriter les chauves-souris (Figure 15) (Goodman *et al.* 2010). Parmi l'ensemble des espèces décrites dans l'archipel, cinq sont considérées comme préoccupation mineure d'un point de vue de la conservation selon l'UICN : la Roussette des Seychelles, le Taphien de Maurice, le Molosse de Grandidier, le Grand Molosse Malgache, et le Minioptère d'Aellen (Figure 15) (International Union for Conservation of Nature (IUCN), 2021). Néanmoins, deux espèces sont vulnérables : la Roussette des Comores et le Tadaride. Une espèce est en danger critique d'extinction : la Roussette de Livingston. Ces espèces souffrent principalement des pressions anthropiques (*e.g.* perturbation des colonies, chasse), mais également des changements environnementaux (*e.g.* déforestation, changements climatiques engendrant sécheresse et tempêtes) (Goodman *et al.* 2010 ; International Union for Conservation of Nature (IUCN) 2021). Enfin, deux espèces

présentent des données insuffisantes pour établir leur statut de conservation : le Minioptère de Griveaud, et le Murin d'Anjouan.

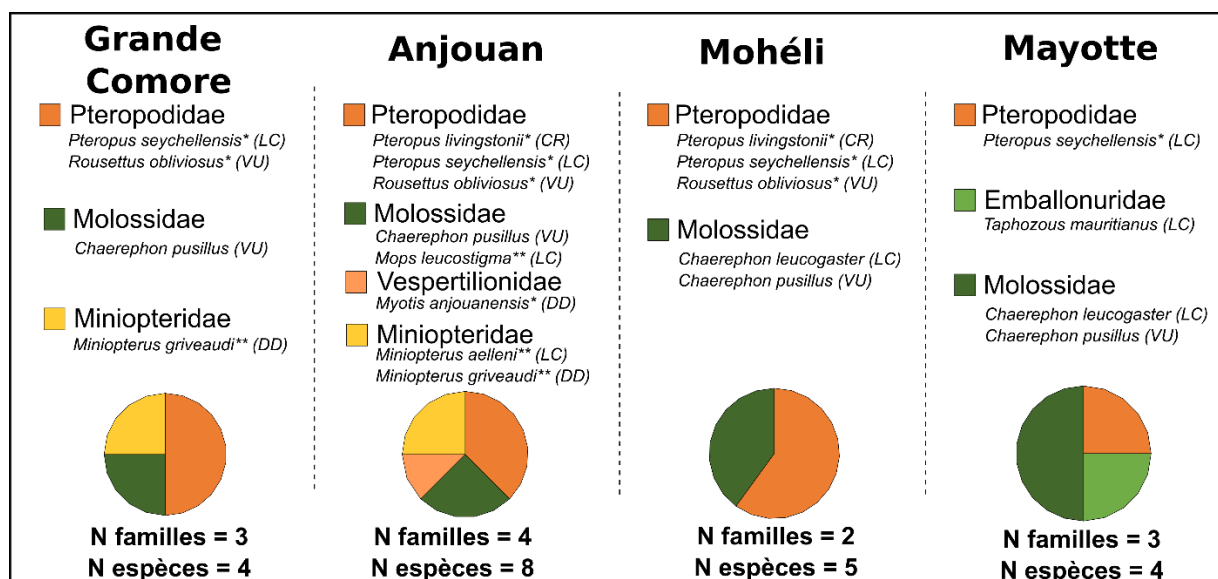


Figure 15. Familles et espèces de chauves-souris décrites dans l'Archipel des Comores, statuts de conservation associés (Construit à partir de : O'Brien 2011). Les étoiles simples indiquent les espèces endémiques de l'Archipel des Comores, les étoiles doubles indiquent les espèces endémiques de Madagascar et de l'Archipel des Comores. Les lettres entre parenthèses indiquent le statut de conservation selon l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature. CR: en danger critique ; DD : données insuffisantes ; LC : préoccupation mineure ; VU : vulnérable (International Union for Conservation of Nature (IUCN) 2021).

1.3.1.3) Archipel des Seychelles

L'archipel des Seychelles comptabilise au total 115 îles. Certaines sont d'origine continentale (granitique), comme Mahé ; et d'autres sont coralliennes, par exemple l'Île aux Oiseaux (« *Bird Island* »). Les îles d'origine continentale se sont séparées de l'Inde et de l'Afrique respectivement il y a 64 et 75 millions d'années (Warren *et al.* 2005). Les îles coralliennes, elles, sont apparues beaucoup plus récemment. Les îles granitiques, plus vieilles abritent près de cinq types de végétation différents allant des mangroves côtières aux différents types de forêts (e.g. végétation du plateau côtier, forêt de plaine, forêt intermédiaire) (Biedinger et Fleischmann 2000). Certaines îles de l'archipel hébergent des chauves-souris (O'Brien 2011). Au total, près de six espèces appartenant à quatre familles ont été décrites au sein de l'archipel avec un taux d'endémisme supérieur à 50% : la Roussette d'Aldabra (*Pteropus aldabrensis*), la Roussette des Seychelles (*Pteropus seychellensis*), le Triénope (*Paratriaenops pauliani*), l'Emballonure des Seychelles (*Coleura seychellensis*), le Taphien de Maurice

(*Taphozous mauritianus*) et le Tadaride (*Chaerephon pusillus*) (Figure 16) (O'Brien 2011). Parmi ces espèces, la Roussette des Seychelles et le Taphien de Maurice sont considérés comme préoccupation mineure d'un point de vue de la conservation (International Union for Conservation of Nature (IUCN) 2021). Le Tadaride est considéré vulnérable, l'Emballonure des Seychelles est en danger critique d'extinction, et la Roussette d'Aldabra est en danger d'extinction (International Union for Conservation of Nature (IUCN) 2021). Les menaces liées à l'introduction d'espèces invasives dans l'archipel, aux perturbations humaines, mais également aux changements climatiques (cyclones) pèsent sur ces espèces (International Union for Conservation of Nature (IUCN) 2021).

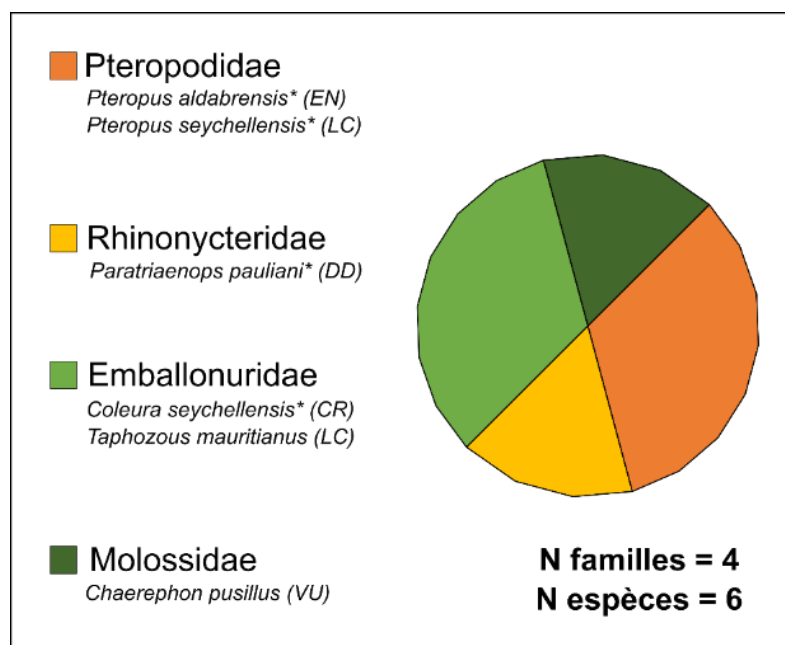


Figure 16. Familles et espèces de chauves-souris décrites dans l'Archipel des Seychelles, et statuts de conservation associés (Construit à partir de : O'Brien 2011). Les étoiles indiquent les espèces endémiques. Les lettres entre parenthèses indiquent le statut de conservation selon l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature. CR : en danger critique ; DD : données insuffisantes ; EN : en danger ; LC : préoccupation mineure ; VU : vulnérable (International Union for Conservation of Nature (IUCN) 2021).

1.3.1.4) Archipel des Mascareignes

L'archipel des Mascareignes, constitué de l'Île Maurice, de l'Île Rodrigues et de La Réunion (Figure 13), est âgé d'entre deux et quinze millions d'années. Les trois îles présentent des biomes très diversifiés, et de forts taux d'endémisme, que ce soit pour la faune ou pour la flore (Thébaud *et al.* 2019). Par rapport aux autres îles, l'archipel comptabilise une plus faible diversité d'espèces de chauves-souris. Au total, cinq espèces réparties dans trois familles sont recensées sur l'ensemble des trois îles, avec

près de 80% d'endémisme à l'échelle de l'archipel : la Roussette Noire (*Pteropus niger*), la Roussette de Rodrigues (*Pteropus rodricensis*), le Taphien de Maurice (*Taphozous mauritanus*), le Petit Molosse de La Réunion (*Mormopterus francoismoutoui*), et le Petit Molosse de Maurice (*Mormopterus acetabulosus*) (Figure 17) (O'Brien 2011). La Roussette Noire a disparu de La Réunion entre 1772 et 1801 probablement en raison des pressions anthropiques engendrant déforestation ainsi que surexploitation de l'espèce (Cheke et Dahl 1981 ; Nyhagen *et al.* 2005 ; Cheke et Hume 2008 ; Jenkins *et al.* 2008 ; Caceres 2010). Suite à sa disparition, des observations ponctuelles d'individus morts ou volants isolés provenant probablement de Maurice, emportés par les vents cycloniques, ont été faites (e.g. de 2000 à 2007 près d'une dizaine d'observations) (Caceres 2010). Depuis 2007, des individus formant de petits groupes (entre 5 et 10 chauves-souris), ont été régulièrement observés (Caceres 2010). À ce jour, une centaine d'individus a été recensé sur l'île (Fourasté, 2019). Néanmoins, l'origine de la recolonisation reste indéterminée, et pourrait être d'origine naturelle (portage d'individus par des vents cycloniques), ou d'origine anthropique (volontaire ou non) (Caceres 2010). À Maurice, la Roussette Noire, espèce frugivore, est accusée de provoquer des dégâts dans les vergers de l'île (Florens 2016 ; Oleksy *et al.* 2021). Des campagnes d'abattages massifs ont été entreprises par le gouvernement et ont contribué à réduire de moitié la population de cette espèce en moins de trois ans entre 2015 et 2018 (> 50000 individus tués) (Florens 2016 ; Vincenot *et al.* 2017 ; Kingston *et al.* 2017). Parmi les espèces de l'archipel, deux sont classées comme préoccupation mineure d'un point de vue de la conservation : le Petit Molosse de La Réunion et le Taphien de Maurice (International Union for Conservation of Nature (IUCN) 2021). Les trois autres espèces sont classées en danger d'extinction (International Union for Conservation of Nature (IUCN) 2021). Ces espèces sont fortement impactées par les activités anthropiques (urbanisation, tourisme, chasse), par l'introduction d'espèces invasives sur les territoires concernés, ainsi que par les changements climatiques (cyclones) (International Union for Conservation of Nature (IUCN) 2021).

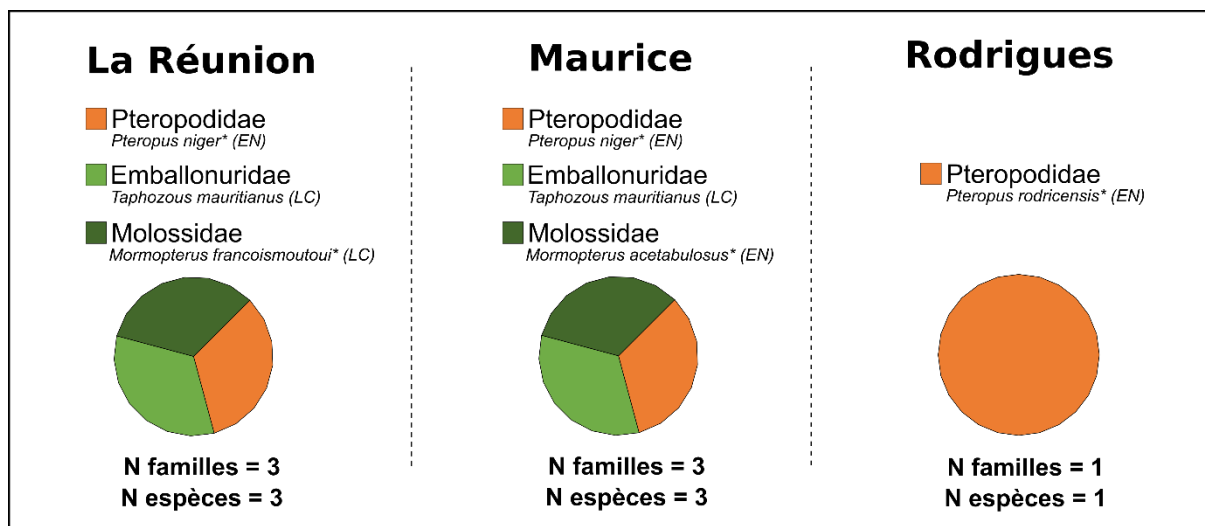


Figure 17. Familles et espèces de chauves-souris décrites dans l'Archipel des Mascareignes, et statuts de conservation associés (Construit à partir de : O'Brien 2011). Les étoiles indiquent les espèces endémiques. Les lettres entre parenthèses indiquent le statut de conservation selon l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature. EN : en danger ; LC : préoccupation mineure (International Union for Conservation of Nature (IUCN) 2021).

1.3.2. Virus associés aux chauves-souris des îles du sud-ouest de l'océan Indien

Plusieurs études visant à décrire la diversité des agents infectieux associés aux chauves-souris, ainsi que leur histoire évolutive dans un contexte insulaire tropical, ont été réalisées au cours de la dernière décennie. Les données portant sur la détection des coronavirus, paramyxovirus et astrovirus au sein des chauves-souris de Madagascar, de l'Archipel des Comores, de l'Archipel des Seychelles, et de l'Archipel des Mascareignes, ont été synthétisés en annexe (Annexe 1). Par ailleurs, les connaissances relatives à la circulation de virus chez les mammifères de l'île de Madagascar ont été synthétisées dans un chapitre de la seconde édition de « *The new natural history of Madagascar* » (Hoarau *et al.* Sous presse).

1.3.2.1) Madagascar

À Madagascar, la présence d'une grande diversité de coronavirus appartenant aux genres α - et β -coronavirus a été mise en évidence chez six espèces de chauves-souris (Razanajatovo *et al.* 2015 ; Joffrin *et al.* 2020). Les α -coronavirus ont été détectés chez le Tadaride de Madagascar (*Mormopterus jugularis*), le Triénope Roussâtre (*Triaenops menamena*), et le Molosse de Midas (*Mops midas*) (Joffrin *et al.* 2020). Les β -coronavirus ont été détectés chez le Renard Volant de Madagascar (*Pteropus rufus*), la Roussette Paillée de Madagascar (*Eidolon dupreanum*), et la

Roussette de Madagascar (*Rousettus madagascariensis*) (Razanajatovo *et al.* 2015 ; Joffrin *et al.* 2020). Un fort signal de co-évolution a été détecté suggérant une association entre familles de chauves-souris et coronavirus (Joffrin *et al.* 2020).

La présence d'une grande diversité de paramyxovirus apparentés au genre *Morbillivirus* a également été mise en évidence (Wilkinson *et al.* 2012 ; Mélade *et al.* 2016a). Les prévalences d'infection varient en fonction des études, des espèces, et des régions, avec une circulation plus marquée au sein des espèces insectivores (Mélade *et al.* 2016a). En plus des 16 espèces pour lesquelles des paramyxovirus ont été détectés par PCR, deux études ont rapporté la présence d'anticorps dirigés contre des paramyxovirus appartenant au genre *Henipavirus*, chez les trois espèces de chauves-souris frugivores, et ce, dans plusieurs régions de l'île (e.g. Ankarana, Marovoay, Moramanga). Notamment, des anticorps dirigés contre le virus Hendra, le virus Nipah, le virus Cedar, et le virus Tioman ont été détectés (Iehlé *et al.* 2007 ; Brook *et al.* 2019). Des variations saisonnières des séroprévalences au virus Nipah ont été mises en évidence, spécifiquement pour les femelles du Renard Volant (*Pteropus rufus*), et de la Roussette Paillée (*Eidolon dupreanum*), avec notamment une augmentation des taux de détection au cours de la gestation (Brook *et al.* 2019).

Des astrovirus appartenant au genre des *Mamastrovirus* ont été détectés au sein d'échantillons prélevés dans les régions d'Ambohitantely et d'Anjohibe à Madagascar (Lebarbenchon *et al.* 2017). Au total, six espèces de chauves-souris se sont révélées positives : le Triénope Roussâtre (*Triaenops menamena*), le Minioptère de Griveaud (*Miniopterus griveaudi*), le Triénope de Trouessart (*Paratriaenops furculus*), le Murin de Madagascar (*Myotis goudoti*), le Minioptère de Glen (*Miniopterus gleni*), et la Roussette de Madagascar (*Rousettus madagascariensis*). Une grande diversité génétique et un faible degré d'association hôte-virus ont été relevés (Lebarbenchon *et al.* 2017).

Une étude menée chez les espèces de chauves-souris frugivores de Madagascar a révélé la présence d'anticorps dirigés contre des filovirus (*Filoviridae*). Par exemple, des anticorps dirigés contre le *Zaire ebolavirus* (plus connu sous le nom de virus Ébola) ont été découverts dans des sérums de Renards Volants (*Pteropus rufus*) et de Roussettes de Madagascar (*Rousettus madagascariensis*), mais pas chez les Roussettes Paillées (*Eidolon dupreanum*) (Brook *et al.* 2019). Cette étude a mis en évidence une variation saisonnière marquée de la séroprévalence pour ce virus, tant

à l'échelle des individus que des populations. Chez les femelles de Renards Volants (*Pteropus rufus*), une plus grande détection d'anticorps a été rapportée au cours de la période de gestation, suivi d'une diminution après la parturition. Les auteurs de l'étude ont également suggéré l'existence d'une immunité maternelle (Brook *et al.* 2019).

Enfin, deux études ont souligné la circulation de différents lyssavirus (famille des *Rhabdoviridae*) chez des chauves-souris capturées dans différentes régions de Madagascar (e.g. Antananarivo, Antsiranana, Mahajanga) (Reynes *et al.* 2011 ; Mélade *et al.* 2016b). Des anticorps dirigés contre le lyssavirus Européen de chauves-souris 1 (« *European bat lyssavirus 1* » : EBLV1) ont été détectés chez deux espèces : la Phyllorhine de Commerson (*Macronycteris commersoni*) et le Renard Volant de Madagascar (*Pteropus rufus*) (Reynes *et al.* 2011 ; Mélade *et al.* 2016b). Des anticorps dirigés contre le virus Duvenhage (DUUV) ont été détectés chez huit espèces : la Phyllorhine de Commerson (*Macronycteris commersoni*), le Minioptère du Nord de Madagascar (*Miniopterus ambohitrensis*), le Minioptère de Griveaud (*Miniopterus griveaudi*), le Molosse de Grandidier (*Chaerephon leucogaster*), le Tadaride de Madagascar (*Mormopterus jugularis*), le Molosse à grandes oreilles de Madagascar (*Otomops madagascariensis*), la Roussette de Madagascar (*Rousettus madagascariensis*) et le Renard Volant de Madagascar (*Pteropus rufus*) (Mélade *et al.* 2016b). Des anticorps dirigés contre le virus Lagos de chauves-souris (« *Lagos bat virus* » : LBV) ont été détectés chez neuf espèces : le Minioptère de Griveaud (*Miniopterus griveaudi*), le Grand Molosse Malgache (*Mops leucostigma*), le Tadaride de Madagascar (*Mormopterus jugularis*), le Molosse à grandes oreilles de Madagascar (*Otomops madagascariensis*), la Roussette de Madagascar (*Rousettus madagascariensis*), le Renard Volant de Madagascar (*Pteropus rufus*), la Roussette Paillée de Madagascar (*Eidolon dupreanum*), le Triénope Roussâtre (*Triaenops menamena*), et le Murin de Madagascar (*Myotis goudoti*) (Reynes *et al.* 2011 ; Mélade *et al.* 2016b). Les séroprévalences varient significativement en fonction des espèces, des types de gîtes (grottes, gîtes synanthropiques, ou forêts) et des régions bioclimatiques de l'île (Mélade *et al.* 2016b). Bien que ces études sérologiques suggèrent la circulation de ces virus, la présence d'ARN viral n'a pas été détectée chez les chauves-souris (Reynes *et al.* 2011 ; Mélade *et al.* 2016b).

I.3.2.2) Archipel des Comores

Dans l'archipel des Comores, une étude a mis en évidence la présence d'ARN de coronavirus appartenant au genre *α-coronavirus* dans des échantillons issus de Tadarides (*Chaerephon* sp. et *Chaerephon pusillus*) à Mayotte (Joffrin *et al.* 2020). Par ailleurs, des paramyxovirus appartenant au genre des *Morbillivirus* ont été détectés dans des échantillons de Minioptère de Griveaud (*Miniopterus griveaudi*) à Anjouan et Grande Comore, avec une mise en évidence de co-infection par deux paramyxovirus génétiquement distincts. Aucun des échantillons obtenus chez les Roussettes des Comores (*Rousettus obliviosus*) et les Tadarides (*Chaerephon pusillus*) capturés sur ces deux mêmes îles n'ont été testés positifs pour ces virus (Wilkinson *et al.* 2012). Une étude investiguant la présence d'astrovirus à Mayotte n'a pas détecté la présence d'ARN de ces virus parmi les échantillons de Roussettes des Seychelles (*Pteropus seychellensis*), ni de ceux de Tadarides (*Chaerephon pusillus*), potentiellement du fait d'un échantillonnage trop limité (Hoarau *et al.* 2018). Comme à Madagascar, une étude a mis en évidence une circulation de lyssavirus sur la base d'une détection d'anticorps dirigés contre les lyssavirus LBV et DUUV (Mélade *et al.* 2016b) à Anjouan, chez les Tadarides (*Chaerephon pusillus*) mais pas chez le Minioptère de Griveaud (*Miniopterus griveaudi*), et à Mayotte, chez le Molosse de Grandidier (*Chaerephon leucogaster*) et La Roussette des Seychelles (*Pteropus seychellensis*) (Mélade *et al.* 2016b).

I.3.2.3) Archipel des Seychelles

Aux Seychelles, aucun des échantillons de Roussette des Seychelles (*Rousettus seychellensis*) prélevés sur Mahé, n'a été testé positif à la présence d'ARN de coronavirus (Joffrin *et al.* 2020). Par ailleurs, aucune étude n'a été publiée sur la recherche et la détection de paramyxovirus ou astrovirus chez les chauves-souris de cet archipel. En revanche, des anticorps dirigés contre les lyssavirus EBLV1, DUUV et LBV ont été mis en évidence chez la Roussette des Seychelles (*Rousettus seychellensis*) (Mélade *et al.* 2016b).

I.3.2.4) Archipel des Mascareignes

Sur l'île Maurice, aucun des échantillons de Petit Molosse (*Mormopterus acetabulosus*), de Roussette Noire (*Pteropus niger*), et de Taphien de Maurice

(*Taphozous mauritanus*), n'ont été testés positifs à la présence d'ARN de coronavirus (Joffrin *et al.* 2020), bien que ce résultat soit basé sur un échantillonnage limité. Cependant, des paramyxovirus apparentés au genre des *Morbillivirus*, ont été détectés chez le Petit Molosse (*Mormopterus acetabulosus*) (Wilkinson *et al.* 2012). De même, des anticorps dirigés contre les lyssavirus EBLV1, DUUV et LBV ont été détectés chez le Petit Molosse (*Mormopterus acetabulosus*) et la Roussette Noire (*Pteropus niger*) (Mélade *et al.* 2016b). Aucune investigation de la circulation de virus chez la Roussette de Rodrigues (*Rousettus rodricensis*) n'a été réalisée à ce jour.

À La Réunion, un seul génotype de coronavirus appartenant au genre α -coronavirus a été décrit chez le Petit Molosse (*Mormopterus francoismoutoui*) (Joffrin *et al.* 2020 ; 2022) (Annexe 2). Une étude longitudinale a rapporté des variations saisonnières marquées dans les dynamiques d'infection de ce virus au sein d'une colonie de maternité, et ce sur deux saisons de reproduction (Joffrin *et al.* 2022). L'étude a suggéré que les femelles gestantes et les juvéniles pouvaient être à l'origine des variations observées. Plusieurs génotypes de paramyxovirus apparentés au genre des *Morbillivirus* ont également été détectés chez cette même espèce et dans la même colonie (Dietrich *et al.* 2015b). Cette étude a aussi suggéré le rôle de la saisonnalité de la reproduction dans la transmission des paramyxovirus. Par ailleurs, de l'ARN d'astrovirus appartenant aux genres des *Avastrovirus* et *Mamastrovirus* a été détecté dans des échantillons environnementaux (guano) collectés à l'entrée d'une colonie de Petits Molosses de La Réunion, suggérant la circulation de ces virus chez cette espèce (Joffrin *et al.* 2021). Enfin, des anticorps dirigés contre les lyssavirus EBLV1, DUUV et LBV, ont été détectés chez cette même espèce (Mélade *et al.* 2016b). Aucune investigation n'a été réalisée à ce jour sur les deux autres espèces de chauves-souris de l'île.

I.4. Objectifs des travaux de thèse

L'investigation de la circulation de virus zoonotiques au sein des chauves-souris du sud-ouest de l'océan Indien a mis en exergue la diversité des virus présents dans la région. Certains d'entre eux appartiennent à des familles virales présentant un enjeu pour la santé humaine et animale. Cependant, les données acquises jusqu'à présent se limitent souvent à des études transversales, et se focalisant sur une unique famille virale. L'objectif général de cette thèse est d'approfondir les connaissances sur

l'épidémiologie de plusieurs familles virales dans les communautés de chauves-souris du SOOI, en se focalisant sur le rôle des co-infections et l'importance de la dynamique temporelle de la structure des populations.

Dans le Chapitre I, nous nous sommes tout d'abord intéressés aux co-infections. Après une synthèse de la littérature scientifique sur cette thématique, nous nous sommes focalisés spécifiquement sur la fréquence des co-infections entre coronavirus, paramyxovirus et astrovirus. Ainsi, une étude transversale a été réalisée sur près d'une trentaine d'espèces de chauves-souris de la région du SOOI. En raison de la forte prédominance des co-infections dans les populations naturelles d'animaux sauvages, et en raison du tropisme intestinal commun pour ces trois virus, nous avons fait l'hypothèse de l'existence de co-infections et d'interactions entre virus. Pour mener cette étude, nous nous sommes appuyés sur une bio-banque d'échantillons disponibles dans l'UMR PIMIT afin de détecter, par biologie moléculaire, la présence de ces virus. Les objectifs étaient de (i) réaliser une méta-analyse de la co-circulation des CoV-PMV-AstV, et (ii) de tester si des interactions pourraient exister entre les familles virales étudiées.

Dans le Chapitre II, nous nous sommes focalisés sur les dynamiques temporelles de co-infection par ces trois virus, au sein d'une espèce de chauve-souris endémique de La Réunion, le Petit Molosse (*Mormopterus francoismoutoui*). Pour cela, notre étude a ciblé deux colonies de maternité dans lesquelles la structure de la population évolue de manière marquée au cours du temps. Ces deux colonies ont été suivies à une échelle de temps fine (toutes les deux à cinq semaines) sur quatre saisons de reproduction consécutives, correspondant à près de 70 sorties de terrain. En raison de la saisonnalité marquée de la reproduction chez cette espèce ainsi que des fortes variations dans la taille et la densité de population des deux colonies, nous avons fait l'hypothèse de l'existence de variations dans les prévalences d'excrétion virale en lien avec la démographie. Les objectifs étaient (i) de mettre en évidence des liens entre l'évolution de la dynamique démographique et les dynamiques d'infection, (ii) de comparer les patrons d'infection entre virus et entre colonies, et (iii) de tester la présence de co-infections et d'interactions entre virus.

Dans le Chapitre III, nous nous sommes attachés à développer un modèle épidémiologique de la dynamique d'infection aux coronavirus chez le Petit Molosse de La Réunion. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur des données

épidémiologiques et démographiques. La dynamique d'infection aux coronavirus chez le Petit Molosse est caractérisée par une variation significative des prévalences d'infection au cours de la saison de reproduction. Étant donné que des pics d'infection répétables entre saisons sont observés, nous avons fait l'hypothèse de l'existence d'un lien entre l'évolution de la structure de la population et la présence d'individus sensibles à ces moments précis. Les objectifs de cette partie étaient de (i) développer un modèle épidémiologique intégrant la structure démographique de la population, et (ii) de tester l'impact de l'évolution de la structure de la population (classe d'âge, présence d'individus sensibles) sur la dynamique d'infection.

Une discussion générale clôture le manuscrit de thèse et se focalise sur les co-infections virales chez les chauves-souris, la saisonnalité de l'infection et les changements d'hôtes. La conclusion porte notamment sur les risques d'émergences d'agents infectieux suite aux contacts entre Hommes et chauves-souris en lien avec la conservation des espèces.

II. Chapitre I

**Co-infections dans la faune
sauvage : cas des chauves-souris
du sud-ouest de l'océan Indien**

II.1. Importance des co-infections dans l'épidémiologie des maladies infectieuses

II.1.1 Définition et incidence

Les co-infections (ou coinfections) sont définies par la présence simultanée au sein d'un même hôte d'au moins deux agents infectieux génétiquement différents (Cox 2001). Il peut s'agir d'agents infectieux de groupes taxonomiques différents, par exemple une bactérie et un virus ; mais aussi d'agents infectieux de même groupe taxonomique possédant des différences dans leurs génomes, par exemple plusieurs génotypes d'un même virus. Ainsi, cette définition peut englober différents termes synonymes dans la littérature, tels que : infection multiple, infection concomitante, ou encore poly-infection (Rigaud *et al.* 2010). En conditions naturelles, les co-infections sont très communes (Petney et Andrews 1998 ; Cox 2001 ; Rigaud *et al.* 2010 ; Vaumourin *et al.* 2015). La majorité des organismes vivants sont concernés. Par exemple, chez l'Homme, entre 30 et 80% des infections recensées dans certaines populations humaines, correspondraient à des co-infections (Petney et Andrews 1998 ; Vaumourin *et al.* 2015). Chez les campagnols agrestes (*Microtus agrestis*), une étude sur la co-infection par quatre agents infectieux (le parasite *Babesia microti*, un poxvirus, et les bactéries *Anaplasma phagocytophilum* et *Bartonella* spp.) a pu mettre en évidence que la prévalence d'animaux co-infectés pouvait atteindre 79% (Telfer *et al.* 2010). Bien que la fréquence des co-infections ait été documentée dans plusieurs systèmes biologiques, les conséquences physiologiques et épidémiologiques restent souvent méconnues.

II.1.2. Interactions entre agents infectieux

Les agents infectieux présents simultanément au sein d'un même hôte peuvent être assimilés par analogie à une communauté écologique, où chaque « espèce » interagit avec les autres (Pedersen et Fenton 2007). Ces interactions donnent naissance à un réseau plus ou moins complexe en fonction du nombre d'agents infectieux impliqués (Figure 18) (Telfer *et al.* 2010). Les interactions peuvent être directes, par exemple au travers de contacts physiques, ou indirectes par l'intervention de molécules de l'immunité ou de substances chimiques produites par les agents infectieux eux-mêmes (Pedersen et Fenton 2007 ; Bordes et Morand 2011). Les conséquences peuvent être positives (synergiques), lorsque la présence d'un agent infectieux facilite l'infection par les autres agents infectieux ; négatives (antagonistes)

lorsque la présence d'un agent infectieux inhibe l'infection et la réplication des autres agents infectieux ; ou neutres, lorsqu'il n'y a pas d'influence sur la présence des agents infectieux (Vaumourin *et al.* 2015). Chez les campagnols agrestes, la présence des quatre agents infectieux cités précédemment, est fortement conditionnée par un réseau d'interactions façonné par les présences ou absences des autres agents infectieux (Figure 18) (Telfer *et al.* 2010).

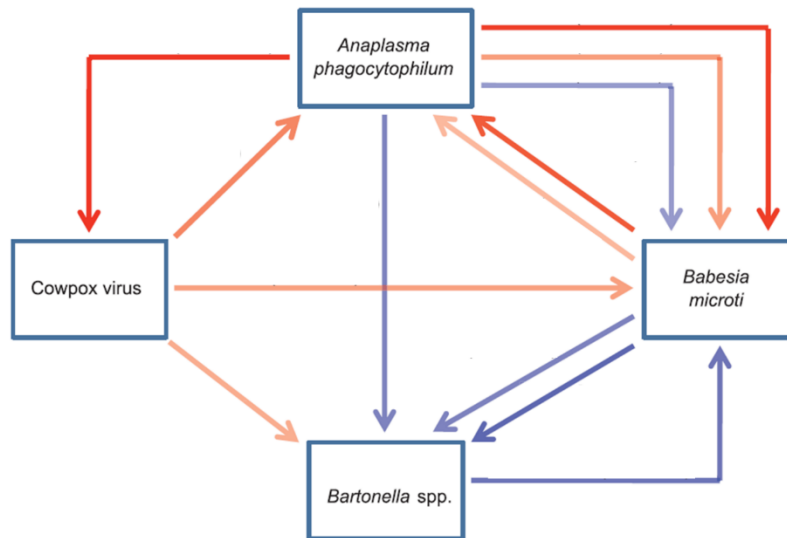


Figure 18. Réseau d'interactions au sein d'une communauté composée de quatre agents infectieux chez des campagnols agrestes (*Microtus agrestis*) (adapté de Telfer *et al.* 2010). Les associations positives sont représentées par des flèches rouges et les négatives par des flèches bleues. L'intensité des interactions est proportionnelle à l'intensité des couleurs.

II.1.3. Effets des co-infections sur les conditions physiologiques

Les infections multiples sont responsables d'un grand nombre de modifications concernant les conditions physiologiques des hôtes co-infectés. Ces effets découlent des interactions pouvant avoir lieu entre les agents infectieux (Vaumourin *et al.* 2015 ; Ezenwa 2016 ; Ezenwa *et al.* 2019 ; Graham *et al.* 2007). Les conséquences ne sont pas seulement la somme des effets que peuvent engendrer chacun des agents infectieux, mais le résultat d'une combinaison complexe d'effets connus et de nouveaux effets (Vaumourin *et al.* 2015 ; Alizon *et al.* 2013 ; Bordes et Morand 2011).

Les co-infections peuvent avoir de effets délétères allant de symptômes aberrants pour une maladie donnée, à la mort précipitée de l'individu co-infecté (Vaumourin *et al.* 2015). Par exemple, chez la souris (*Mus musculus*) la co-infection par des vers helminthes (*Heligmosomoides polygyrus*) et des bactéries respiratoires (*Bordetella bronchiseptica*) peut conduire à une augmentation de l'excrétion d'œufs de helminthes, de manière chronique, par rapport à une souris mono-infectée par les

helminthes (Lass *et al.* 2012). Chez le buffle d'Afrique (*Syncerus caffer*), les individus co-infectés par des nématodes (*e.g. Haemonchus* sp.) et la bactérie responsable de la tuberculose bovine (*Mycobacterium bovis*) meurent de manière précoce (Jolles *et al.* 2008).

A contrario, les co-infections peuvent avoir des conséquences positives pour l'hôte. Chez la rainette versicolore (*Hyla versicolor*), la co-infection entre helminthes (*Echinoparyphium* sp) et ranavirus engendre une diminution des charges virales par rapport aux individus mono-affectés par le virus (Wuerthner *et al.* 2017). Les co-infections « forcées » peuvent également avoir des effets bénéfiques pour l'hôte. La phagothérapie, utilisation de bactériophages dirigés contre des bactéries spécifiques et s'appuyant sur les réactions antagonistes, est un traitement prometteur face à l'émergence de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques (Reindel et Fiore 2017).

De manière plus générale, au-delà des conséquences sur les aspects physiologiques, les co-infections jouent un rôle clé dans les dynamiques infectieuses, au travers de leur action sur la sensibilité des hôtes, les probabilités d'infection et les taux de transmission (Vaumourin *et al.* 2015). Ainsi, les effets liés aux co-infections à l'échelle individuelle peuvent se répercuter à des échelles supérieures, comme au niveau populationnel et ou des communautés (Hellard *et al.* 2015) (Figure 19).

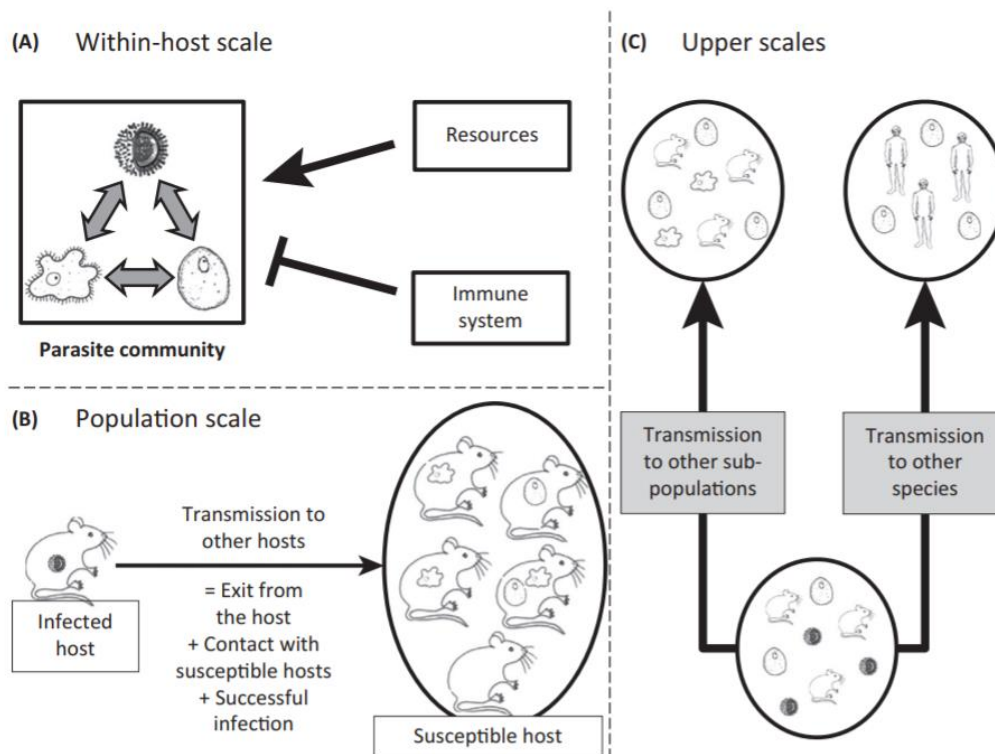


Figure 19. Différentes échelles d'interactions agent infectieux - agent infectieux (Hellard *et al.* 2015). a) À l'échelle de l'hôte, les agents infectieux peuvent interagir directement ou indirectement au travers de la compétition pour les ressources ou des réponses immunitaires de l'hôte. b) À l'échelle des populations, la transmission des agents infectieux est le résultat de plusieurs étapes clés. c) À l'échelle des méta-populations ou des communautés, la présence de plusieurs agents infectieux peut affecter la probabilité de transmission d'un agent infectieux donné à d'autres sous-populations de la même espèce ou d'espèces différentes.

II.1.4. Importance de l'investigation des co-infections en épidémiologie

Les facteurs environnementaux et biologiques ont un rôle clé dans les dynamiques d'infection spatio-temporelles. Par exemple, les comportements liés aux changements saisonniers (e.g. flux migratoires de plusieurs centaines d'individus), ainsi que les changements dans la structure des populations (e.g. introduction d'individus naïfs pour un agent infectieux au travers de naissances), affectent de manière significative les transmissions et dynamiques d'infection chez de nombreuses espèces animales (*cf.* chapitre suivant sur la saisonnalité de l'infection dans la faune sauvage) (Altizer *et al.* 2006). Comme décrit précédemment, les co-infections sont très communes dans les communautés et modifient profondément les dynamiques épidémiologiques. Néanmoins, elles restent peu investiguées en raison de la complexité des systèmes (grand nombre d'agents infectieux et interactions sous-jacentes complexes) (Hellard *et al.* 2015). Bien que difficile à appréhender, il est nécessaire de prendre en compte cette diversité naturelle d'agents infectieux au sein

des hôtes et de caractériser les interactions entre agents. Dans un contexte d'émergence de maladies zoonotiques, une meilleure connaissance des interactions ayant lieu entre agents infectieux au sein des réservoirs sauvages, apporterait des informations essentielles à la compréhension des processus épidémiologiques impliqués dans la transmission (Daszak 2000 ; Jones *et al.* 2008).

II.1.5. Approches pour étudier les co-infections

Les approches par lesquelles les co-infections peuvent être étudiées dans la faune sauvage sont classiques. Les étapes principales résident dans la collecte des échantillons, la détection des agents infectieux, et enfin l'analyse et l'interprétation des résultats. La collecte d'échantillons peut se faire au travers d'études transversales ou d'études longitudinales (Vaumourin *et al.* 2015). Les études transversales fournissent des informations sur la co-occurrence des agents infectieux au moment de l'échantillonnage, tandis que les études longitudinales présentent l'avantage de fournir des informations plus détaillées sur la dynamique de l'infection au sein des individus et des communautés au fil du temps. À ce jour, la majorité des études ciblant la présence de co-infections dans la faune sauvage s'est restreinte à certains types d'échantillons (*e.g.* urine, fèces). De plus, ces derniers ont été analysés avec des tests ciblés (*e.g.* PCR ou test sérologique), limitant l'interprétation des résultats (Petney et Andrews 1998 ; Bordes et Morand 2011). Le développement et l'amélioration de nouvelles approches comme la métagénomique, le séquençage de nouvelle génération et la bio-informatique offrent l'opportunité de décrire simultanément un grand nombre de pathogènes sans *a priori* (Hellard *et al.* 2015 ; Belak *et al.* 2013 ; Razzauti *et al.* 2015) et ouvrent de nouvelles perspectives par rapport aux approches traditionnelles. Le développement de modèles mathématiques permet également d'étudier les interactions entre agents infectieux et leurs conséquences épidémiologiques (Pedersen et Fenton 2007 ; Ezenwa 2016 ; Ezenwa *et al.* 2019). Enfin, des approches expérimentales *in vivo* ou encore la mise en place de mésocosmes (*i.e.* écosystèmes artificiels) permettent également d'étudier les co-infections en conditions contrôlées (Ezenwa 2016 ; Wuerthner *et al.* 2017).

II.1.6. Résumé de l'étude (Article 1)

Dans l'article présenté ci-après, nous faisons une synthèse non-exhaustive de la littérature concernant l'étude des co-infections en épidémiologie des maladies infectieuses. Le parti pris était la rédaction d'une revue concise s'adressant à un public

large (avertis et non-avertis), et s'articulant autour d'un jeu de questions-réponses sur des faits significatifs.

II.1.7. Article 1 : “Coinfection in wildlife: Focus on a neglected aspect of infectious disease epidemiology”

2020, PLoS Pathogens, 16(9), e1008790. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008790>.

PEARLS

Coinfections in wildlife: Focus on a neglected aspect of infectious disease epidemiology

Axel O. G. Hoarau *, 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

* axel.hoarau@univ-reunion.fr

Emerging infectious diseases represent a global and major health problem. The understanding of biological processes involved in the transmission and evolution of infectious agents in host reservoirs is critical [1]. Disease ecology has, therefore, become an important area of research, aiming at investigating the interactions between infectious agents, their hosts, and environments. Interactions between infectious agents exploiting the same vertebrate host at the same time (coinfections) can affect disease outcomes and transmissibility. In this paper, we review this point, as this could have significant consequences on zoonoses emergence.

Are coinfections common?

Coinfection (or co-infection), which can refer to simultaneous infection, mixed infection, multiple infections, concomitant infection, concurrent infection, polyinfection, polyparasitism, and multiple parasitisms [2], defines the occurrence of at least two genetically different infectious agents in the same host (Fig 1A) [3]. This definition, therefore, includes infectious agents of different taxonomic levels (e.g., bacterium and virus) and also genetic variants of the same infectious agent (e.g., virus genotypes) [3]. Coinfections have been mainly studied in humans, with a particular emphasis on macroparasite helminths [3,4]. The presence of helminth eggs from multiple species has even been reported in human remains and coprolites recovered from many prehistoric sites and analyzed by microscopy [5]. About 30% of human infections may actually be coinfections, and this rate could reach up to 80% in some human communities [4,6]. Recent studies have focused on other living organisms such as plants, vertebrate, and invertebrate animals and have demonstrated that coinfection is indeed the rule rather than the exception (Fig 1B) [2–4,7]. For example, coinfection by protozoa (*Eimeria* sp., *Entamoeba* sp., *Giardia* sp. and *Cryptosporidium* sp.) and by protozoa and helminths (e.g., Ancylostomatidae, *Vampirolepsis nana*) in Brazilian bats can reach 22% in *Molossus molossus*, 25% in *Myotis lavalii*, and 36% in *Noctilio albiventris* [8]. In field voles (*Microtus agrestis*), the prevalence of coinfecting individuals with *Babesia microti*, Cowpox virus, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Bartonella* spp., can reach up to 79% of tested animals [9].

How do infectious agents interact?

Coinfection not only reflects the simultaneous presence of multiple infectious agents in a given host but also involves complex interactions between them. The type of interactions within a community of infectious agents exploiting the same host can be direct, for example, via physical interference or competition for resources, or indirect, such as through immunological pathways or the production of chemical compounds [10–17]. The outcome of these interactions can be positive (synergistic), in which the presence of one infectious agent may facilitate infection by other infectious agents; negative (antagonistic), when the presence of one



OPEN ACCESS

Citation: Hoarau AOG, Mavingui P, Lebarbenchon C (2020) Coinfections in wildlife: Focus on a neglected aspect of infectious disease epidemiology. PLoS Pathog 16(9): e1008790. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008790>

Editor: Laura J. Knoll, University of Wisconsin Medical School, UNITED STATES

Published: September 3, 2020

Copyright: © 2020 Hoarau 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: AH was supported by a “Ministère de L’Enseignement supérieur, de la Recherche et de l’Innovation” PhD fellowship. This work was funded by the VIROPTERE program (INTERREG V Océan Indien). 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.

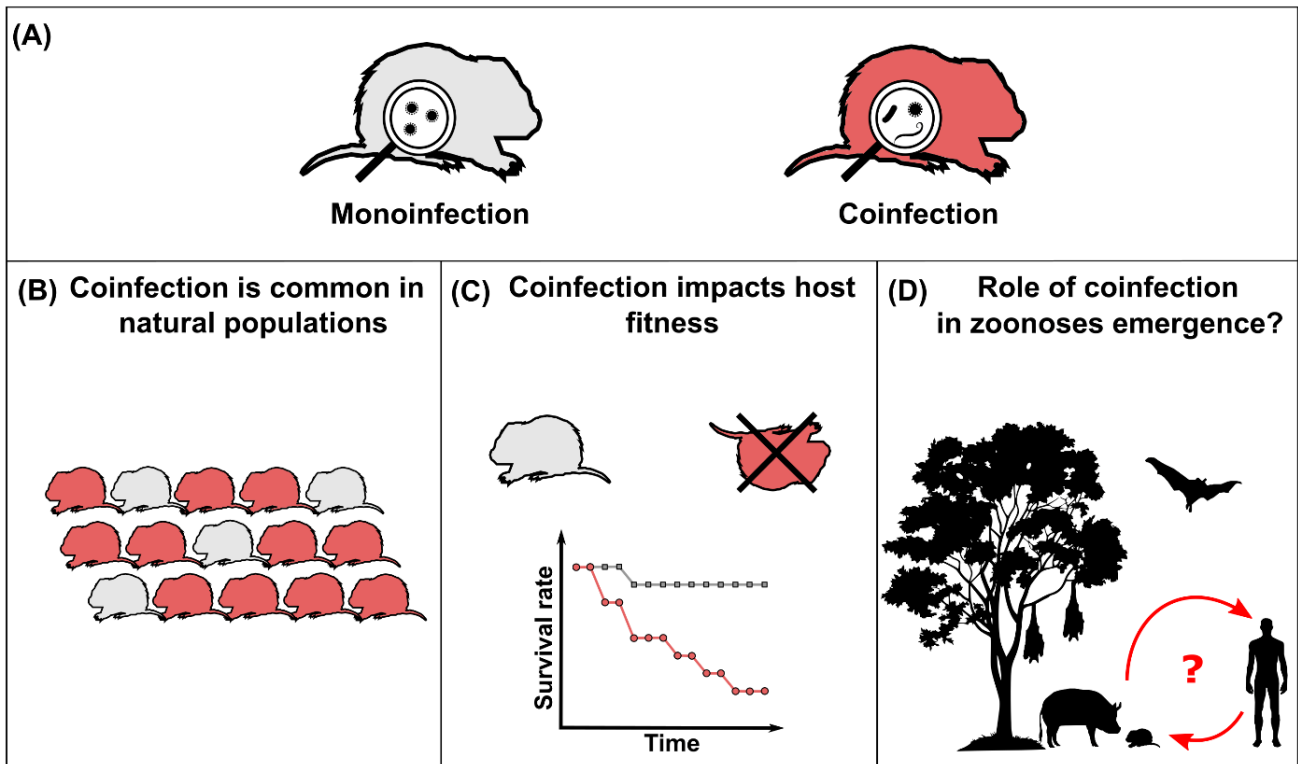


Fig 1. The importance of coinfection in wild hosts. (A) Coinfections are defined by the presence of at least two genetically different infectious agents in the same host: infectious agents of different taxonomic levels (e.g., bacterium and virus) but also genetic variants of the same infectious agent (e.g., virus genotypes). (B) Coinfection is the rule in all living communities and prevalence can be high in vertebrate animals. (C) Coinfection can impact host fitness. (D) The importance of coinfection in zoonoses emergence processes remains to be fully assessed.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008790.g001>

infectious agent inhibits infection or replication; or neutral when the presence of one infectious agent does not affect the infection by other infectious agents [6,14,16]. In field voles, infection patterns have been shown to be highly conditioned by a complex web of interactions, depending on the presence or absence of the other infectious agents [9]. Both positive interactions (e.g., Cowpox virus and *Bartonella* bacteria) and negative interactions (e.g., *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti*) contribute to the global web of relationships. Some infectious agents seem to directly compete for blood as a resource (*Babesia microti* and *Bartonella* bacteria) and others indirectly through immunomodulatory effects (e.g., *Anaplasma phagocytophilum* and Cowpox virus) [9]. The cocirculation of paramyxovirus species in Australian flying foxes (Genus *Pteropus*) also seems to be driven by conditional associations. Indeed, at the sample level, several commonly detected species in natural populations seem to positively interact (e.g., Teviot virus and Hendra virus or Yeppoon virus) and may suggest immunomodulatory effects, such as activation of latent infections; whereas other species rarely detected together could interact negatively (e.g., Hendra virus and Yeppoon virus) and may suggest competition [18].

What are the effects of coinfections on host fitness?

Coinfections have a large range of effects on host fitness, and this emanates from the interactions taking place among the infectious agents (Fig 1C) [6,14,16,17]. The consequences are not

simply the sum of the effects caused by each infectious agent, but the result of a complex combination of known and novel effects affecting key epidemiological parameters, often resulting in more pronounced effects than the individual infections alone [6,11,19]. Coinfections can have negative consequences, from abnormal symptoms for a given disease to accelerated death [6]. For example, mice (*Mus musculus*) coinfecting by gastrointestinal helminths and respiratory bacteria are able to chronically shed a larger number of helminth eggs than monoinfected individuals [20]. African buffaloes (*Syncerus caffer*) coinfecting by gastrointestinal nematodes and *Mycobacterium bovis* face an accelerated mortality [21]. Coinfections can also have beneficial effects for the host, for instance, by taking advantage of antagonistic interactions occurring between infectious agents. For example, gray treefrogs (*Hyla versicolor*), Northern leopard frogs (*Lithobates pipiens*), and spring peepers (*Pseudacris crucifer*) coinfecting with helminth *Echinoparyphium* and Ranavirus, have lower viral load than individuals only infected by the virus, suggesting that macroparasite infection can reduce microparasite infection, possibly through crossreactive immunity [22]. Pekin ducks (*Anas platyrhynchos var. domestica*) coinfecting with Newcastle disease virus and low-pathogenic avian influenza virus, face a decrease of influenza virus shedding and transmission, suggesting viral interference between the two infectious agents [23]. “Forced” coinfection can also be beneficial for the host, for example, phage therapy, defined as the use of bacteriophage as treatment against targeted bacteria, is based on antagonistic interactions [6,24]. More broadly, beyond the direct consequences on host fitness, simultaneous infections can strongly affect the dynamics of infectious agents by modifying host susceptibility, infection probabilities, or transmission rates [6].

Why should we investigate coinfection in wild hosts?

Disease ecology studies have highlighted the key role of environmental and biological factors in spatial and temporal infection dynamics. For example, seasonal changes in social behavior (e.g., grouping of animals at water sources during dry season) or changes in population structure (e.g., increase of the amount of immunologically naïve juveniles during breeding season) affect transmission opportunities and, therefore, infection dynamics in many species [25]. However, although coinfections are widespread in living communities, and demonstrate epidemiological consequences, most studies have been limited to the investigation of a one host and one infectious agent system, largely because of the complexity of natural systems [13]. Although challenging, future studies need to integrate the natural diversity of infectious agents among living communities and fully investigate interaction networks, by considering infectious agents from different taxonomic levels (e.g., virus, bacteria, protozoa, and helminths) and by investigating a broad variety of samples for each host (e.g., feces, blood, and urine) through longitudinal studies. It has been illustrated that considering only a part of the infectious agents community when assessing the effects on host fitness is biased [26]. These investigations can be performed at individual, population, or community levels in order to identify the outcomes on infectious agent dynamics [13]. Given that two-thirds of emerging infectious diseases are zoonoses, with nearly 70% originating from wildlife, better knowledge of the interactions of infectious agents in wild reservoirs will provide key insight for the understanding and management of spillover processes [27,28]. In particular, the role of coinfections in wild and also domestic hosts (e.g., livestock), in the emergence of zoonoses, remains to be fully assessed (Fig 1D).

How coinfections in wild animals can be studied?

Coinfections in wild animals can be investigated using classical approaches based on sample collection, infectious agent detection, and analysis of the results. Sample collection can be

achieved through cross-sectional or longitudinal studies [6]. Cross-sectional studies provide information on the co-occurrence of infectious agents at the time of sampling, whereas longitudinal studies provide a more detailed information in the infection dynamics in individual hosts and communities over time. However, most studies designed to investigate coinfection in wildlife are restricted to limited “niches” (e.g., blood, saliva, urine, and feces), and collected samples are analyzed with targeted assays (e.g. PCR and serology), therefore, offering few opportunities to investigate generic coinfection [4,11]. The development and improvement of new approaches such as metagenomics, next generation sequencing, and bioinformatics, provides a method to simultaneously describe a large number of pathogens without previous knowledge and a priori [13,29,30] and allow to share an increasing amount of data with the scientific community, therefore, offering new insights compared to traditional methodologies. Regarding the analytical approach, statistical tests such as chi-squared test can be used to quickly examine co-occurrence but often with limited assumptions concerning interactions and their consequences [6]. Many other statistical tests, mathematical models, and ecological theories have been developed to better infer interactions, although approaches vary depending on study designs and infectious agents [10,14–16]. Field studies can also be associated with experimental approaches such as captive studies (with wild animals) or mesocosms (artificial ecosystems) [14,22].

Conclusion

Coinfections are recognized to be the rule in all living communities and have consequences on both host fitness and infectious agent epidemiology. The emergence of infectious diseases associated with wild hosts highlights the need for a better knowledge on the factors and mechanisms involved in the epidemiology of infectious diseases in natural populations. Although challenging, both theoretical and experimental tools are available. This provides a unique opportunity to gain better fundamental knowledge on infectious agent interactions and also to investigate the role and consequences of coinfections in the emergence of zoonoses.

References

1. Wilcox BA, Gubler DJ. Disease ecology and the global emergence of zoonotic pathogens. *Environ Health Prev Med.* 2005; 10: 263–272. <https://doi.org/10.1007/BF02897701> PMID: 21432130
2. Rigaud T, Perrot-Minnot M-J, Brown MJF. Parasite and host assemblages: embracing the reality will improve our knowledge of parasite transmission and virulence. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2010; 277: 3693–3702.
3. Cox FEG. Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology.* 2001; 122: S23–S38. <https://doi.org/10.1017/s003118200001698x> PMID: 11442193
4. Petney TN, Andrews RH. Multiparasite communities in animals and humans: frequency, structure and pathogenic significance. *Int J Parasitol.* 1998; 28: 377–393. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(97\)00189-6](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(97)00189-6) PMID: 9559357
5. Cockburn TA, Cockburn E, Reyman TA, editors. *Mummies, disease and ancient cultures.* 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1998.
6. Vaumourin E, Vourc'h G, Gasqui P, Vayssier-Taussat M. The importance of multiparasitism: examining the consequences of co-infections for human and animal health. *Parasit Vectors.* 2015; 8: 545. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1167-9> PMID: 26482351
7. Moutailler S, Valiente Moro C, Vaumourin E, Michelet L, Tran FH, Devillers E, et al. Co-infection of ticks: the rule rather than the exception. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10: e0004539. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004539> PMID: 26986203
8. Santana Lima VF, Rocha PA, Dias Silva MA, Beltrão-Mendes R, Ramos RAN, Giannelli A, et al. Survey on helminths and protozoa of free-living Neotropical bats from Northeastern Brazil. *Acta Trop.* 2018; 185: 267–272. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.06.002> PMID: 29883575

9. Telfer S, Lambin X, Birtles R, Beldomenico P, Burthe S, Paterson S, et al. Species interactions in a parasite community drive infection risk in a wildlife population. *Science*. 2010; 330: 243–246. <https://doi.org/10.1126/science.1190333> PMID: 20929776
10. Pedersen AB, Fenton A. Emphasizing the ecology in parasite community ecology. *Trends Ecol Evol*. 2007; 22: 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.005> PMID: 17137676
11. Bordes F, Morand S. The impact of multiple infections on wild animal hosts: a review. *Infect Ecol Epidemiol*. 2011; 1: 7346.
12. Knowles SCL, Fenton A, Petchey OL, Jones TR, Barber R, Pedersen AB. Stability of within-host-parasite communities in a wild mammal system. *Proc R Soc B Biol Sci*. 2013; 280: 20130598.
13. Hellard E, Fouchet D, Vavre F, Pontier D. Parasite–parasite interactions in the wild: How to detect them? *Trends Parasitol*. 2015; 31: 640–652. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.07.005> PMID: 26440785
14. Ezenwa VO. Helminth-microparasite co-infection in wildlife: lessons from ruminants, rodents and rabbits. *Parasite Immunol*. 2016; 38: 527–534. <https://doi.org/10.1111/pim.12348> PMID: 27426017
15. Pedersen AB, Fenton A. Wild rodents as a natural model to study within host parasite interactions. In: Wilson K, Fenton A, Tompkins D, editors. *Wildlife Disease Ecology: Linking Theory to Data and Application*. 1st ed. Cambridge University Press; 2019.
16. Ezenwa VO, Jolles AE, Beechler BR, Budischak SA, Gorsich EE. The cause and consequences of parasite interactions: African buffalo as a case study. In: Wilson K, Fenton A, Tompkins D, editors. 1st ed. Cambridge University Press; 2019.
17. Graham AL, Cattadori IM, Lloyd-Smith JO, Ferrari MJ, Bjørnstad ON. Transmission consequences of coinfection: cytokines writ large? *Trends Parasitol*. 2007; 23: 284–291. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.04.005> PMID: 17466597
18. Peel AJ, Wells K, Giles J, Boyd V, Burroughs A, Edson D, et al. Synchronous shedding of multiple bat paramyxoviruses coincides with peak periods of Hendra virus spillover. *Emerg Microbes Infect*. 2019; 8: 1314–1323. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1661217> PMID: 31495335
19. Alizon S, de Roode JC, Michalakakis Y. Multiple infections and the evolution of virulence. *Ecol Lett*. 2013; 16: 556–567. <https://doi.org/10.1111/ele.12076> PMID: 23347009
20. Lass S, Hudson PJ, Thakar J, Saric J, Harvill E, Albert R, et al. Generating super-shedders: co-infection increases bacterial load and egg production of a gastrointestinal helminth. *J R Soc Interface*. 2012; 10: 20120588. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0588> PMID: 23256186
21. Jolles AE, Ezenwa VO, Etienne RS, Turner WC, Olf H. Interactions between macroparasites and microparasites drive infection patterns in free-ranging African buffalo. *Ecology*. 2008; 89: 2239–2250. <https://doi.org/10.1890/07-0995.1> PMID: 18724734
22. Wuertner VP, Hua J, Hoverman JT. The benefits of coinfection: trematodes alter disease outcomes associated with virus infection. *J Anim Ecol*. 2017; 86: 921–931. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12665> PMID: 28317105
23. Pantin-Jackwood MJ, Costa-Hurtado M, Miller PJ, Afonso CL, Spackman E, Kapczynski RD, et al. Experimental co-infections of domestic ducks with a virulent Newcastle disease virus and low or highly pathogenic avian influenza viruses. *Vet Microbiol*. 2015; 177: 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.02.008> PMID: 25759292
24. Reindel R, Fiore CR. Phage therapy: Considerations and challenges for development. *Clin Infect Dis*. 2017; 64: 1589–1590. <https://doi.org/10.1093/cid/cix188> PMID: 28329182
25. Altizer S, Dobson A, Hosseini P, Hudson P, Pascual M, Rohani P. Seasonality and the dynamics of infectious diseases. *Ecol Lett*. 2006; 9: 467–484. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00879.x> PMID: 16623732
26. Serrano E, Millán J. What is the price of neglecting parasite groups when assessing the cost of co-infection? *Epidemiol Infect*. 2014; 142: 1533–1540. <https://doi.org/10.1017/S0950268813002100> PMID: 24040768
27. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*. 2008; 451: 990–993. <https://doi.org/10.1038/nature06536> PMID: 18288193
28. Daszak P. Emerging infectious diseases of wildlife—Threats to biodiversity and human health. *Science*. 2000; 287: 443–449. <https://doi.org/10.1126/science.287.5452.443> PMID: 10642539
29. Belak S, Karlsson OE, Leijon M, Granberg F. High-throughput sequencing in veterinary infection biology and diagnostics. *Rev Sci Tech OIE*. 2013; 32: 893–915.
30. Razzauti M, Galan M, Bernard M, Maman S, Klopp C, Charbonnel N, et al. A Comparison between Transcriptome Sequencing and 16S Metagenomics for Detection of Bacterial Pathogens in Wildlife. Small PLC, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9: e0003929. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003929> PMID: 26284930

II.2. Co-infections chez les chauves-souris du sud-ouest de l'océan Indien

II.2.1. Résumé de l'étude (Article 2)

Bien que les co-infections jouent un rôle majeur dans l'épidémiologie des agents infectieux (Pedersen et Fenton 2007 ; Hellard *et al.* 2015 ; Vaumourin *et al.* 2015 ; Hoarau *et al.* 2020), la majorité des études menées chez les chauves-souris s'est focalisée sur la recherche d'un agent infectieux à la fois, ou ne rapporte des co-infections que de manière fortuite (Kaufman 2020). Les exemples de recherches multiples, ou d'approches sans *a priori* (e.g. séquençage de viromes) sont limités (e.g. Li *et al.* 2010 ; Donaldson *et al.* 2010 ; He *et al.* 2013 ; Wu *et al.* 2016). Peu d'informations sont disponibles concernant les patrons de co-infection, ainsi que les interactions pouvant potentiellement affecter les dynamiques de transmission chez ces mammifères (e.g. Rizzo *et al.* 2017 ; Seltmann *et al.* 2017 ; Peel *et al.* 2019 ; Kaufman 2020).

Dans l'étude présentée ci-après, nous nous sommes intéressés à la recherche simultanée de la présence de CoV, de PMV et d'AstV dans des échantillons provenant d'une trentaine d'espèces de chauves-souris de la région du SOOI, par des méthodes de biologie moléculaire ciblées (PCR ciblant le gène de la polymérase des virus). Pour ce faire, nous nous sommes focalisés sur des échantillons collectés à La Réunion, à Mayotte, à Madagascar, mais aussi au Mozambique, pays abritant également une grande diversité de chauves-souris (près de 70 espèces) (Figure 20) (Monadjem *et al.* 2010). Les objectifs étaient de (i) décrire la présence de co-infections chez les chauves-souris de la région au travers d'une méta-analyse, et (ii) de tester si des interactions pourraient exister entre les trois familles virales.

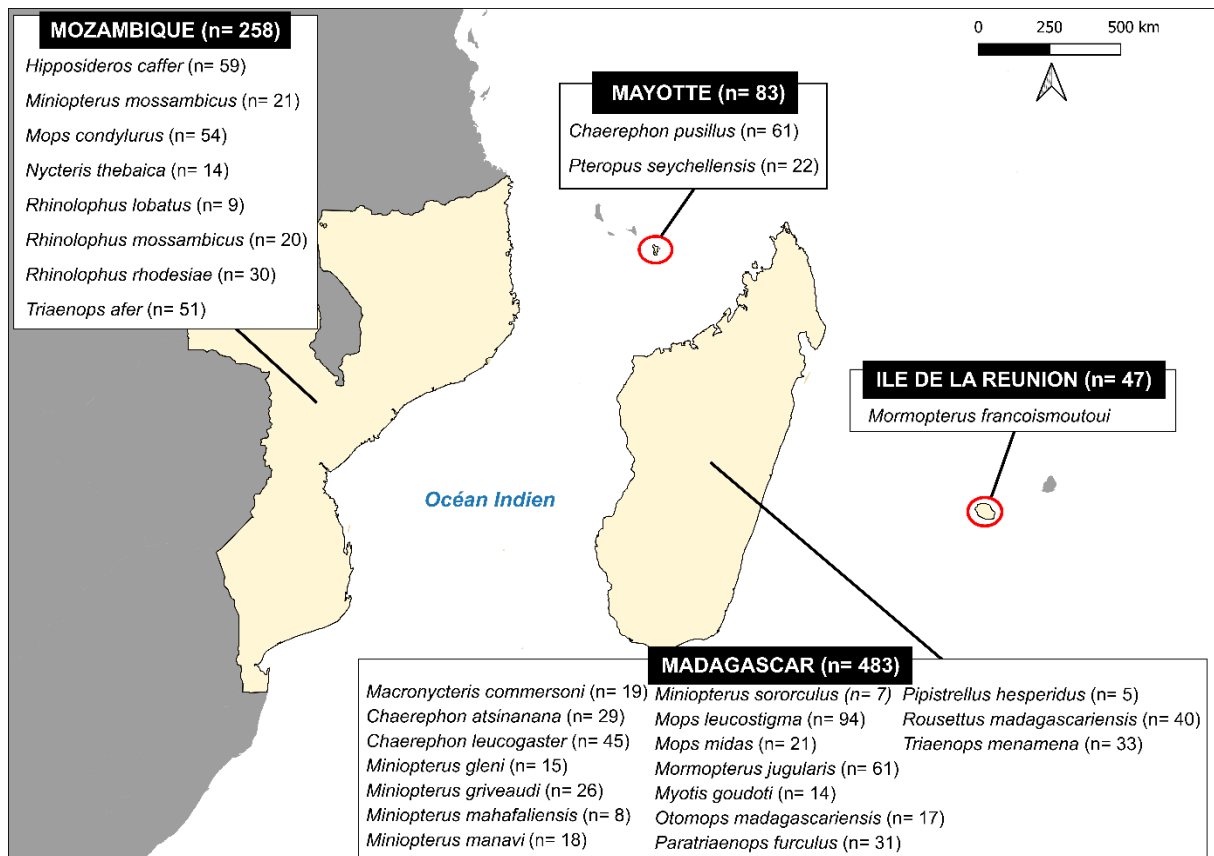


Figure 20. Distribution géographique des échantillons inclus dans la méta-analyse. Les espèces échantillonnées pour chaque territoire sont référencées dans les encadrés. Le nombre d'échantillons est indiqué entre parenthèses. Carte créée à partir du logiciel libre QGIS version 3.22.1 et annotée manuellement via le logiciel libre Inkscape version 1.1.2.

La présence simultanée de CoV, PMV, et AstV a été testée au sein de 871 échantillons provenant de 28 espèces de chauves-souris et appartenant à huit familles (Figure 20). Vingt-et-un échantillons étaient positifs à au moins deux des trois virus testés, soit une prévalence de co-infection globale de $2,4\% \pm 1,0\%$. Ces co-infections ont été détectées à Madagascar ($1,7\% \pm 1,1\%$) et au Mozambique ($5,0\% \pm 2,7\%$) avec une différence significative entre ces deux pays ($\chi^2 = 7,0$; ddl = 1 ; $P < 0,01$). Nous avons montré que certaines combinaisons de co-infections étaient plus fréquemment détectées que d'autres, notamment AstV-CoV ($1,4\% \pm 0,8\%$) et AstV-PMV ($1,1\% \pm 0,7\%$) ($\chi^2 = 11,3$; ddl = 3 ; $P < 0,05$). De plus, nous avons pu mettre en exergue une association positive entre les AstV et PMV, suggérant que la présence de chacun de ces virus favoriserait l'infection par l'autre ($\chi^2 = 4,6$; ddl = 1 ; $P < 0,05$). À Madagascar, trois espèces sur les 18 testées se sont révélées positives pour des co-infections, sans différence significative entre espèces. Au Mozambique sur les huit espèces criblées, quatre ont été testées positives pour des co-infections, sans différence significative entre espèces. De manière intéressante, parmi les huit familles de chauves-souris

investiguées, notre étude révèle que les chauves-souris appartenant à la famille des Rhinonycteridae semblent être plus fréquemment co-infectées par les virus ciblés que les autres familles, et ce, à la fois à Madagascar et au Mozambique.

II.2.2. Article 2 : “Investigation of astrovirus, coronavirus and paramyxovirus co-infections in bats in the western Indian Ocean ”

Virology Journal, 18, 205 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01673-2>

SHORT REPORT

Open Access



Investigation of astrovirus, coronavirus and paramyxovirus co-infections in bats in the western Indian Ocean

Axel O. G. Hoarau^{1*}, Steven M. Goodman^{2,3}, Dana Al Halabi¹, Beza Ramasindrazana^{1,2,7}, Erwan Lagadec¹, Gildas Le Minter¹, Marie Köster¹, Andréa Dos Santos⁴, M. Corrie Schoeman⁵, Eduardo S. Gudo⁶, Patrick Mavingui¹ and Camille Lebarbenchon¹

Abstract

Co-infections have a key role in virus transmission in wild reservoir hosts. We investigated the simultaneous presence of astroviruses, coronaviruses, and paramyxoviruses in bats from Madagascar, Mayotte, Mozambique, and Reunion Island. A total of 871 samples from 28 bat species representing 8 families were tested by polymerase chain reactions (PCRs) targeting the RNA-dependent RNA-polymerase genes. Overall, 2.4% of bats tested positive for the presence of at least two viruses, only on Madagascar and in Mozambique. Significant variation in the proportion of co-infections was detected among bat species, and some combinations of co-infection were more common than others. Our findings support that co-infections of the three targeted viruses occur in bats in the western Indian Ocean region, although further studies are needed to assess their epidemiological consequences.

Keywords: Madagascar, Mozambique, *Triaenops menamena*, *Triaenops afer*, Multiple infections

Co-infection (sometimes written as coinfection) can be defined as the simultaneous infection by at least two genetically different infectious agents in the same host [1–5]. It can affect both host fitness and disease transmission dynamics, therefore playing a critical role in the epidemiology of infectious agents [4–7]. In bats, although many studies have focused on the detection of emerging viruses such as astroviruses (AstVs), coronaviruses (CoVs), and paramyxoviruses (PMVs), limited data is available regarding co-infection patterns and its potential effect on host fitness and disease transmission dynamics [8–13].

In previous studies, we have investigated the presence of either AstVs, CoVs or PMVs in bats in the western Indian Ocean (WIO) region [14–23]. Here, we conducted a meta-analysis of published data [19–21, 23] and performed additional molecular screening in order to obtain a final dataset of 871 bat samples tested for AstVs, CoVs, and PMVs from 28 species representing 8 bat families (see Additional file 1 and Additional file 2).

Biological material was collected on Madagascar, in Mozambique, on Mayotte, and on Reunion Island as part of previous investigations on infectious agents circulation in bats (details relating to the collection of biological material are available in [23]). The list of samples included in this study (e.g. bat species, location, date, type of samples) is provided in the Additional file 1. All samples were previously tested for the presence of CoV [23]; some of them were also tested for the presence of AstV (516 samples; [20, 21]) and PMV (167 samples; [19]). Additional assays were thus performed for

*Correspondence: axel.hoarau@univ-reunion.fr

¹ Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, INSERM 1187, CNRS 9192, IRD 249, Université de La Réunion, Sainte-Clotilde, La Réunion, France

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



© The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

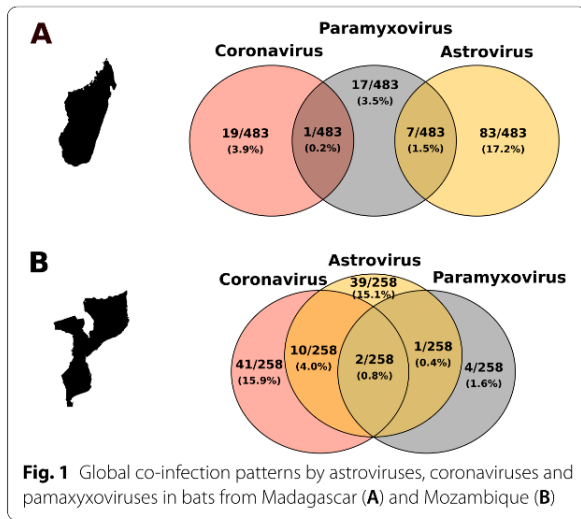


Fig. 1 Global co-infection patterns by astroviruses, coronaviruses and paramyxoviruses in bats from Madagascar (A) and Mozambique (B)

the detection of the AstV (355 samples) and PMV (704 samples) RNA-dependent RNA-polymerase (RdRp) genes. Molecular detection was performed using semi-nested polymerase chain reactions (PCRs), as previously described [16, 17, 19–21, 24, 25]. PCR products were visualized on 2% agarose gels stained with 2% Gelred (Biotium, Hayward, CA, USA). Pearson Chi square tests were conducted to examine the effect of the roost sites (i.e. cave, building, tree), host species, sex, and sampling location (i.e. country or island), on virus detection, and to investigate potential associations between AstV, CoV, and PMV. Analyses were conducted with R, version 4.0.5 [26].

PCR products of expected size were submitted for direct Sanger sequencing (Genoscreen, Lille, France). Nucleotide sequences were aligned to generate consensus sequences, and were edited manually using ChromasLite 2.6.5 (Technelysium Pty, South Brisbane, Australia). The 33 partial AstV sequences and 13 partial PMV sequences generated in this study were deposited in GenBank respectively under the accession numbers MZ614404 to MZ614436 and MZ614437 to MZ614449. Genetic diversity was explored with pairwise distance values obtained from *phangorn* package in R, version 2.6.3 [27]. Sequences were compared to reference sequences in NCBI GenBank using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) with the standard nucleotide BLAST (BLASTn) algorithm (BLAST was performed on August 18th, 2021) [28, 29]. Then, AstV and PMV sequences generated in this study were respectively aligned with 105 and 74 reference partial nucleotide sequences, using CLC Sequence Viewer version 7.6.1 (CLC Bio, Aarhus, Denmark). Phylogenetic trees were

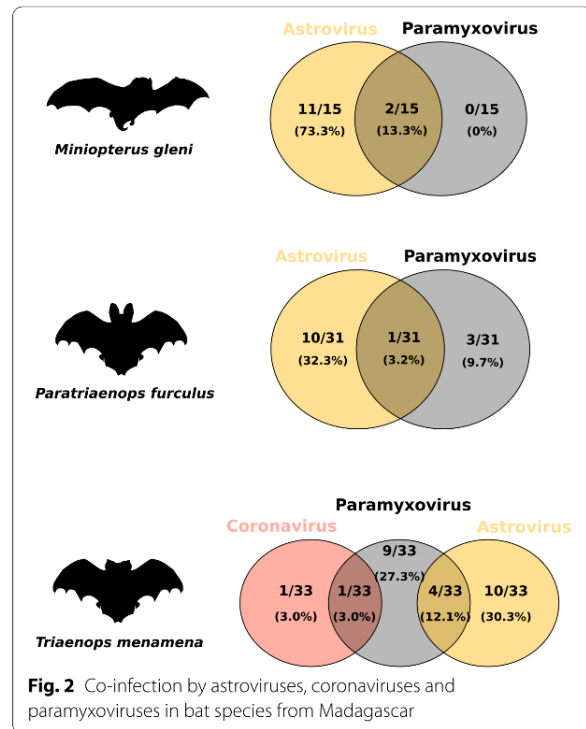
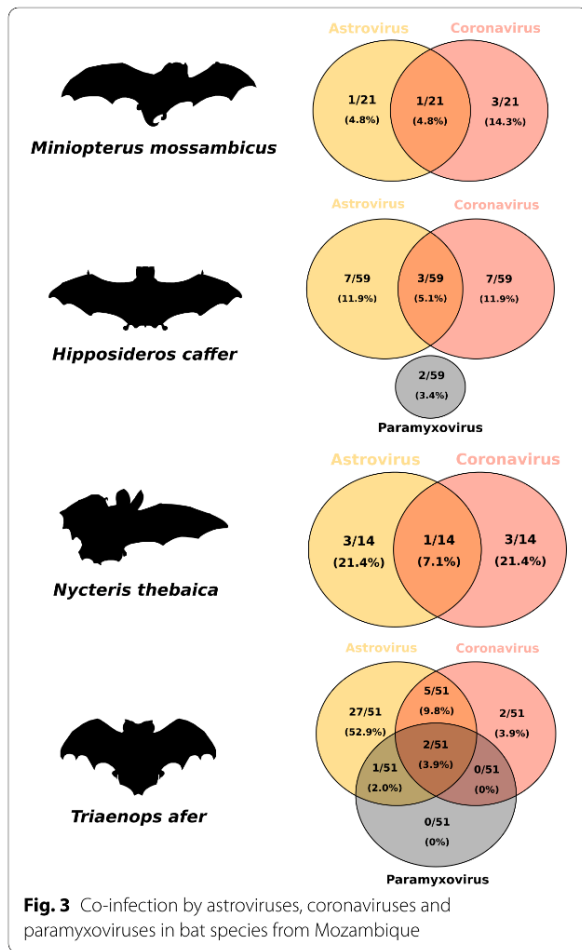


Fig. 2 Co-infection by astroviruses, coronaviruses and paramyxoviruses in bat species from Madagascar

generated by maximum-likelihood using PhyML software 3.1 [30], with a GTR evolutionary model, and 1000 bootstrap replicates.

One hundred and forty-two samples tested positive for AstV (mean detection rate \pm 95% confidence interval: $16.3\% \pm 2.5\%$) (Additional file 2). Positive samples were detected only in Mozambique ($20.2\% \pm 3.6\%$) and on Madagascar ($18.6\% \pm 3.5\%$), without significant variation between these two locations ($\chi^2 = 0.3$, $df = 1$, $P > 0.05$). Significant differences in AstV detection were observed between roost types ($\chi^2 = 6.2$, $df = 1$, $P < 0.05$), between species ($\chi^2 = 311.8$, $df = 24$, $P < 0.001$) and between males ($20.9\% \pm 3.8\%$) and females ($11.6\% \pm 3.0\%$) ($\chi^2 = 5.9$, $df = 1$, $P < 0.05$). AstV prevalence was significantly higher in bats species roosting in caves ($27.5\% \pm 3.9\%$) than in buildings ($2.5\% \pm 2.0\%$). On Madagascar, a high detection rate was found in species of the genus *Miniotterus* as compared to the other taxa ($\chi^2 = 162.4$, $df = 1$, $P < 0.05$), and especially in *Miniotterus manavi* ($88.9\% \pm 14.5\%$), *Miniotterus gleni* ($86.7\% \pm 17.2\%$), and *Miniotterus sororculus* ($71.4\% \pm 33.5\%$). The highest AstV detection rate in Mozambique was observed in *Triaenops afer* ($68.6\% \pm 12.7\%$).

A total of 32 samples tested positive for PMV ($3.7\% \pm 1.3\%$) (Additional file 2). Positive samples were detected only on Madagascar ($5.2\% \pm 1.3\%$) and in



Mozambique ($2.7 \pm 1.1\%$), without significant difference between locations ($\chi^2 = 2.5$, $df = 1$, $P > 0.5$). Significant differences were detected between males ($5.4 \pm 2.1\%$) and females ($1.9 \pm 1.3\%$) ($\chi^2 = 7.6$, $df = 1$, $P < 0.05$), and between roost sites ($\chi^2 = 7.3$, $df = 2$, $P < 0.01$). Bats living in caves were more frequently positive ($5.7 \pm 2.0\%$) than those living in buildings ($1.7 \pm 1.6\%$). The proportion of positive bats was also significantly different between species on Madagascar ($\chi^2 = 91.9$, $df = 27$, $P < 0.001$), particularly in *Triaenops menamena* ($42.4 \pm 16.9\%$). In Mozambique, differences between species were not statistically significant ($\chi^2 = 1.3$, $df = 3$, $P > 0.05$).

The detection of CoV was conducted as part of a previous study [23]. Briefly, 82 of the 871 samples were positive for CoV ($9.4 \pm 1.9\%$), with a higher prevalence in Mozambique ($20.5 \pm 2.7\%$) ($\chi^2 = 50.4$, $df = 3$, $P < 0.001$) and no difference between males and females ($\chi^2 = 2.7$, $df = 1$, $P > 0.05$) (Additional file 2). Positive samples were detected only in bats roosting in caves ($10.7 \pm 2.6\%$)

and buildings ($8.0 \pm 3.1\%$), without statistical difference between these two roost sites ($\chi^2 = 1.7$, $df = 1$, $P > 0.05$). However, a significant variation was detected among bat species ($\chi^2 = 125.7$, $df = 27$, $P < 0.001$). In Mozambique, the highest prevalence was detected in the cave roosting *Rhinolophus lobatus* ($66.7 \pm 30.8\%$). No difference was observed among the species that tested positive on Madagascar ($\chi^2 = 2.3$, $df = 3$, $P > 0.05$).

The overall proportion of positive bats detected for either AstVs or PMVs was consistent with previous studies performed in the WIO region, and in other tropical regions [31–34]. Interestingly, higher detection rates were found for both viruses in bats using caves as day-roost sites, suggesting that cave-roosting behavior maybe favorable for horizontal transmission between bats [35]. Differences between locations, sex, and bat species may be explained by a range of factors. For example, seasonality has been identified as a major driver of the infection dynamics of many pathogens, affecting both host susceptibility and transmission [17, 36–39]. Important seasonal variation in the prevalence of infected animals can depend on the period the samples were collected, and, in turn, can lead to misrepresentative conclusions regarding the level of bat exposure to viruses, in particular in cross-sectional studies. Longitudinal studies in wild animals are thus important to precisely assess prevalence of infected animals and its temporal variation [17, 37, 40].

Twenty-one of the 871 samples tested positive for more than one virus ($2.4 \pm 1.0\%$). These co-infections were detected only in Mozambique ($5.0 \pm 2.7\%$) and on Madagascar ($1.7 \pm 1.1\%$), with significant variation among these locations ($\chi^2 = 7.0$, $df = 1$, $P < 0.01$) (Fig. 1, Additional file 3). In both location, co-infections were detected only in bats roosting in cave (Madagascar: $\chi^2 = 6.4$, $df = 1$, $P < 0.05$; Mozambique: $\chi^2 = 1.9$, $df = 1$, $P > 0.05$), and no significant variation was observed between males and females (Madagascar: $\chi^2 = 3.6$, $df = 1$, $P > 0.05$; Mozambique: $\chi^2 = 3.3$, $df = 1$, $P > 0.05$). Globally, co-infections involving AstV-CoV ($1.4 \pm 0.8\%$) and AstV-PMV ($1.1 \pm 0.7\%$) were more frequently detected than CoV-PMV ($0.1 \pm 0.3\%$) and AstV-CoV-PMV ($0.3 \pm 0.4\%$) ($\chi^2 = 11.3$, $df = 3$, $P < 0.05$) (Fig. 1). The presence of AstVs was strongly correlated to the presence of PMVs ($\chi^2 = 4.6$, $df = 1$, $P < 0.05$) suggesting a potential positive association between these two viruses. Co-infections involving AstVs, CoVs or PMVs were reported in other tropical bat species. For example, a study of *Hipposideros cervinus* on Borneo reported 4.1% of AstV-CoV coinfecting bats with a positive association between these two viruses [11].

On Madagascar, co-infections were detected in three of the 18 tested species: *Triaenops menamena* ($15.2 \pm 24.7\%$), *Miniopterus gleni* ($13.3 \pm 14.8\%$), and *Paratriaenops furculus* ($3.2 \pm 0.2\%$), without

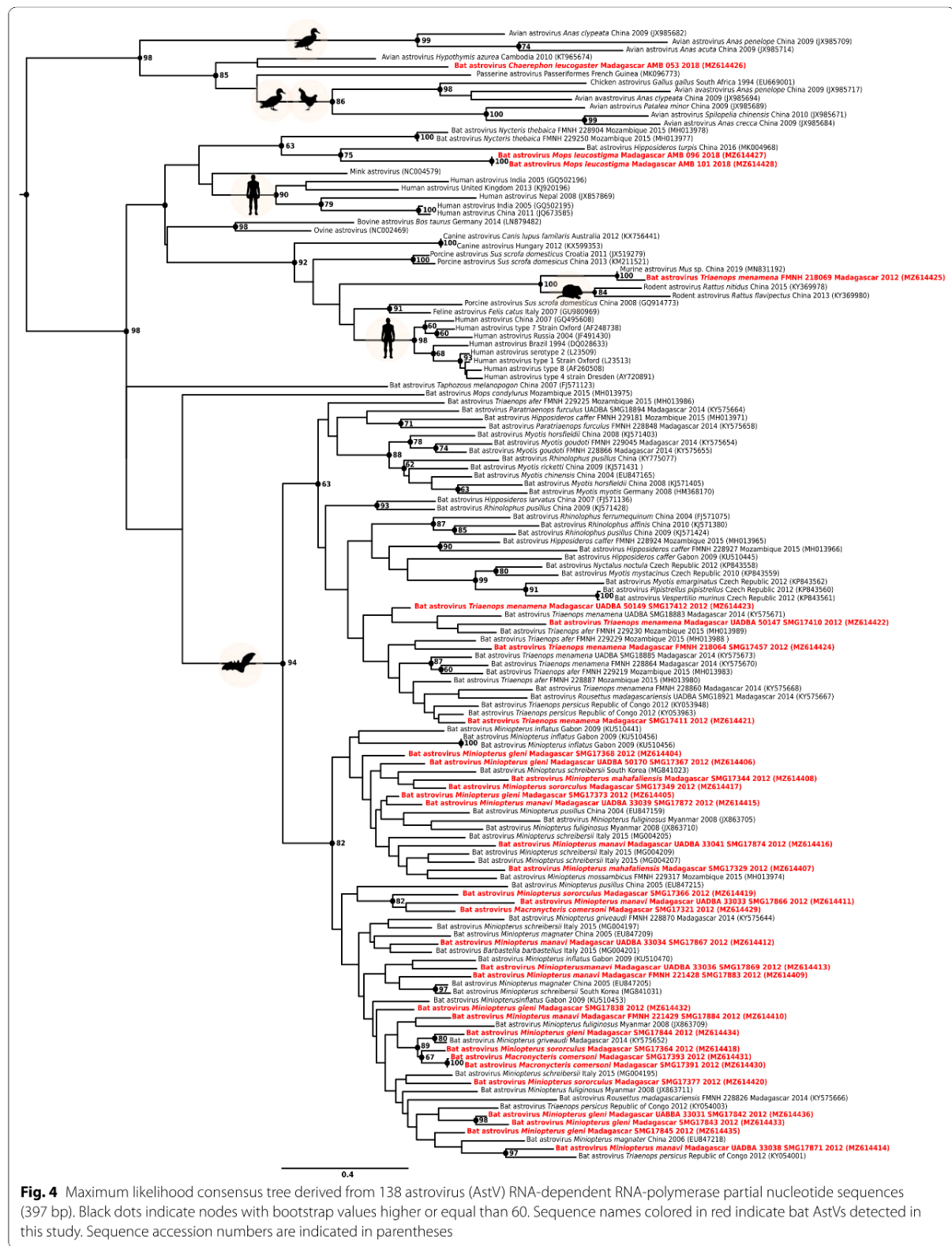




Fig. 5 Maximum likelihood consensus tree derived from 87 paramyxovirus (PMV) RNA-dependent RNA-polymerase partial nucleotide sequences (439 bp). Black dots indicate nodes with bootstrap values higher or equal than 60. Sequence names colored in red indicate bat PMVs detected in this study. Sequence accession numbers are indicated in parentheses

significant difference between species ($\chi^2=2.7$, $df=2$, $P>0.05$) (Fig. 2). In Mozambique, co-infections were detected in four of the eight tested species: *Triaenops afer* (15.7% ± 10.0%), *Nycteris thebaica* (7.1% ± 13.5%), *Hipposideros caffer* (5.1% ± 5.6%), and *Miniopterus mossambicus* (4.8% ± 9.1%) ($\chi^2=4.4$, $df=3$, $P>0.05$), also without significant difference between species (Fig. 3). Interestingly, co-infections were detected in bats of the family Rhinonycteridae both in Mozambique (*Triaenops*) and on Madagascar (*Triaenops* and *Paratriaenops*). In Mozambique, the proportion of co-infections was significantly higher in *Triaenops afer* than in all other tested species ($\chi^2=4.4$, $df=1$, $P<0.05$). Also, as compared to other species that tested positive for co-infection, different combinations of co-infections (i.e. different associations between viruses) were detected in species of the genus *Triaenops*. Indeed, *Triaenops menamena* on Madagascar presented two types of co-infections: AstV-PMV and CoV-PMV, whereas *Triaenops afer* in Mozambique harbored three types: AstV-CoV, AstV-PMV, and AstV-CoV-PMV; while other species, including *Paratriaenops furculus*, only presented one co-infection type (Figs. 2 and 3 and Additional file 3). Altogether, these results highlight multiple infections in WIO region bats, and give rise to additional questions concerning variation among species, as well as their consequences on viral infection dynamics.

High genetic diversity was detected for AstV, with pairwise differences up to 46% between sequences, without support for host family or species association (Fig. 4). Based on BLASTn comparisons, we found that our sequences had a high level of identity (between 80 and 92%) with AstV previously described in bats of the WIO region [20, 21], as well as with AstVs detected in bats from continental Africa (e.g. Gabon, Democratic Republic of Congo), and in other regions in the world (e.g. China, Thailand) (Additional file 4). However, one sequence obtained from a *Triaenops menamena*, a species endemic to Madagascar, showed 92% identity to an AstV sequence detected in a mouse from China (Additional file 4). Another example, even more unexpected, one AstV sequence obtained from *Chaerephon leucogaster* on Madagascar had 96% identity with an AstV sequence from a bird of the order Passeriformes (Additional file 4). These findings were consistent with phylogenetic results and were statistically supported (Fig. 4). A recent study also reported AstVs related to avastrovirus in environmental samples collected in a colony of

Mormopterus francoismoutoui, a member of the family Molossidae endemic to Reunion Island [41]. These findings may suggest introduction of AstVs on the island by non-native rodents, and could also support environmental transmission of AstVs between species of different taxa, as previously suggested [42]. Nevertheless, studies investigating the circulation of AstVs in terrestrial small mammals in the WIO region are required to assess these potential host-shifts.

Genetic diversity was less important for PMV sequences, with pairwise differences up to 29%. All our sequences were genetically related to PMVs previously described on Madagascar [16, 19] or in continental Africa (e.g. Ghana, Kenya), with sequence identity ranging from 78 to 99% (Additional file 5 and Fig. 5). Phylogenetic analyses highlighted some degree of host-specificity, as previously described for PMV in the western Indian Ocean (Fig. 5) [16]. For instance, most sequences clustered either with PMV sequences detected in bats on the same genus captured in the region or elsewhere (e.g. *Hipposideros caffer* from Mozambique), or with sequences obtained in bats from the same family (e.g. *Mops condylurus* sequence from Mozambique, and *Chaerephon leucogaster* sequence from Madagascar clustered with a sequence detected in *Mops leucostigma* on Madagascar). However, some sequences were included in more diversified groups including different bat families (e.g. two sequences obtained from *Paratriaenops furculus* on Madagascar that clustered with sequences detected in *Miniopterus griveaudi* and *Chaerephon leucogaster* on Madagascar).

We report co-infections in bats on Madagascar and in Mozambique, ranging from 3.2% to 15.7% of the positive samples, and depending on the tested bat species. Although our cross-sectional sampling precludes detailed interpretation of the biological drivers of such variation, our results nevertheless highlight that interactions between infectious agents in bats may exist with potential consequences on their epidemiology. AstVs, CoVs, and PMVs are emerging viruses that represent a major challenge for human and animal health. Further knowledge on virus interaction in wildlife, based on long-term longitudinal sampling is needed to fully assess the epidemiological consequences of co-infections [5].

Abbreviations

AstV: Astrovirus; BLAST: Basic local alignment search tool; BLASTn: Standard nucleotide BLAST; CoV: Coronavirus; PCR: Polymerase chain reaction; PMV: Paramyxovirus; RdRp: RNA-dependent RNA-polymerase; WIO: Western Indian Ocean.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01673-2>.

- Additional file 1.** List and origin of samples, day roost sites, and result of the molecular screening.
- Additional file 2.** Number of tested and positive samples, per location, bat family, species, samples types, and collection year.
- Additional file 3.** Number of tested and positive samples for co-infections, per country, bat family, bat species, sample type, and collection year.
- Additional file 4.** Astrovirus nucleotide sequence similarity obtained with BLASTn.
- Additional file 5.** Paramyxovirus nucleotide sequence similarity obtained with BLASTn.

Acknowledgements

We thank L. Joffrin, J. Mélade, D.A. Wilkinson, and their collaborating co-authors of the three studies we retrieved data from. We are grateful to all involved in the field for the collection of biological material: M. Dietrich, C. Dionisio, L. Domergues, Y. Gomard, L. Joffrin, T. Mbohoahy, T. Nekena, M. Pannequin, J. Rakotoarivelo, M. Rakotomanga, C. F. Rakotondramana, A. Randrenjarison, P. Tortosa, and D. A. Wilkinson. We also thank K. Dellagi and H. 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.

Authors' contributions

A.H., C.L., and P.M. conceived and designed the study. S.M.G., E.L., G.L.M., B.R., A.D.S., and M.C.S. collected biological material. D.A.H., A.H., M.K., and C.L. performed the molecular analyses. D.A.H. and A.H. analyzed the data. E.S.G. (Mozambique), S.M.G. (Madagascar), and P.M. (France) contributed to the project management for the respective country institutions. A.H. was the principal author of the paper. All authors edited, read, and approved the final manuscript.

Funding

This work was funded by the "Pathogènes associés à la Faune Sauvage océan Indien (FS-OI)", the "Leptospirose océan Indien (LeptOI)", the "Paramyxovirus océan Indien (ParamyOI)", the "Partenariat Mozambique-Réunion dans la recherche en santé: pour une approche intégrée d'étude des maladies infectieuses à risque épidémique (MoZaR)", and by the VIROPTERE (INTERREG V océan Indien) programs. A.H. was supported by a "Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation" PhD fellowship. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Availability of data and materials

Data are available in the supplementary material (detailed list of samples and results of molecular screening) and in GenBank (sequence accession numbers of the sequences generated in this study: MZ614404 to MZ614449).

Declarations

Ethics approval

This study is based on archived samples collected as part of previous investigations of infectious agents circulation in bats on islands in the western Indian Ocean and Mozambique. Procedures were evaluated and approved by an ethic committee (Comité d'éthique du CYROI number 114; Cyclotron Reunion

Océan Indien, Sainte Clotilde, Reunion Island), and authorized by the French Ministry of Higher Education, of Research and Innovation. On Madagascar, research permits were delivered by "Direction du Système des Aires Protégées and Direction Générale de l'Environnement et des Forêts" (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) and samples were exported to Reunion Island thanks to a permit delivered by the Malagasy national authority (243C-EA06/MG12). 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). Finally, on Reunion Island, research permits were delivered by the Préfecture de La Réunion (Arrêté préfectoral du 11 Février 2013 and Arrêté préfectoral du 11 Septembre 2014 N°2014-07).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors have no competing interests.

Author details

¹Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, INSERM 1187, CNRS 9192, IRD 249, Université de La Réunion, Sainte-Clotilde, La Réunion, France. ²Association Vahatra, Antananarivo, Madagascar. ³Field Museum of Natural History, Chicago, USA. ⁴Veterinary Faculty, Eduardo Mondlane University, Maputo, Mozambique. ⁵School of Life Sciences, University of Kwa-Zulu Natal, Kwa-Zulu Natal, South Africa. ⁶Instituto Nacional de Saúde, Maputo, Mozambique. ⁷Present Address: Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo 101, BP 1274, Ambatofotsikely, Madagascar.

Received: 26 July 2021 Accepted: 28 September 2021

Published online: 12 October 2021

References

- Petney TN, Andrews RH. Multiparasite communities in animals and humans: frequency, structure and pathogenic significance. *Int J Parasitol.* 1998;28:377–93.
- Cox FEG. Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology.* 2001;122:S23–38.
- Rigaud T, Perrot-Minnot M-J, Brown MJF. Parasite and host assemblages: embracing the reality will improve our knowledge of parasite transmission and virulence. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2010;277:3693–702.
- Vaumourin E, Vourc'h G, Gasqui P, Vayssier-Taussat M. The importance of multiparasitism: examining the consequences of co-infections for human and animal health. *Parasites Vectors.* 2015;8:545.
- Hoarau AOG, Mavingui P, Lebarbenchon C. Coinfections in wildlife: focus on a neglected aspect of infectious disease epidemiology. *PLOS Pathogens.* 2020;16:e1008790.
- Pedersen AB, Fenton A. Emphasizing the ecology in parasite community ecology. *Trends Ecol Evol.* 2007;22:133–9.
- Hellard E, Fouchet D, Vavre F, Pontier D. Parasite–parasite interactions in the wild: How to detect them? *Trends Parasitol.* 2015;31:640–52.
- Peel AJ, Wells K, Giles J, Boyd V, Burroughs A, Edson D, et al. Synchronous shedding of multiple bat paramyxoviruses coincides with peak periods of Hendra virus spillover. *Emerg Microbes Infect.* 2019;8:1314–23.
- Kaufman E. Two (or more) viruses in one bat: a systematic quantitative literature review of viral coinfection in bats. Independent Study Project (ISP); 2020 p. 3345. https://digitalcollections.sit.edu/isp_collection/3345/.
- Rizzo F, Edenborough KM, Toffoli R, Culasso P, Zoppi S, Dondo A, et al. Coronavirus and paramyxovirus in bats from northwest Italy. *BMC Vet Res.* 2017;13(1):396.

11. Seltmann A, Corman VM, Rasche A, Drosten C, Czirájk GÁ, Bernard H, et al. Seasonal fluctuations of astrovirus, but not coronavirus shedding in bats inhabiting human-modified tropical forests. *EcoHealth*. 2017;14:272–84.
12. Luis AD, Hayman DTS, O'Shea TJ, Cryan PM, Gilbert AT, Pulliam JRC, et al. A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: Are bats special? *Proc R Soc B Biol Sci*. 2013;280:20122753.
13. Anthony SJ, Epstein JH, Murray KA, Navarrete-Macias I, Zambrana-Torrelío CM, Solovyov A, et al. A strategy to estimate unknown viral diversity in mammals. *mBio*. 2013;4(5):e00598-13.
14. Iehlé C, Razafitrimo G, Razainirina J, Andriaholinirina N, Goodman SM, Faure C, et al. Henipavirus and Tioman virus antibodies in pteropodid bats. *Madagascar Emerg Infect Dis*. 2007;13:159–61.
15. Wilkinson DA, Temmam S, Lebarbenchon C, Lagadec E, Chotte J, Guillebaud J, et al. Identification of novel paramyxoviruses in insectivorous bats of the Southwest Indian Ocean. *Virus Res*. 2012;170:159–63.
16. Wilkinson DA, Melade 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.
17. Dietrich M, Wilkinson DA, Benlali A, Lagadec E, Ramasindrazana B, Delagi K, et al. Leptospira and paramyxovirus infection dynamics in a bat maternity enlightens pathogen maintenance in wildlife: dual infection dynamics in a bat maternity. *Environ Microbiol*. 2015;17:4280–9.
18. Razanajatovo NH, Nomenjanahary LA, Wilkinson DA, Razafimanahaka JH, Goodman SM, Jenkins RK, et al. Detection of new genetic variants of Betacoronaviruses in endemic frugivorous bats of Madagascar. *Viol J*. 2015;12:42.
19. 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.
20. Lebarbenchon C, Ramasindrazana B, Joffrin L, Bos S, Lagadec E, Le Minter G, et al. Astroviruses in bats, Madagascar. *Emerg Microbes Infect*. 2017;6:e58.
21. Hoarau F, Le Minter G, Joffrin L, Schoeman CM, Lagadec E, Ramasindrazana B, et al. Bat astrovirus in Mozambique. *Viol J*. 2018;15:104.
22. Brook CE, Ranaivoson HC, Broder CC, Cunningham AA, Héraud J, Peel AJ, et al. Disentangling serology to elucidate henipa- and filovirus transmission in Madagascar fruit bats. *J Anim Ecol*. 2019;88:1001–16.
23. Joffrin L, Goodman SM, Wilkinson DA, Ramasindrazana B, Lagadec E, Gomard Y, et al. Bat coronavirus phylogeography in the western Indian Ocean. *Sci Rep*. 2020;10(1):6873.
24. Chu DKW, Poon LLM, Guan Y, Peiris JSM. Novel Astroviruses in insectivorous bats. *J Virol*. 2008;82:9107–14.
25. Tong S, Chern S-WW, Li Y, Pallansch MA, Anderson LJ. Sensitive and broadly reactive reverse transcription-PCR assays to detect novel paramyxoviruses. *J Clin Microbiol*. 2008;46:2652–8.
26. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria; 2015.
27. Schliep KP. phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*. 2011;27:592–3.
28. Altschul S. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997;25:3389–402.
29. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol*. 2000;7:203–14.
30. Guindon S, Dufayard J-F, 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.
31. Drexler JF, Corman VM, Müller MA, Maganga GD, Vallo P, Binger T, et al. Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nat Commun*. 2012;3:796.
32. Fischer K, Pinho dos Reis V, Balkema-Buschmann A. Bat astroviruses: towards understanding the transmission dynamics of a neglected virus family. *Viruses*. 2017;9:34.
33. Ithete NL, Stoffberg S, Corman VM, Cottontail VM, Richards LR, Schoeman MC, et al. Close relative of human Middle East respiratory syndrome coronavirus in bat. *S Afr Emerg Infect Dis*. 2013;19:1697–9.
34. Smith CS, de Jong CE, Meers J, Henning J, Wang L-F, Field HE. Coronavirus infection and diversity in bats in the Australasian region. *EcoHealth*. 2016;13:72–82.
35. Willoughby A, Phelps K, PREDICT Consortium, Olival K. A comparative analysis of viral richness and viral sharing in cave-roosting bats. *Diversity*. 2017;9:35.
36. Altizer S, Dobson A, Hosseini P, Hudson P, Pascual M, Rohani P. Seasonality and the dynamics of infectious diseases. *Ecol Lett*. 2006;9:467–84.
37. Drexler JF, Corman VM, Wegner T, Tateno AF, Zerbini RM, Gloza-Rausch F, et al. Amplification of emerging viruses in a bat colony. *Emerg Infect Dis*. 2011;17:449–56.
38. Mühlendorfer K, Speck S, Kurth A, Lesnik R, Freuling C, Müller T, et al. Diseases and causes of death in European bats: dynamics in disease susceptibility and infection rates. *PLoS ONE*. 2011;6:e29773.
39. George DB, Webb CT, Farnsworth ML, O'Shea TJ, Bowen RA, Smith DL, et al. Host and viral ecology determine bat rabies seasonality and maintenance. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108:10208–13.
40. Wacharapluesadee S, Boongird K, Wanghongsa S, Ratanasetyuth N, Supavonwong P, Saengsen D, et al. A longitudinal study of the prevalence of Nipah virus in *Pteropus lylei* bats in Thailand: evidence for seasonal preference in disease transmission. *Vector-Borne Zoonot Dis*. 2010;10:183–90.
41. Joffrin L, Hoarau AOG, Lagadec E, Köster M, Ramanantsalama RV, Mavingui P, et al. Astrovirus in Reunion free-tailed bat (*Mormopterus francoismoutoui*). *Viruses*. 2021;13:1524.
42. Mendenhall IH, Smith GJD, Vijaykrishna D. Ecological drivers of virus evolution: astrovirus as a case study. *J Virol*. 2015;89:6978–81.

Publisher's Note

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

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



III. Chapitre II

**Dynamique temporelle de co-
infections aux coronavirus,
paramyxovirus et astrovirus chez le
Petit Molosse de La Réunion**

III.1. Saisonnalité et dynamique d'infection

Les changements saisonniers (*e.g.* variations de températures, pluies) sont cycliques et prédictibles. Ils jouent un rôle majeur dans les dynamiques de populations et dans les dynamiques infectieuses. Ainsi, l'incidence de nombreux agents infectieux évolue de manière périodique (*e.g.* Dowell 2001 ; Altizer *et al.* 2006). Par exemple, dans les pays au climat tempéré, des pics d'infection par le virus responsable de la grippe apparaissent pendant les mois d'hiver (Tamerius *et al.* 2013) (Figure 21). Dans les régions tropicales, on peut retrouver une augmentation du nombre de cas de malaria après la saison des pluies, certainement en relation avec l'augmentation des vecteurs du genre *Anopheles* responsable de la transmission (Altizer *et al.* 2006 ; Caminade *et al.* 2014).

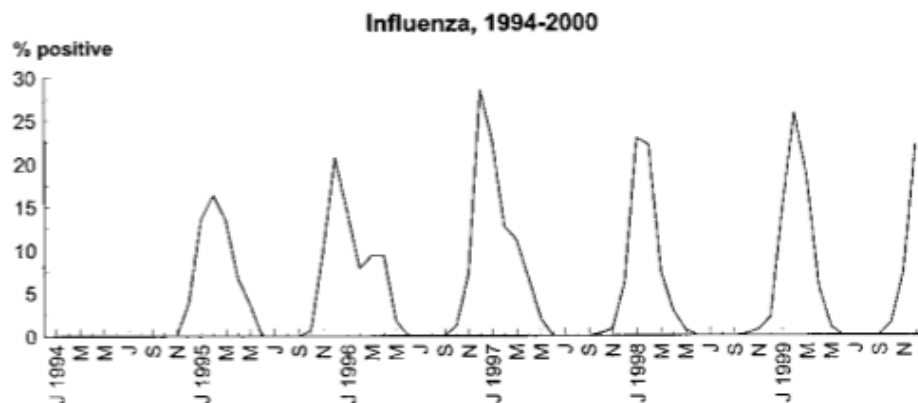


Figure 21. Variation saisonnière de la prévalence d'infection aux virus influenza aux États-Unis parmi les individus testés par l'Organisation Mondiale de la Santé et par le Système national de surveillance des virus respiratoires et entériques (1994-2000) (Dowell 2001).

De manière générale, les variations de l'incidence des agents infectieux sont liées à la modification des interactions hôtes-pathogènes en lien avec des changements biologiques et écologiques (Altizer *et al.* 2006). Les périodes favorables à la transmission d'agents infectieux au sein d'une population peuvent alors être à l'origine de l'émergence de ces pathogènes dans d'autres espèces, dont l'Homme. Par exemple, une étude rétrospective concernant des infections au virus Marburg indique que près de 80% des cas humains recensés sont causés par des transmissions ponctuelles depuis des chauves-souris (Amman *et al.* 2012). Ces événements auraient lieu principalement lors de périodes où les prévalences d'infection sont particulièrement élevées dans les colonies de chauves-souris (Amman *et al.* 2012),

soulignant un lien probable entre la dynamique de transmission virale chez l'hôte réservoir et les sauts d'espèces.

Les changements saisonniers influencent les comportements sociaux de nombreux animaux. Ils modifient la fréquence des contacts et des rencontres entre individus. Par exemple, l'agrégation d'individus autour d'un point d'eau lors de la saison sèche, autour de ressources alimentaires durant les mois les plus propices, ou encore lors des périodes de reproduction, sont des moments critiques en terme de transmission d'agents infectieux, du fait de la promiscuité entre les individus ainsi que les fortes densités de populations (Altizer *et al.* 2006). Chez les phoques (*Phoca vitulina*), les épidémies de la maladie de Carré (causée par un PMV) sont associées aux périodes de rassemblement des individus sur les plages (Swinton *et al.* 1998 ; Altizer *et al.* 2006). Chez les moufettes (famille des Mephitidae), l'agrégation saisonnière des individus en hiver et au printemps pourrait être à l'origine de l'augmentation de l'incidence de la rage (Gremillion-Smith et Woolf 1988 ; Altizer *et al.* 2006).

La migration peut également affecter les dynamiques de transmission (Altizer *et al.* 2011). De nombreuses espèces animales entreprennent des déplacements saisonniers sur de longues distances, pour répondre aux changements environnementaux (naturels ou anthropiques) qui impactent la ressource alimentaire (Altizer *et al.* 2011 ; Dingle 2014). Pour certaines espèces, les besoins énergétiques liés à la migration et le stress physiologique engendré, peuvent compromettre l'immunité, ce qui augmente la sensibilité aux infections et renforce l'impact des maladies (Altizer *et al.* 2011). Par ailleurs, les déplacements de ces animaux sur de longues distances, ainsi que l'exposition à de nouveaux habitats, jouent également un rôle considérable dans la dispersion de certains agents infectieux (Altizer *et al.* 2011). Par exemple, les migrations saisonnières des canards dans l'hémisphère nord ont un rôle structurant sur la prévalence et la diversité des virus influenza (Bahl *et al.* 2013), et peuvent, ponctuellement, contribuer à la propagation de formes hautement pathogènes (Verhagen *et al.* 2015).

La saisonnalité des comportements de reproduction affecte également les dynamiques d'interaction hôtes-pathogènes, en particulier pour les espèces grégaires. Au-delà des effets liés à l'agrégation des individus, cette période est propice aux transmissions d'agents infectieux pour plusieurs raisons (Altizer *et al.* 2006). Les

naissances, regroupées sur une courte période, génèrent l'apparition d'un nombre important de nouveaux hôtes immunologiquement naïfs, impactant l'immunité collective de la population (Altizer *et al.* 2006). Une étude menée chez des pinsons domestiques (*Haemorrhous mexicanus*) a mis en évidence les liens entre la saisonnalité de la reproduction et des pics d'infection de la bactérie *Mycoplasma gallisepticum* responsable de conjonctivites chez ces oiseaux, en Amérique du nord (Hosseini *et al.* 2004). Les transmissions accrues de cette bactérie sont prédictibles. Elles ont lieu principalement en automne et en hiver, et sont liées à la présence importante de juvéniles dans la population suite à la reproduction ayant lieu en été (Altizer *et al.* 2004). Par ailleurs, le statut reproducteur des adultes dans les populations joue également un rôle déterminant dans les dynamiques infectieuses. Chez plusieurs espèces d'oiseaux, la période de reproduction est corrélée à de plus grandes charges parasitaires et à une baisse de la production d'anticorps ainsi que de l'immunité adaptative (e.g. Hillgarth et Wingfield 1997 ; Moreno *et al.* 2001). Les compromis entre les fonctions immunitaire et la reproduction expliquent par exemple que les femelles gestantes de nombreuses espèces de mammifères voient leur immunité baissée (Sheldon et Verhulst 1996 ; Klein 1999 ; Cattadori *et al.* 2005). Enfin, chez les mâles de nombreuses espèces, l'élévation des taux de testostérone durant les périodes d'accouplement est aussi reliée à une baisse de l'immunité, et par conséquent à une élévation de l'incidence de certains agents infectieux (Festa-Bianchet 1989).

III.2. Saisonnalité de la reproduction et dynamiques d'infection chez les chauves-souris

Les chauves-souris sont des espèces grégaires pouvant former des colonies composées de plusieurs milliers d'individus. Cette particularité participe à l'accroissement des risques de transmission et le maintien de la circulation des agents infectieux au sein de leurs colonies. Par ailleurs, la majorité des espèces de chauves-souris (milieu tempéré et milieu tropical) met bas de manière synchronisée et saisonnière une à deux fois par an (Hood 1983). Plusieurs études ont mis en évidence les liens entre saisonnalité de la reproduction et dynamiques infectieuses au sein de ces mammifères. Par exemple, une étude menée chez le Grand Murin (*Myotis myotis*) en Europe a révélé une baisse de l'immunité adaptative chez les femelles gravides et une augmentation de l'infestation par des ectoparasites hématophages (*Spinturnix*

myoti) par rapport à des femelles non gravides vivant dans la même colonie (Christe *et al.* 2000). Par ailleurs, durant la lactation, la même étude a démontré un rétablissement de l'immunocompétence des femelles, et que cette dernière était positivement corrélée à la masse corporelle (Christe *et al.* 2000). Dans une autre colonie de Grands Murins, une étude a révélé l'amplification de la circulation d'astrovirus et de coronavirus lors de la formation de la colonie de maternité (Drexler *et al.* 2011), avec la présence de pics d'infection après la parturition, probablement due à l'introduction d'individus naïfs suite à la reproduction. Une étude longitudinale menée chez le Petit Renard Volant (*Pteropus scapulatus*), en Australie, a révélé que les femelles gravides et allaitantes présentaient un risque plus élevé d'être infectées par le virus Hendra (Plowright *et al.* 2008). Cette étude a également suggéré que ces patrons d'infection pourraient expliquer des cas de transmission à d'autres espèces, observés durant la période de reproduction de ces chauves-souris (Plowright *et al.* 2008).

III.2.1. Contexte de notre étude

À La Réunion, deux études menées antérieurement ont mis en évidence des variations dans les dynamiques temporelles d'infection aux CoV, PMV, et bactéries leptospires (*Leptospira* sp) dans une colonie de Petits Molosses (*Mormopterus francoismoutou*), en lien avec la saisonnalité de sa reproduction (Dietrich *et al.* 2015b ; Joffrin *et al.* 2022). Néanmoins, les informations portant sur la co-circulation de plusieurs agents infectieux au cours de saisons de reproduction successives sont inexistantes. De plus, l'investigation de ces dynamiques d'infection dans l'espace, entre plusieurs colonies, n'a pas été réalisée. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la dynamique de transmission des CoV, PMV et AstV, au sein de deux colonies de maternité du Petit Molosse de La Réunion, et au cours de plusieurs saisons de reproduction consécutives. Nous faisons l'hypothèse de l'existence de variations marquées de la dynamique d'excrétion virale, en lien avec la structure de la population de chauves-souris, et ce, de façon répétée entre saisons. Des variations entre colonies pourraient néanmoins refléter un effet de la taille et de la densité des populations sur la dynamique de transmission virale. Par ailleurs, nous faisons l'hypothèse de l'existence d'interactions entre les trois virus en raison de leur tropisme commun (tropisme intestinal).

III.2.1.a) Le Petit Molosse de La Réunion

Le Petit Molosse de La Réunion (*Mormopterus francoismoutoui*, famille : Molossidae) est l'espèce de chauve-souris la plus abondante sur l'île (Figure 22 (A)). Anciennement assimilée à l'espèce *Mormopterus acetabulosus*, considérée comme endémique des Mascareignes, des analyses morphométriques et génétiques ont permis de décrire le Petit Molosse comme espèce à part entière (Goodman *et al.* 2008). Seul mammifère endémique de La Réunion, cette chauve-souris insectivore occupe des habitats variés. On la retrouve dans les milieux naturels tels que les grottes, les fissures dans les formations rocheuses, et les falaises. Cette espèce a également colonisé les milieux anthropisés, dans les constructions humaines tels que les bâtiments (greniers, faux plafonds) ou encore les ponts, offrant des opportunités de rencontres fréquentes avec l'Homme. En terme de conservation, cette espèce est classée en préoccupation mineure par l'UICN (International Union for Conservation of Nature (IUCN) 2021) mais est néanmoins listée comme espèce protégée par arrêté ministériel (1989). Le Petit Molosse a la particularité de former des colonies monospécifiques allant de quelques centaines à plusieurs dizaines de milliers d'individus (Moutou 1982 ; Goodman *et al.* 2008). La plus grande colonie connue à ce jour est une colonie de maternité située dans une grotte, sur la commune de Trois-Bassins dans l'ouest de l'île. On y recense près de 50 000 individus adultes pendant la période de reproduction (Dietrich *et al.* 2015b). Bien qu'elle soit abondante sur l'île, la biologie de cette chauve-souris reste méconnue. Par ailleurs, plusieurs études ont mis en évidence la circulation d'agents infectieux au sein de cette espèce (*cf.* partie I.3.2.4) Archipel des Mascareignes dans l'Introduction générale).

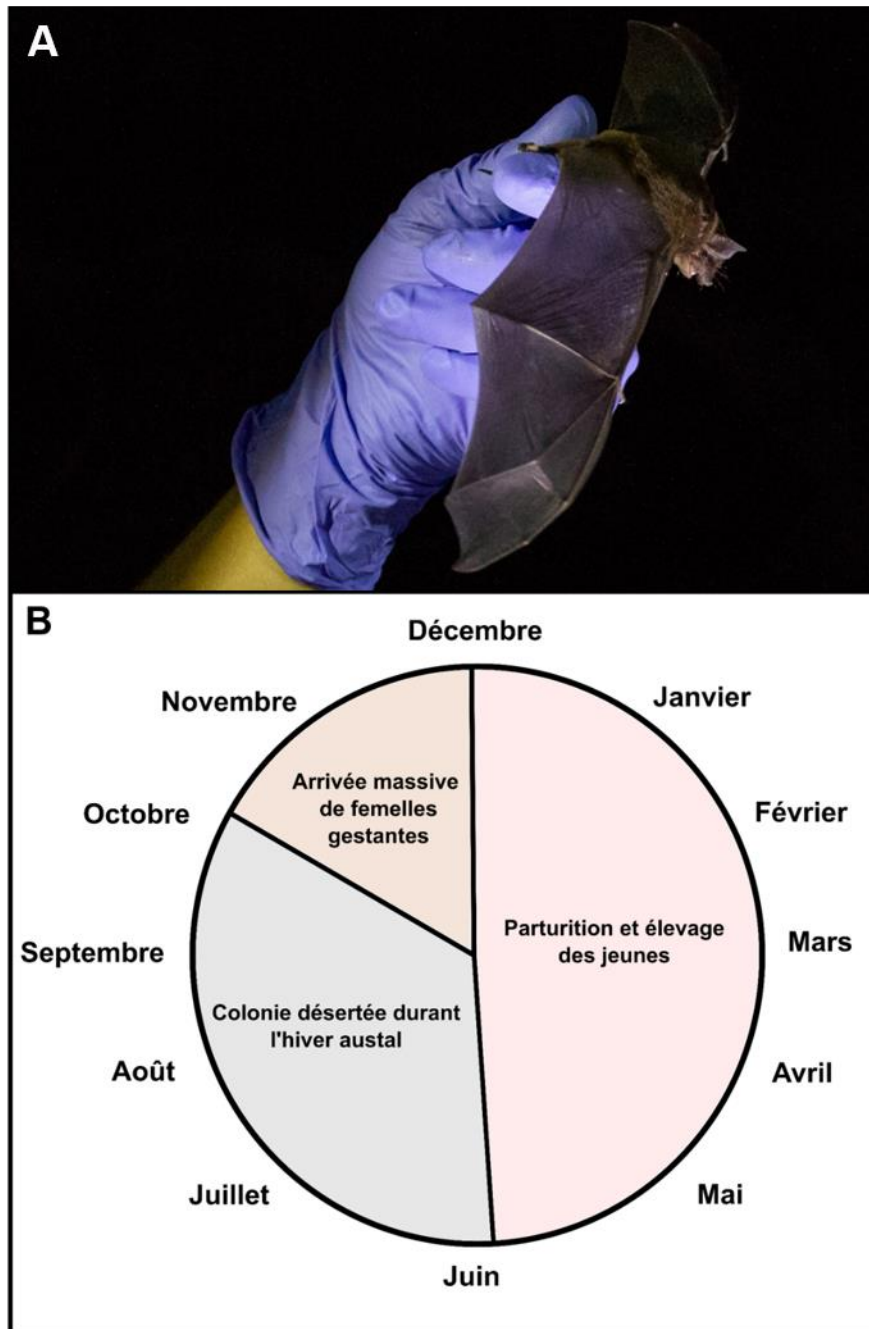


Figure 22. Le Petit Molosse de La Réunion (*Mormopterus francoismoutou*). (A) Image d'un individu (Photo de Marc LEMENAGER). (B) Son cycle de reproduction au sein de la grotte de Trois-Bassins (Basé sur Dietrich *et al.* 2015b et Joffrin *et al.* 2022)

III.2.1.b) Sites d'étude et échantillonnage

La première colonie de maternité retenue pour cette étude est la colonie localisée à Trois-Bassins. Cette colonie est située en milieu naturel dans une grotte d'environ 30 m³ (Figure 23 (A)). Elle est occupée neuf mois durant l'année, d'octobre à juin (Dietrich *et al.* 2015b ; Joffrin *et al.* 2022). La saisonnalité de la reproduction dans cette colonie est très marquée (Figure 22 (B)) (Dietrich *et al.* 2015b). Le début

de la saison est accompagné d'un rassemblement massif de femelles gestantes. Puis, la parturition a lieu entre mi-décembre et mi-janvier (Dietrich *et al.* 2015b ; Joffrin *et al.* 2022). Les femelles élèvent les jeunes pendant plusieurs semaines et quittent progressivement la colonie lorsque les nouveau-nés sont sevrés (Dietrich *et al.* 2015b ; Joffrin *et al.* 2022). À partir du mois de mars, les juvéniles quittent à leur tour la colonie. La grotte reste alors inoccupée de juin à octobre, jusqu'à l'arrivée des femelles gestantes lors de la saison suivante (Joffrin *et al.* 2022). L'évolution de la dynamique démographique au sein de cette colonie est facilement observable. Les nouveau-nés, juvéniles et adultes se distinguent par la couleur ou l'absence de leurs pelages.

La seconde colonie retenue est une autre colonie de maternité, localisée dans un bâtiment en bord de route (transformateur électrique), sur la commune de Sainte-Marie (Figure 23 (B)). Cette colonie est, contrairement à la première, occupée toute l'année. La taille de sa population est moins importante et peut atteindre jusqu'à 1200 individus. Néanmoins, malgré les différences avec la première colonie, la saisonnalité de la reproduction y est également très marquée et synchronisée. Chaque année, les premières naissances y sont observées à la même période que dans la colonie de Trois-Bassins. Ce site a été suivi pendant trois années consécutives.

Une collecte d'échantillons n'impliquant pas de captures a été employée afin de limiter le dérangement au sein des colonies (Annexe 3). Des fèces fraîches excrétées par les chauves-souris ont été collectées toutes les deux à cinq semaines. La détection des ARN viraux dans échantillons a été réalisée à l'aide des tests PCR spécifiques (ciblant le gène de la polymérase).

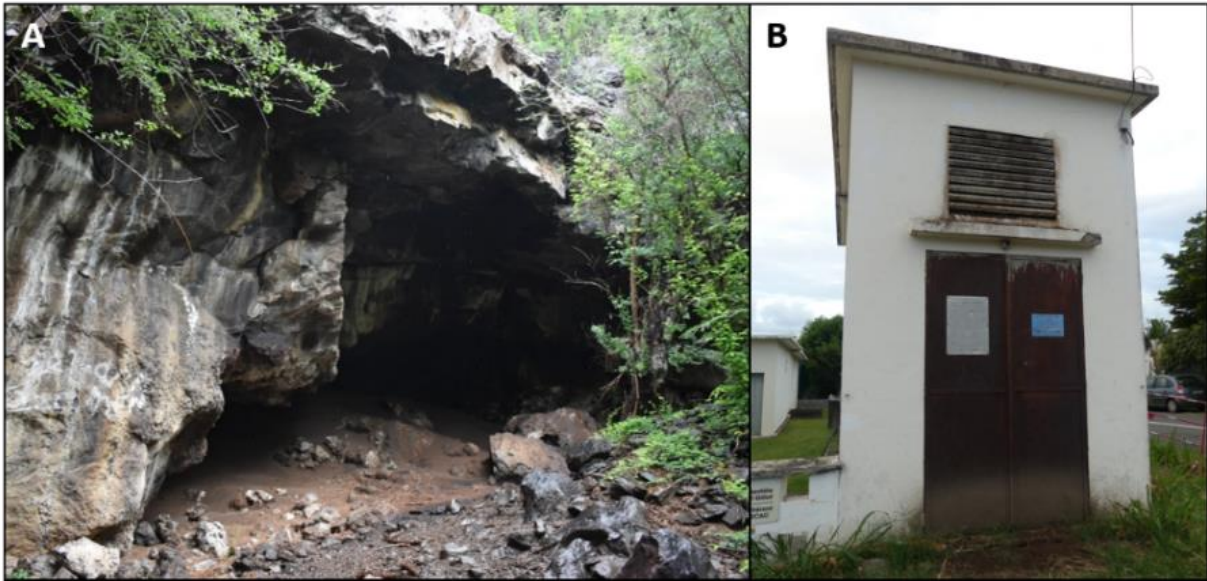


Figure 23. Colonies de maternité de Petit Molosse sélectionnées pour l'étude. (A) Colonie située dans une grotte sur la commune de Trois-Bassins. (B) Colonie située dans un transformateur électrique sur la commune de Sainte-Marie.

III.2.2. Résumé de l'étude (Article 3)

Les objectifs de cette étude étaient de tester : (i) les liens existant entre l'évolution de la structure des populations et les dynamiques d'excrétion des CoV, PMV et AstV ; (ii) l'effet du type d'habitat sur les dynamiques d'infection ; et (iii) la présence de co-infections et d'interactions entre virus. Trois familles virales ont été criblées sur 3422 échantillons collectés dans les deux colonies, au cours de 64 sorties de terrain correspondant à quatre saisons de reproduction consécutives. Les trois familles virales ont été détectées dans les deux colonies et durant toutes les saisons. Les prévalences globales d'infection étaient significativement différentes entre virus : $16,7\% \pm 1,3\%$ pour les coronavirus, $6,5\% \pm 0,8\%$ pour les paramyxovirus, et $1,7\% \pm 0,4\%$ pour les astrovirus ($\chi^2 = 526,7$; ddl = 2 ; $P < 0,01$). Nous avons pu mettre en évidence des fluctuations significatives de prévalences d'infection en fonction des dates de collecte pour chaque virus (AstV : GLMM : $\chi^2 = 5,70$, $P < 0,05$; CoV : GLMM : $\chi^2 = 975,29$, $P < 0,001$; PMV : GLMM : $\chi^2 = 97,69$, $P < 0,001$). Aucune différence significative n'a été détectée entre saisons. Par ailleurs, nous n'avons pas détecté de variation des prévalences d'infection entre sites pour les AstV et les CoV, mais avons montré que le nombre d'échantillons positifs aux PMV était significativement plus élevé dans la colonie située à Sainte-Marie, probablement en raison des opportunités d'échantillonnage différentes entre les deux colonies (GLMM : $\chi^2 = 5,10$, $P < 0,05$). Globalement, nous avons mis en évidence que les patrons d'infection étaient fortement

similaires entre sites pour chaque famille virale et conservés entre les saisons, probablement en lien avec la saisonnalité de gestation et d'élevage des jeunes chez cette espèce. Par ailleurs, un total de 37 échantillons a été testé positif à plus d'un des trois virus investigués, représentant une prévalence globale de co-infection de $1,1\% \pm 0,4\%$, sans différence significative entre sites, ni entre saisons. Seules des co-infections bi-partites ont été détectées. Les co-infections impliquant CoV et PMV étaient plus souvent détectées que les autres, probablement du fait que leurs prévalences globales étaient plus élevées ($\chi^2 = 22,19$, ddl = 2, $P < 0,001$). Enfin, aucune interaction n'a été détectée entre les trois familles virales de notre étude.

Les résultats des travaux menés dans ce chapitre ont fait l'objet de la présentation de deux posters à des congrès internationaux au cours de cette thèse : « *Island Biology 2019* » et « *Ecology and Evolution of Infectious Diseases 2021* » (Annexe 4 et Annexe 5).

III.2.3. Article 3 : “Bat virus on a tropical island: shedding dynamics and co-infections in maternity colonies”

En préparation

1 **Bat virus on a tropical island: shedding dynamics and co-infections**
2 **in maternity colonies**

3 Axel O. G. Hoarau*, Marie Köster, Muriel Dietrich, Gildas Le Minter, Léa Joffrin†, Riana
4 V. Ramanantsalama, Patrick Mavingui, Camille Lebarbenchon*
5 Université de La Réunion, Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, Inserm
6 1187, CNRS 9192, IRD 249, Sainte-Clotilde, La Réunion, France.

7 † Present address: Evolutionary Ecology Group, Department of Biology, University of
8 Antwerp, Universiteitsplein 1, 2610 Antwerp, Belgium.

9 * **Corresponding authors:**

10 axel.hoarau@univ-reunion.fr

11 camille.lebarbenchon@univ-reunion.fr

12

13 **ABSTRACT**

14 Virus transmission dynamics in reservoir hosts are driven by biological and ecological
15 processes. Indeed, bat population structure and reproductive cycles can affect RNA
16 virus transmission. For instance, previous studies have shown that parturition of
17 pregnant females and aggregation of juvenile Reunion free-tailed bats (*Mormopterus*
18 *francoismoutoui*) are associated to a major increase in the prevalence of bats shedding
19 viruses. The synchronicity of such shedding pulses, however, is yet to be assessed
20 between viruses and maternity colonies, as well as the occurrence of co-infections.
21 The epidemiological significance of this phenomenon remains to be investigated as
22 well. Based on 3422 fresh faeces collected during four consecutive birthing seasons,
23 simultaneously in two maternity colonies, we report the prevalence of bats shedding
24 astroviruses (AstVs), coronaviruses (CoVs), and paramyxoviruses (PMVs) on a small
25 oceanic island. We found that the proportion of bats shedding viruses is highly

26 influenced by sampling collection dates, and therefore by the seasonality of parturition.
27 We highlight that virus shedding patterns is reproducible among seasons and colonies
28 for CoVs and at a lesser extent for PMVs, but not for AstVs. We also report 1% of bats
29 harbouring double infections, mostly CoVs and PMVs, but none shedding a triple
30 infection AstVs, CoVs and PMVs.

31

32 **KEY WORDS**

33 Astrovirus, coronavirus, paramyxovirus, *Mormopterus francoismoutoui*, Molossidae,
34 Reunion Island, Indian Ocean

35

36 **INTRODUCTION**

37 Seasonal infection dynamics are driven by a large set of biological and ecological
38 factors, including social behaviours and changes in host population structure [1]. For
39 instance, several bat species, such as those belonging to family Molossidae,
40 aggregate at very high densities in maternity colonies, generating highly conducive
41 conditions for the transmission of infectious agents [2–4]. Although many studies have
42 reported viruses, bacteria, and blood parasites in bats, an accurate assessment of their
43 temporal variation, in natural populations as well as interactions between infectious
44 agents, remain highly challenging. Such a knowledge is critical, since viral shedding
45 pulses have been shown to be associated to spillover to other hosts, including humans
46 [7], and multiple infections and interactions between infectious agents can have major
47 effects on both host fitness and virus transmission dynamics [8–13]. However,
48 longitudinal studies focusing on the infection dynamics of multiple infectious agents
49 remain scarce [3,4,14,15].

50 In this study, we investigated the effects of the population age structure and colony
51 type on virus shedding dynamics, in bats. Because reproductive cycles are highly
52 synchronized, we hypothesized that viral shedding patterns could be similar and
53 predictable between years. However, differences may be expected between viral
54 families, and associated to either epidemiological or ecological factors such as herd
55 immunity or environmental persistence. Viral co-circulation in bat populations may also
56 generate positive or negative interactions between viruses, with cascade effects on
57 their transmission dynamics.

58 To test these hypotheses, we focused on the Reunion free-tailed bat (RFTB;
59 *Mormopterus francoismoutoui*), a molossid species endemic to Reunion Island. We
60 collected 3422 fresh faeces simultaneously in two maternity colonies, during four
61 consecutive years. Presence of astroviruses, coronaviruses, and paramyxoviruses,
62 three viral families previously reported in this species [4,16,17], were investigated. We
63 precisely (i) assessed temporal variations in the prevalence of bats shedding viruses,
64 (ii) estimated the proportion of co-infected bats and (iii) tested whether the detection of
65 a given viral family was associated to the presence of another.

66

67 **MATERIAL AND METHODS**

68 **Study sites**

69 The study was conducted in two colonies of RFTB on Reunion Island, a 2500 km²
70 oceanic island located in the South-Western Indian Ocean. The larger colony was
71 located in a ~ 30 m³ natural cave on the West coast of the island (referred to hereafter
72 as “cave”). This colony is occupied only during the birthing season, from October to
73 June, and exclusively by RFTB (all colonies are monospecific) [4]. During the early

74 stages of the season (October to December), the colony is mainly composed of
75 pregnant females, with a population reaching about 40,000 to 50,000 flying bats before
76 parturition (starting in mid-December) [4]. Then, from January to May, the colony is
77 mainly composed of newborns and juveniles. Once all juveniles have left the cave, it
78 remains empty from June onward, until the following maternity season, in October. As
79 for previous studies [4,18], population age structure and parturition timing was visually
80 monitored based on bat morphology (adults : brown fur; newborns: nude pink skin;
81 juveniles : dark grey fur).

82 A smaller colony (up to 1,200 flying bats) was also monitored, in a ~ 5 m³ building
83 housing a power transformer, located in the North coast of the island (referred to
84 hereafter as “building”). In this colony, adults are reported all year long but newborns
85 are present in mid-December, and juveniles between January and May, as for the cave
86 colony. The building remains occupied between June and September, although it is not
87 possible to visually assess the population age structure. Indeed, differences between
88 juveniles and adults cannot be discriminated based on fur colouration only at this time
89 of the year.

90 The cave colony was monitored during four years (i.e. birthing seasons), from October
91 2016 to March 2020. The building colony was monitored during three years (November
92 2017 to October 2020). Because of the lockdown associated to the COVID19
93 pandemic, however, sampling was not achieved in March and April 2020.

94

95 **Sample collection**

96 Fresh bat faeces were collected every two to five weeks, and during the same day in
97 both colonies (except for 9 sampling sessions, because of bad weather). For cave

98 colony, samples were collected in the morning (when bats return from feeding), by
99 placing Benchguard® sheets (60 cm x 49 cm) (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA,
100 USA) under roosting bats [18]. For building colony, samples were collected during bat
101 emergence, at dusk, due to access restriction to the power transformer. Plastic trays
102 with Benchguard® strips (12 cm x 35 cm) were placed below the colony entrance
103 before bat emergence. For both colonies, faeces were individually placed into a tube
104 containing 1.5 mL of brain heart infusion medium (Conda, Madrid, Spain)
105 supplemented with penicillin G (1000 units/mL), streptomycin (1 mg/mL), kanamycin
106 (0.5 mg/mL), gentamicin (0.25 mg/mL) and amphotericin B (0.025 mg/mL). Samples
107 were maintained refrigerated in the field and stored at – 80 °C in the laboratory.

108 In total, 3422 fresh faeces were collected from the two colonies over 64 sampling
109 sessions (**Supplementary material 1**). In summary, 580 samples were collected in the
110 cave between October 2016 and June 2017 for the first season, during 14 sampling
111 sessions. For the second season, a total of 964 faeces were collected in both sites
112 (cave: n = 499; building: n = 465) between November 2017 and October 2018, during
113 17 sampling sessions. Nine hundreds and eighty faeces were collected (cave: n = 525;
114 building: n = 455) between November 2018 and September 2019 during 17 sampling
115 sessions. Finally, 898 samples were collected (cave: n = 440; building: n = 458)
116 between October 2019 and October 2020 during 16 sampling sessions.

117

118 **RNA extraction and cDNA synthesis**

119 Samples were thawed at 4°C overnight, briefly vortexed, and centrifuged at 1500 g for
120 15 min. RNA extraction was performed with the IndiSpin QIAcube HT Pathogen Kit
121 (QIAGEN, Hilden, Germany). Reverse-transcription was performed on 10 µL of RNA,

122 as previously described [19], using the ProtoScript II Reverse Transcriptase and
123 Random primers 6 (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA).

124

125 **Virus detection**

126 cDNAs were tested for the presence of the astroviruses (AstVs) RNA-dependent RNA-
127 polymerase (RdRp) gene using a Pan-AstV semi-nested polymerase chain reaction
128 (PCR), following a previously published protocols [16,19,20,21]. PCRs were performed
129 with the GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) in an
130 Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,
131 USA). PCR products were visualized on 2% agarose gels stained with 2% Gelred
132 (Biotium, Hayward, CA, USA).

133 cDNAs were tested for the presence of the coronaviruses (CoVs) RdRp gene using a
134 Pan-Coronavirus multi-probe real-time (RT) PCR following a previously published
135 protocol [17,18,22]. PCRs were performed with the QuantiNova Probe PCR Master
136 Mix (QIAGEN, Hilden, Germany) in a CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection
137 System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Samples collected in the cave between
138 October 2016 and June 2018 were tested for CoV RNA as part of a previous study [18].

139 cDNAs were tested for the presence of the paramyxoviruses (PMVs) L-polymerase
140 gene targeting *Respiroviruses*, *Morbilliviruses*, and *Henipaviruses* (RMH) using a
141 semi-nested PCR [4,23,24,25] but with slight modifications (a 10-fold dilution of
142 amplicons obtained in the first PCR was performed to increase specificity). PCRs were
143 performed with the GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix (Promega, Madison, WI,
144 USA) in an Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific,

145 Waltham, MA, USA). PCR products were visualized on 2% agarose gels stained with
146 2% Gelred (Biotium, Hayward, CA, USA).

147

148 **Statistical analysis**

149 Analyses were made with the assumption that each faeces came from an individual
150 bat. Based on the high number of bats (hundreds in the buildings to tens of thousands
151 in the cave), together with the high bat density ($> 1,500$ individuals per m^2) [26], and
152 the limited time spent on the colony for sample collection (< 15 min), we considered
153 that the probability of sampling two or more faeces from the same bat was limited,
154 although this could not be formally excluded. Previous study on CoV shedding dynam-
155 ics also provided consistent results based on a similar sampling scheme, in the cave
156 [18], supporting that this methodology is appropriate to assess the prevalence of bats
157 shedding viruses.

158 Generalized linear mixed models (GLMMs) with a binomial error structure were used
159 to explore the effect of the colony (cave vs building) on the detection of AstVs, CoVs,
160 or PMVs RNA, with the sampling season (from October to September) and dates in-
161 cluded as random factors (**Supplementary material 2**). We also used GLMMs to in-
162 vestigate interactions between viruses, by testing whether the presence/absence of a
163 given virus was associated to those of other viruses (**Supplementary material 2**).
164 Analyses were conducted with the package "*lme4*" in R version 4.1.0 [27,28]. The most
165 parsimonious model was selected by excluding, step by step, every variable of the
166 complete model and using an ANOVA with a Chi-square test to compare models (**Sup-**
167 **plementary material 2**). Finally, we used Pearson Chi-square tests to examine the
168 effect of the colony and sampling season on the detection of co-infections.

169

170 RESULTS

171 Bat population age structure

172 Adult bats were observed between October and December, in both the cave and the
173 building colonies. Newborns were sighted from mid-December to late January,
174 suggesting that parturition was highly synchronized between the two maternity
175 colonies (newborns were sighted for the first time, each year, during the same sampling
176 session in both the cave and the building). From February onward, both colonies were
177 mainly composed of juvenile bats. No bats were observed in the cave between mid-
178 June and September. These observations are consistent with previous studies [4,18].

179

180 Infection dynamics

181 Astroviruses (AstVs) were detected in both colonies, and for all seasons
182 (**Supplementary material 1, Figure 1A**). In total, 59 samples tested positive (mean
183 detection rate \pm 95% confidence interval: 1.7% \pm 0.4%). A significant variation in AstV
184 RNA detection was found between sampling dates ($\chi^2 = 5.70$, $P < 0.05$), with up to 10%
185 \pm 10.7 % of bats shedding AstV. No significant variations were observed between
186 seasons ($\chi^2 = 0.08$, $P = 0.77$) nor colonies ($\chi^2 = 1.74$, $P = 0.20$).

187 Coronaviruses (CoVs) were detected in both colonies and for all seasons
188 (**Supplementary material 1, Figure 1B**). In total, 573 samples tested positive (16.7%
189 \pm 1.3%). A significant variation in CoV RNA detection was found between sampling
190 dates ($\chi^2 = 975.29$, $P < 0.001$); however, as for AstVs, no significant variation was
191 observed between seasons ($\chi^2 = 0$, $P = 1$) nor colonies ($\chi^2 = 0.19$, $P = 0.66$). Major
192 variations in the prevalence of bats shedding CoVs were found, with a first shedding
193 pulse in December (e.g. between 8.0% \pm 7.5% in 2017-2018 and 38.0% \pm 13.5% in

194 2018-2019, in the cave), followed by a second in February (e.g. between 72.0% ±
195 12.5% in 2017-2018 and 78.0% ± 11.5% in 2016-2017, in the cave). Interestingly, the
196 second shedding pulse was delayed in March, for both colonies, in 2019-2020
197 (respectively 68.0% ± 13.0% and 80.0% ± 14.3% of bats shedding CoVs in the cave
198 and in the building) (**Supplementary material 1**). None of the samples tested positive
199 between June and October, in the building. In this later colony, the December shedding
200 pulse was not reported in 2019-2020 as well (**Figure 1B**).

201 Paramyxoviruses (PMVs) were detected in both colonies and for all seasons
202 (**Supplementary material 1, Figure 1C**). In total, 224 samples (6.5% ± 0.8%) tested
203 positive. A significant variation in PMV RNA detection was found between sampling
204 dates ($\chi^2 = 97.69$, $P < 0.001$) but not between seasons ($\chi^2 = 6e-04$, $P = 0.98$). Also, a
205 significant difference was found between colonies ($\chi^2 = 5.10$, $P < 0.05$), with 5.4% ±
206 1.0% of bats shedding PMVs in the cave and 8.3% ± 1.5% in the building. As for CoVs,
207 major variations were detected in the proportion of PMV positive samples within each
208 season (**Figure 1C**). In the cave, a high prevalence was found between November to
209 mid-December (e.g. up to 22.0% ± 11.5% in 2016-2017), followed by a decrease
210 throughout the course of the season (i.e. until April-May). In the building, several
211 shedding pulses were observed between May-June and September-October (e.g. up
212 to 33.3% ± 16.9% in June in 2028-2019 (**Figure 1C**).

213

214 **Co-infections**

215 In total, 37 of the 3422 samples tested positive for more than one virus (1.1% ± 0.4%;
216 **Figure 2**). Co-infections with CoVs and PMVs (0.7% ± 0.3%) were more common than
217 co-infections with AstVs and PMVs (0.1% ± 0.1%) or AstVs and CoVs (0.3% ± 0.2%)

218 ($\chi^2 = 22.19$, $df = 2$, $P < 0.001$). Overall, the proportion of co-infections was not different
219 between seasons ($\chi^2 = 4.66$, $df = 3$, $P = 0.20$) nor between colonies ($\chi^2 = 0.41$, $df = 1$,
220 $P = 0.52$). There was no interaction between viruses ($\chi^2 = 1.55$, $P = 0.67$; $\chi^2 = 0.78$, P
221 $= 0.85$; $\chi^2 = 2.04$, $P = 0.56$) indicating that the presence of one virus was not determined
222 by the presence of another virus. Finally, none of the samples tested positive for a triple
223 infection AstV, CoV and PMV (**Figure 2**).

224

225 **DISCUSSION**

226 Based on the molecular detection of AstVs, CoVs and PMVs, we accurately assessed
227 temporal variations in virus shedding dynamics in two RFTB colonies. In spite of
228 differences in their locations (natural cave vs power transformer located in town) and
229 population size (up to 50,000 vs 1,200 flying bats), a similar shedding patterns was
230 observed between colonies for CoVs and, at a lesser extent, for PMVs. Temporal
231 variation was likely associated to the high synchrony of reproductive cycles and
232 parturition of the studied bat species, although differences between viral families could
233 be driven by different set of factors, associated to the host, virus, or environment.
234 Finally, we detected a low proportion of co-infected bats, with CoVs and PMVs co-
235 infections more commonly detected than AstVs and CoVs, or AstVs and PMVs.

236 A major shedding pulse was observed almost each year, in February, for CoVs. This
237 pattern was highly repeatable between years, but also synchronized between colonies,
238 suggesting that the colony type had no influence on the virus transmission dynamics.
239 Population size may therefore not affect CoVs transmission in RFTB, but rather,
240 population age structure could be the main driver of epidemiological cycles, as
241 previously suggested [18]. This major shedding pulse could indeed be associated to

242 the waning of maternal antibodies in juvenile bats, although the duration of maternal
243 antibodies of bat CoVs is yet to be assessed. Interestingly, in 2019-2020, this major
244 shedding pulse was slightly delayed, in March, in both colonies. This may reflect a late
245 arrival of pregnant females, resulting in delayed births and waning of maternal
246 antibodies in juvenile bats. It may also be explained by the introduction of naive juvenile
247 bats arriving from other colonies, prospecting these sites as new potential roosts.
248 Shedding pulses were also detected earlier in the season, at the time of parturition,
249 likely corresponding to CoV infection in pregnant females [18]. This pulse was also
250 repeatable between years and synchronized between colonies, although not detected
251 in the building in 2019-2020. This might also reflect a late arrival of pregnant females
252 in the colony, corroborating the slightly delayed shedding pulse detected in juvenile
253 bats, later in the season.

254 Repeated shedding pulses were also detected for PMVs, although less pronounced
255 than for CoVs. Synchronized increases were observed between colonies, at the
256 beginning of the birthing season (November) and could be associated to the arrival of
257 pregnant females [4], as for CoVs. Although more inconsistently, PMVs were also
258 detected after parturition, between January and May. These increases were minor as
259 compared to CoVs, but may also be associated to the waning of maternal antibodies
260 in juvenile bats [4].

261 In addition to the variations in the prevalence of bats shedding PMVs and CoVs, we
262 also highlighted a major difference after the birthing season, between June and
263 October. Indeed, PMVs were detected in the building, every year, but not CoVs, raising
264 questions about the maintenance of viral transmission in bat populations for each of
265 these viruses. Two different mechanisms may indeed be involved; (i) a maintenance
266 and transmission of PMVs in roosting habitats mostly composed by juvenile bats and

267 (ii) an environmental persistence of CoV viral particles, leading to yearly exposure of
268 susceptible individuals at the beginning of the birthing season. These hypotheses
269 could be tested by developing further field studies focusing on bat population structure
270 as well as on experimental studies assessing the role of abiotic factors in virus
271 maintenance outside the host.

272 For AstVs, despite changes in the prevalence of bats shedding viruses, no clear pattern
273 associated to variation in the population age structure, nor colony type, was evidenced.
274 These results contrast with a previous longitudinal study conducted in Germany, in a
275 Mouse-eared bat (*Myotis myotis*) maternity colony, reporting AstV shedding pulses
276 early in the birthing season (i.e. when bats gather in the colony) [3]. These differences
277 could be related to variations in host susceptibility, but also be associated to
278 environmental conditions influencing the persistence of non-enveloped viral particles,
279 such as AstVs. Colony type (size, air flow, humidity, temperature, etc.) could affect
280 environmental persistence and transmission opportunities for these viruses, in
281 particular between tropical and temperate regions. A larger set of bat colonies could
282 be investigated, with measurements of environmental variables (e.g. temperature,
283 humidity, etc.) to assess the role of these factors in AstV transmission.

284 Co-infections involving CoVs and PMVs were mostly detected, and may be explained
285 by the higher proportions of bats shedding these two viruses, as compared to AstVs.
286 We did not report any interaction among viruses. In Borneo, a study conducted in eight
287 tropical species reported co-infections and interactions between AstVs and CoVs in
288 Fawn Leaf-nosed bats (*Hipposideros cervinus*). Here, we only focused on the co-
289 circulation of three viral families. Bats are natural hosts of a large diversity of infectious
290 agents [30,31]. The RFTB has for example been found to host *Leptospira* sp. bacteria
291 which seem to interact positively with PMVs [4]. Experimental approaches without a

292 priori (*i.e.* next generation sequencing, metagenomics) may provide the opportunity to
293 better characterize the range of infectious agents that may be involved in co-infections
294 [11,12], and their consequences on transmission dynamics.

295 In this study, we found a strong link between the seasonality of parturition and virus
296 infection dynamics in a tropical bat population. We show different shedding patterns
297 between viral families, and predictable infection patterns among years for CoVs, in
298 particular. Our findings also underline the need to consider the drivers involved in virus
299 transmission dynamics in bats, beyond host-related factors, by focusing on the
300 interactions with the environment and other infectious agents. Such a global
301 assessment is needed to explore spill over risk associated to major shedding pulses
302 in bat populations [7,12].

303

304 **ACKNOWLEDGMENTS**

305 We thank Thomas Juhasz, Gaëlle Lefèvre, Maëlle Teyssere and Céline Toty for their
306 assistance in the field or in the laboratory.

307

308 **FUNDINGS**

309 This study was funded by the VIROPTERE program (INTERREG V Océan Indien).
310 Axel Hoarau and Léa Joffrin were supported by a “Contrat Doctoral de l’Université de
311 La Réunion” and a “Allocation Régionale de Recherche de la Région Réunion” PhD
312 fellowship, respectively. Camille Lebarbenchon was supported by a “Chaire Mixte
313 Institut national de la santé et de la recherche médicale / Université de La Réunion”.

314

315 **ETHICAL STATEMENT**

316 This study is based on environmental sampling only, and therefore not subjected to
317 approval by an ethic committee.

318

319 **DATA ACCESIBILITY**

320 Data are available in the supplementary material.

321

322 **AUTHORS' CONTRIBUTION**

323 AOGH, CL and PM conceived the study. AOGH, CL, GLM, LJ, MD and RVR collected
324 biological material in the field. AOGH, CL, LJ, MK and RVR performed the molecular
325 analyses. AOGH, CL and MD analysed the data and drafted the manuscript. All authors
326 edited, read and approved the final version of the manuscript.

327

328 **COMPETING INTERESTS**

329 The authors have no competing interests.

330

331 **REFERENCES**

- 332 1. Altizer S, Dobson A, Hosseini P, Hudson P, Pascual M, Rohani P. 2006 Seasonality and
333 the dynamics of infectious diseases. *Ecology Letters* **9**, 467–484.
- 334 2. Plowright RK, Field HE, Smith C, Divljan A, Palmer C, Tabor G, Daszak P, Foley JE. 2008
335 Reproduction and nutritional stress are risk factors for Hendra virus infection in little red
336 flying foxes (*Pteropus scapulatus*). *Proc. R. Soc. B.* **275**, 861–869.
- 337 3. Drexler JF, Corman VM, Wegner T, Tateno AF, Zerbinati RM, Gloza-Rausch F, Seebens A,

- 338 Müller MA, Drosten C. 2011 Amplification of emerging viruses in a bat colony. *Emerging*
339 *Infectious Diseases* **17**, 449–456.
- 340 4. Dietrich M, Wilkinson DA, Benlali A, Lagadec E, Ramasindrazana B, Dellagi K, Tortosa P.
341 2015 *Leptospira* and paramyxovirus infection dynamics in a bat maternity enlightens
342 pathogen maintenance in wildlife: Dual infection dynamics in a bat maternity.
343 *Environmental Microbiology* **17**, 4280–4289.
- 344 5. Anthony SJ *et al.* 2013 A strategy to estimate unknown viral diversity in mammals. *mBio* **4**.
- 345 6. Kaufman E. 2020 Two (or more) viruses in one bat: A systematic quantitative literature
346 review of viral coinfection in bats. *Independent Study Project (ISP)*, 3345.
- 347 7. Amman BR *et al.* 2012 Seasonal pulses of Marburg virus circulation in juvenile *Rousettus*
348 *aegyptiacus* bats coincide with periods of increased risk of human infection. *PLoS*
349 *Pathogens* **8**, e1002877.
- 350 8. Davy CM *et al.* 2018 White-nose syndrome is associated with increased replication of a
351 naturally persisting coronaviruses in bats. *Scientific Reports* **8**.
- 352 9. Seltmann A, Corman VM, Rasche A, Drosten C, Czirják GÁ, Bernard H, Struebig MJ, Voigt
353 CC. 2017 Seasonal fluctuations of astrovirus, but not coronavirus shedding in bats
354 inhabiting human-modified tropical forests. *EcoHealth* **14**, 272–284.
- 355 10. Cox FEG. 2001 Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology*
356 **122**, S23–S38.
- 357 11. Vaumourin E, Vourc'h G, Gasqui P, Vayssier-Taussat M. 2015 The importance of
358 multiparasitism: Examining the consequences of co-infections for human and animal
359 health. *Parasites & Vectors* **8**.

- 360 12. Hoarau AOG, Mavingui P, Lebarbenchon C. 2020 Coinfections in wildlife: Focus on a
361 neglected aspect of infectious disease epidemiology. *PLOS Pathogens* **16**, e1008790.
- 362 13. Petney TN, Andrews RH. 1998 Multiparasite communities in animals and humans:
363 Frequency, structure and pathogenic significance. *International Journal for Parasitology*
364 **28**, 377–393.
- 365 14. Peel AJ *et al.* 2019 Synchronous shedding of multiple bat paramyxoviruses coincides with
366 peak periods of Hendra virus spillover. *Emerging Microbes & Infections* **8**, 1314–1323.
- 367 15. Mortlock M, Geldenhuys M, Dietrich M, Epstein JH, Weyer J, Pawęska JT, Markotter W.
368 2021 Seasonal shedding patterns of diverse henipavirus-related paramyxoviruses in
369 Egyptian rousette bats. *Sci Rep* **11**, 24262.
- 370 16. Joffrin L, Hoarau AOG, Lagadec E, Köster M, Ramanantsalama RV, Mavingui P,
371 Lebarbenchon C. 2021 Astrovirus in Reunion free-tailed bat (*Mormopterus*
372 *francoismoutoui*). *Viruses* **13**, 1524.
- 373 17. Joffrin L *et al.* 2020 Bat coronavirus phylogeography in the Western Indian Ocean.
374 *Scientific Reports* **10**.
- 375 18. Joffrin L, Hoarau AOG, Lagadec E, Torrontegi O, Le Minter G, Dietrich M, Mavingui P,
376 Lebarbenchon C. 2022 Seasonality of coronavirus shedding in tropical bats. *R. Soc. open*
377 *sci.* **9**, 211600.
- 378 19. Lebarbenchon C *et al.* 2017 Astroviruses in bats, Madagascar. *Emerging Microbes &*
379 *Infections* **6**, e58.
- 380 20. Chu DKW, Poon LLM, Guan Y, Peiris JSM. 2008 Novel astroviruses in insectivorous bats.
381 *Journal of Virology* **82**, 9107–9114.

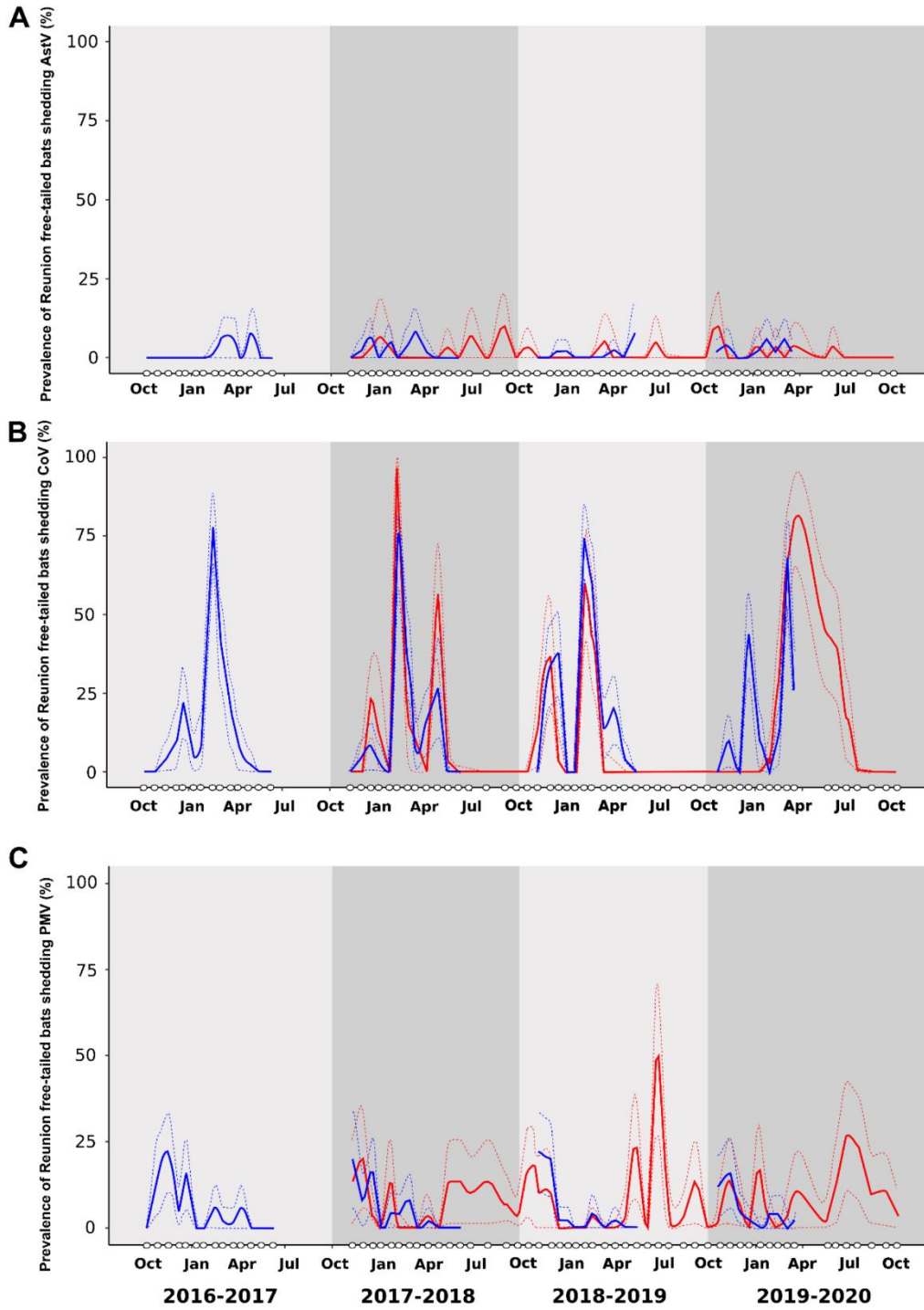
- 382 21. Hoarau F *et al.* 2018 Bat astrovirus in Mozambique. *Virology Journal* **15**.
- 383 22. Muradrasoli S, Mohamed N, Hornyák Á, Fohlman J, Olsen B, Belák S, Blomberg J. 2009
384 Broadly targeted multiprobe QPCR for detection of coronaviruses: Coronavirus is common
385 among mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Journal of Virological Methods* **159**, 277–287.
- 386 23. Tong S, Chern S-WW, Li Y, Pallansch MA, Anderson LJ. 2008 Sensitive and broadly
387 reactive reverse transcription-PCR assays to detect novel paramyxoviruses. *Journal of*
388 *Clinical Microbiology* **46**, 2652–2658.
- 389 24. Wilkinson DA *et al.* 2012 Identification of novel paramyxoviruses in insectivorous bats of
390 the Southwest Indian Ocean. *Virus Research* **170**, 159–163.
- 391 25. Mélade J, Wieseke N, Ramasindrazana B, Flores O, Lagadec E, Gomard Y, Goodman SM,
392 Dellagi K, Pascalis H. 2016 An eco-epidemiological study of *Morbilli*-related paramyxovirus
393 infection in Madagascar bats reveals host-switching as the dominant macro-evolutionary
394 mechanism. *Scientific Reports* **6**.
- 395 26. Héré L. 2009 Contribution à l'étude des chiroptères de l'île de La Réunion. Répartition et
396 habitats prioritaires en matière de conservation. University of La Réunion, Internship
397 report, 57.
- 398 27. R Core Team. 2015 R: A language and environment for statistical computing.
- 399 28. Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. 2015 Fitting linear mixed-effects models using
400 lme4. *Journal of Statistical Software* **67**.
- 401 29. Mendenhall IH, Skiles MM, Neves ES, Borthwick SA, Low DHW, Liang B, Lee BPY-H, Su
402 YCF, Smith GJD. 2017 Influence of age and body condition on astrovirus infection of bats
403 in Singapore: An evolutionary and epidemiological analysis. *One Health* **4**, 27–33.

404 30. Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T. 2006 Bats: Important reservoir
405 hosts of emerging viruses. *Clinical Microbiology Reviews* **19**, 531–545.

406 31. Han H-J, Wen H, Zhou C-M, Chen F-F, Luo L-M, Liu J, Yu X-J. 2015 Bats as reservoirs of
407 severe emerging infectious diseases. *Virus Research* **205**, 1–6.

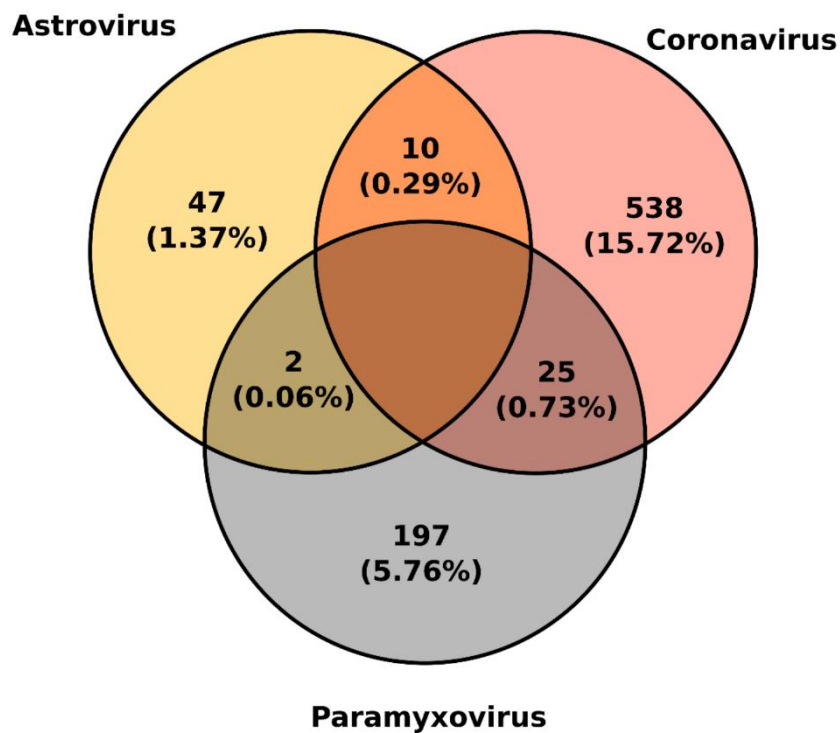
408

409 LIST OF FIGURES



410

411 **Figure 1.** Prevalence of Reunion free-tailed bat (*Mormopterus francoismoutoui*)
 412 shedding astrovirus (AstV; A), coronavirus (CoV; B) and paramyxovirus (PMV; C), over
 413 four consecutive seasons (October 2016 to October 2020). White dots on X axis
 414 indicate sampling dates. Continuous lines represent the proportion of positive samples,
 415 and dashed lines the 95% confidence interval. Blue: cave (occupied by bats from
 416 October to May); red: building (occupied all year long).



417

418 **Figure 2.** Co-infections between astroviruses, coronaviruses and paramyxoviruses in
 419 Reunion free-tailed bat (*Mormopterus francoismoutoui*). The number and proportion of
 420 positive samples is indicated for each virus.

421 **SUPPLEMENTARY MATERIAL**

422 **Supplementary material 1.** Number of tested (N_{tested}) and positive samples (N_{positive}) (AstV, PMV and CoV) for each sampling session,
 423 in the bat cave and building. The * indicate the dates for which the sampling collection couldn't be done during the same day in both
 424 colonies.

| | Date of collection | Ntested | | | Npositive | | | | | |
|------------------|-----------------------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| | | Cave | Building | All sites | Cave | | | Building | | |
| | | | | | AstV | CoV | PmV | AstV | CoV | PmV |
| 2016-2017 | 6-Oct-16 | 12 | N/A | 12 | 0 | 0 | 0 | N/A | N/A | N/A |
| | 27-Oct-16 | 39 | N/A | 39 | 0 | 0 | 6 | N/A | N/A | N/A |
| | 17-Nov-16 | 50 | N/A | 50 | 0 | 2 | 11 | N/A | N/A | N/A |
| | 8-Dec-16 | 40 | N/A | 40 | 0 | 4 | 2 | N/A | N/A | N/A |
| | 20-Dec-16 | 50 | N/A | 50 | 0 | 11 | 8 | N/A | N/A | N/A |
| | 10-Jan-17 | 40 | N/A | 40 | 0 | 2 | 0 | N/A | N/A | N/A |
| | 24-Jan-17 | 50 | N/A | 50 | 0 | 5 | 0 | N/A | N/A | N/A |
| | 16-Feb-17 | 50 | N/A | 50 | 1 | 39 | 3 | N/A | N/A | N/A |
| | 2-Mar-17 | 49 | N/A | 49 | 3 | 20 | 1 | N/A | N/A | N/A |
| | 23-Mar-17 | 50 | N/A | 50 | 3 | 9 | 1 | N/A | N/A | N/A |
| | 6-Apr-17 | 50 | N/A | 50 | 0 | 4 | 3 | N/A | N/A | N/A |
| | 26-Apr-17 | 40 | N/A | 40 | 3 | 1 | 0 | N/A | N/A | N/A |
| | 16-May-17 | 35 | N/A | 35 | 0 | 0 | 0 | N/A | N/A | N/A |
| | 8-Jun-17 | 25 | N/A | 25 | 0 | 0 | 0 | N/A | N/A | N/A |
| Total | 14 sampling sessions | 580 | N/A | 580 | 10 | 97 | 35 | N/A | N/A | N/A |
| 2017-2018 | 9-Nov-17 | 30 | 30 | 60 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 4 |
| | 30-Nov-17 | 50 | 30 | 80 | 1 | 2 | 4 | 0 | 0 | 6 |
| | 19-Dec-17 | 50 | 30 | 80 | 3 | 4 | 8 | 1 | 7 | 1 |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|-----------------------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | *2-Jan-18 | N/A | 15 | 49 | N/A | N/A | N/A | 1 | 2 | 0 |
| | *3-Jan-18 | 34 | N/A | | 0 | 1 | 0 | N/A | N/A | N/A |
| | 24-Jan-18 | 45 | 30 | 75 | 2 | 0 | 2 | 1 | 0 | 4 |
| | 7-Feb-18 | 50 | 30 | 80 | 0 | 36 | 2 | 0 | 29 | 0 |
| | 28-Feb-18 | 50 | 20 | 70 | 2 | 18 | 4 | 0 | 3 | 0 |
| | 14-Mar-18 | 50 | 10 | 60 | 4 | 4 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | 5-Apr-18 | 50 | 30 | 80 | 1 | 8 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | 26-Apr-18 | 30 | 30 | 60 | 0 | 8 | 0 | 0 | 17 | 0 |
| | 17-May-18 | 30 | 30 | 60 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 4 |
| | 6-Jun-18 | 30 | 30 | 60 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| | 26-Jun-18 | N/A | 30 | 30 | N/A | N/A | N/A | 2 | 0 | 3 |
| | 30-Jul-18 | N/A | 30 | 30 | N/A | N/A | N/A | 0 | 0 | 4 |
| | 4-Sep-18 | N/A | 30 | 30 | N/A | N/A | N/A | 3 | 0 | 2 |
| | 26-Sep-18 | N/A | 30 | 30 | N/A | N/A | N/A | 0 | 0 | 1 |
| | 17-Oct-18 | N/A | 30 | 30 | N/A | N/A | N/A | 1 | 0 | 5 |
| Total | 17 sampling sessions | 499 | 465 | 964 | 13 | 81 | 27 | 10 | 60 | 39 |
| 2018-2019 | 6-Nov-18 | 50 | 30 | 80 | 0 | 0 | 11 | 0 | 4 | 3 |
| | *30-Nov-18 | 50 | N/A | 80 | 0 | 17 | 10 | N/A | N/A | N/A |
| | *1-Dec-18 | N/A | 30 | | N/A | N/A | N/A | 0 | 11 | 3 |
| | 17-Dec-18 | 50 | 30 | 80 | 1 | 19 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| | 2-Jan-19 | 50 | 30 | 80 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | 17-Jan-19 | 50 | 30 | 80 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | *4-Feb-19 | 50 | N/A | 80 | 0 | 37 | 0 | N/A | N/A | N/A |
| | *5-Feb-19 | N/A | 30 | | N/A | N/A | N/A | 0 | 18 | 0 |
| | 18-Feb-19 | 50 | 30 | 80 | 0 | 30 | 2 | 0 | 13 | 1 |
| | 14-Mar-19 | 50 | 20 | 70 | 0 | 7 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| | *2-Apr-19 | 50 | N/A | 55 | 1 | 10 | 1 | N/A | N/A | N/A |
| | *3-Apr-19 | N/A | 5 | | N/A | N/A | N/A | 0 | 0 | 0 |
| | 23-Apr-19 | 50 | 30 | 80 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | 15-May-19 | 25 | 30 | 55 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 |
| | 5-Jun-19 | N/A | 30 | 30 | N/A | N/A | N/A | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|-----------|------------|------------|-----------|------------|------------|
| | 26-Jun-19 | N/A | 20 | 20 | N/A | N/A | N/A | 1 | 0 | 10 |
| | 16-Jul-19 | N/A | 20 | 20 | N/A | N/A | N/A | 0 | 0 | 1 |
| | 14-Aug-19 | N/A | 30 | 30 | N/A | N/A | N/A | 0 | 0 | 1 |
| | 5-Sep-19 | N/A | 30 | 30 | N/A | N/A | N/A | 0 | 0 | 4 |
| | 30-Sep-19 | N/A | 30 | 30 | N/A | N/A | N/A | 0 | 0 | 0 |
| Total | 17 sampling sessions | 525 | 455 | 980 | 5 | 122 | 26 | 2 | 47 | 31 |
| 2019-2020 | *21-Oct-19 | 50 | N/A | 80 | 1 | 0 | 6 | N/A | N/A | N/A |
| | *24-Oct-19 | N/A | 30 | 80 | N/A | N/A | N/A | 3 | 0 | 1 |
| | 12-Nov-19 | 50 | 30 | 80 | 2 | 5 | 8 | 0 | 0 | 4 |
| | *2-Dec-19 | 50 | N/A | 80 | 0 | 0 | 2 | N/A | N/A | N/A |
| | *3-Dec-19 | N/A | 30 | 80 | N/A | N/A | N/A | 0 | 0 | 2 |
| | *19-Dec-19 | 50 | N/A | 57 | 0 | 22 | 1 | N/A | N/A | N/A |
| | *20-Dec-19 | N/A | 7 | 57 | N/A | N/A | N/A | 0 | 0 | 0 |
| | 10-Jan-20 | 40 | 30 | 70 | 1 | 4 | 0 | 1 | 0 | 5 |
| | *27-Jan-20 | N/A | 30 | 80 | N/A | N/A | N/A | 0 | 1 | 1 |
| | *28-Jan-20 | 50 | N/A | 80 | 3 | 0 | 2 | N/A | N/A | N/A |
| | 13-Feb-20 | 50 | 30 | 80 | 1 | 5 | 2 | 1 | 8 | 0 |
| | *2-Mar-20 | N/A | 30 | 80 | N/A | N/A | N/A | 0 | 20 | 1 |
| | *3-Mar-20 | 50 | N/A | 80 | 3 | 34 | 0 | N/A | N/A | N/A |
| | 16-Mar-20 | 50 | 30 | 80 | 1 | 13 | 1 | 1 | 24 | 3 |
| | 20-May-20 | N/A | 31 | 31 | N/A | N/A | N/A | 0 | 13 | 1 |
| | 4-Jun-20 | N/A | 30 | 30 | N/A | N/A | N/A | 1 | 12 | 4 |
| | 25-Jun-20 | N/A | 30 | 30 | N/A | N/A | N/A | 0 | 5 | 8 |
| | 16-Jul-20 | N/A | 30 | 30 | N/A | N/A | N/A | 0 | 0 | 7 |
| | 13-Aug-20 | N/A | 30 | 30 | N/A | N/A | N/A | 0 | 0 | 3 |
| | 10-Sep-20 | N/A | 30 | 30 | N/A | N/A | N/A | 0 | 0 | 3 |
| | 1-Oct-20 | N/A | 30 | 30 | N/A | N/A | N/A | 0 | 0 | 1 |
| Total | 16 sampling sessions | 440 | 458 | 898 | 12 | 83 | 22 | 7 | 83 | 44 |
| Total | 64 sampling sessions | 2044 | 1378 | 3422 | 40 | 383 | 110 | 19 | 190 | 114 |

426 **Supplementary material 2.** Generalized linear mixed models summaries. AstV: astrovirus; CoV: coronavirus; PMV: paramyxovirus.

| Response variable | Fixed effect | Random effect | Complete model | Selected model |
|-------------------|-------------------|---------------|--------------------------------|-----------------------|
| AstV | Colony | (Season/Date) | AstV~Location+(1 Season/Date) | AstV~1+(1 Date) |
| CoV | Colony | (Season/Date) | CoV~Location+(1 Season/Date) | CoV~1+(1 Date) |
| PMV | Colony | (Season/Date) | PMV~Location+(1 Season/Date) | PMV~Location+(1 Date) |
| AstV | CoV+PMV+CoV:PMV | (Date) | AstV~CoV+PMV+CoV:PMV+(1 Date) | AstV~1+(1 Date) |
| CoV | AstV+PMV+AstV:PMV | (Date) | CoV~AstV+PMV+AstV:PMV+(1 Date) | CoV~1+(1 Date) |
| PMV | AstV+CoV+AstV:CoV | (Date) | PMV~AstV+CoV+AstV:CoV+(1 Date) | PMV~1+(1 Date) |

427

IV. Chapitre III

Modélisation de la dynamique d'infection aux coronavirus dans une colonie de Petit Molosse de La Réunion

IV.1. La modélisation en épidémiologie

Au cours des 50 dernières années, l'étude des maladies infectieuses a donné naissance à un domaine de recherche interdisciplinaire regroupant à la fois les mathématiques, l'épidémiologie, l'écologie, la biologie évolutive, l'immunologie, la sociologie ou encore la santé publique (Heesterbeek *et al.* 2015). L'étude des maladies infectieuses peut être scindée en trois grandes catégories : la recherche en laboratoire, la recherche sur le terrain, et enfin, la modélisation (Jeong *et al.* 2017). Les études au laboratoire et sur le terrain sont souvent confrontées à la complexité des systèmes, pouvant rendre difficile l'interprétation de certains résultats, voire l'appréhension de certains facteurs essentiels dans l'étude des dynamiques infectieuses. La modélisation se veut être un outil complémentaire permettant de s'affranchir de ces barrières. Ces dernières années, le nombre de publications utilisant des modèles mathématiques et publiées dans des revues scientifiques internationales a augmenté de manière significative (Figure 24). Elles ont joué un rôle majeur dans l'évaluation des risques et l'élaboration de réponses face aux pathogènes émergents (*e.g.* Metcalf et Lessler 2017), tel que nous le vivons actuellement avec la pandémie de COVID-19.

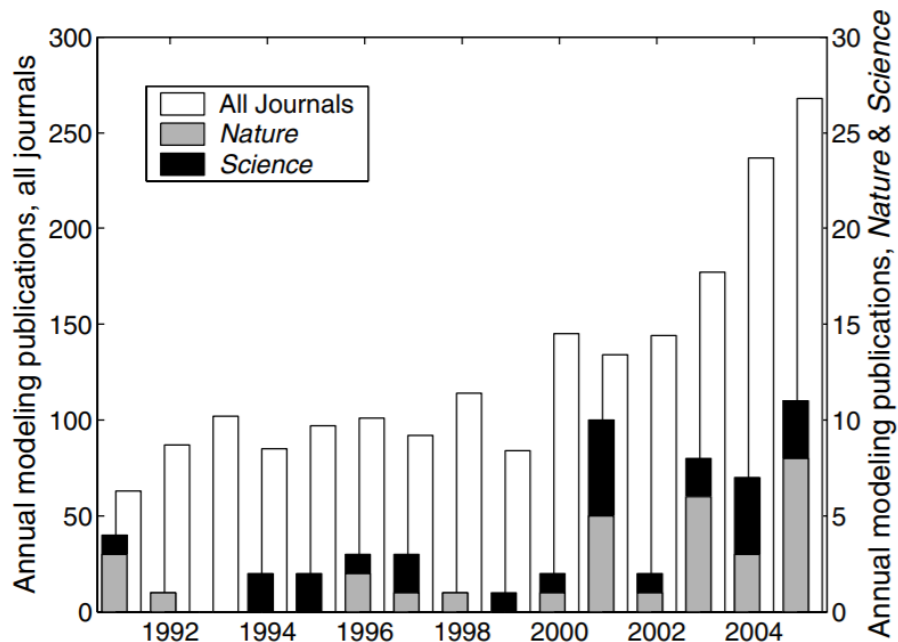


Figure 24. Évolution de l'utilisation des modèles mathématiques dans la littérature en épidémiologie (1991-2004) (Keeling et Rohani 2011).

IV.1.1. Rôles de la modélisation

Au travers du langage mathématique, la modélisation permet d'explorer des systèmes complexes en les simplifiant, pour en révéler les mécanismes (Jeong *et al.* 2017). Notamment, elle peut avoir deux grands rôles : la compréhension et la prédiction. Elle permet d'extrapoler à partir soit d'un jeu de données connu soit des mécanismes sur différentes échelles (e.g. individu, population, métapopulation) (Keeling et Rohani 2011). Par exemple, les modèles permettent de prédire les dynamiques infectieuses à l'échelle de populations à partir de données obtenues au niveau individuel. Ils permettent aussi de faire des prédictions à long terme à partir d'observations précoces, ou de simuler l'impact de la vaccination sur la propagation d'un agent infectieux donné (Keeling et Rohani 2011). Par ailleurs, les modèles permettent (i) d'élucider les propriétés des agents infectieux émergents (Fraser *et al.* 2009 ; Cauchemez *et al.* 2014 ; Metcalf et Lessler 2017), (ii) de mettre en exergue les principes généraux des émergences (Fraser *et al.* 2009 ; Metcalf et Lessler 2017), ou encore (iii) de comparer les mécanismes potentiels de propagation et de persistance (Cauchemez *et al.* 2016 ; Metcalf et Lessler 2017). La construction et les propriétés des modèles varient selon la finalité de l'étude. Les modèles prédictifs sont les plus communs. Ces derniers doivent intégrer la complexité des systèmes et se doivent d'être le plus précis possible (Keeling et Rohani 2011). Ainsi, ils font état des hétérogénéités au niveau des populations, et sont construits à partir de paramètres connus. Ils peuvent jouer un rôle important dans les stratégies de contrôle (Keeling et Rohani 2011). Ce type de modèle a par exemple été utilisé durant une épidémie de fièvre aphteuse, causée par des picornavirus, au Royaume-Uni en 2001. Ils ont permis de prédire l'impact positif de l'abattage ciblé des animaux, sur la réduction des pertes globales de bétail, et sur la résorption de l'épidémie (Keeling *et al.* 2001 ; Keeling et Rohani 2011). Les modèles destinés à comprendre la propagation des agents infectieux se focalisent eux sur l'impact de la modification de certains paramètres clés sur les dynamiques infectieuses. Leur construction se doit d'être simple pour faciliter les analyses. Dans ce type de modèles, il est possible d'isoler un à un les facteurs, de les faire varier, et d'enregistrer les réponses liées à ces variations (Keeling et Rohani 2011). Ils permettent ainsi d'identifier des facteurs clés ou à négliger dans certains scénarios épidémiologiques, et peuvent être à la base de modèles plus complexes et prédictifs. Ces modèles sont par exemple utiles pour examiner les effets d'un nombre variable de partenaires sur la propagation d'une maladie sexuellement transmissible

(Keeling et Rohani 2011). Malgré les nombreux avantages que peut offrir la modélisation, il est cependant important de souligner que tous les modèles présentent des limites. En théorie, il est impossible de construire un modèle parfait. Des paramètres inconnus qui ne peuvent être intégrés dans les équations sont toujours présents. Toutefois, en prenant en compte les questions auxquelles doit répondre le modèle, ainsi que la balance entre l'exactitude, la transparence et la flexibilité, la modélisation peut se révéler être un outil pertinent.

IV.1.2. Modèles en compartiments : principe de fonctionnement

Les modèles en compartiments sont adaptés pour élucider les mécanismes sous-jacents aux transmissions. Ils peuvent être appliqués à des données de terrain recueillies lors d'études longitudinales, et permettent de tester de nombreuses hypothèses (Keeling et Rohani 2011). Dans ce type de modèles, les individus constituant une population fictive sont répartis dans différents compartiments homogènes qui reflètent les statuts possibles de ces individus par rapport à une maladie donnée. Par exemple, on peut considérer un compartiment comportant des individus « *Sensibles* » (abrégé en « *S* ») à l'agent infectieux, c'est-à-dire que ces individus ne l'ont jamais rencontré et n'ont pas de protection contre l'infection (e.g. immunité acquise). Il est possible également de générer un compartiment comportant des individus « *Infectieux* » (abrégé en « *I* »), ou encore un autre comprenant des individus « *Rétablis* » de l'infection (abrégé en « *R* »). Couramment, en fonction de la biologie de l'agent infectieux considéré, il est envisageable d'intégrer un nombre variable de compartiments (e.g. « *Exposés* », « *Vaccinés* », « *Immunisés* ») qui déterminera la structure du modèle. Des paramètres épidémiologiques permettent de quantifier la proportion d'individus passant d'un compartiment à un autre : ces paramètres régissent les mouvements ou flux d'individus d'une catégorie immunologique à une autre, et sont dépendant de la biologie de l'agent infectieux. Par exemple, avec les compartiments « *S* », « *I* » et « *R* » décrits plus-haut, on pourrait établir un modèle en compartiment dans lequel deux paramètres épidémiologiques relient les trois compartiments : la contamination et la guérison (Figure 25). Ce modèle est adapté aux agents infectieux pour lesquels il n'y a pas de période d'incubation, et pour lesquels le développement d'une immunité spécifique empêche toute réinfection (Figure 25). En revanche, avec les mêmes compartiments, on pourrait également établir un modèle SIRS. Au sein de ce modèle, les individus présents dans le

compartiment « *Rétablis* », peuvent à nouveau intégrer le compartiment « *Sensibles* » suite à la perte de l'immunité acquise consécutive à l'exposition à l'agent infectieux (Figure 26).



Figure 25. Diagramme de flux d'un modèle SIR. S = sensibles, I = infectieux, R = rétablis.



Figure 26. Diagramme de flux d'un modèle SIRS. S= sensibles, I= infectieux, R= rétablis. Les individus rétablis peuvent redevenir sensibles suite à une perte d'immunité spécifique.

Les modèles en compartiments permettent d'estimer le nombre d'individus présents dans chaque compartiment à un instant donné et de suivre les dynamiques infectieuses. Pour cela, chaque compartiment est codé par une équation différentielle prenant en compte les individus entrants et les individus sortants en fonction du temps. Ces équations sont régies par des paramètres clés, décrivant l'épidémiologie de l'agent infectieux, ou encore la biologie de l'hôte considéré (Keeling et Rohani 2011). Ces paramètres peuvent être mesurés sur le terrain ou en laboratoire, ou peuvent être estimés par des méthodes statistiques. Les équations peuvent, par exemple, intégrer le rythme auquel les individus sensibles à un agent infectieux s'infectent (*i.e.* taux de transmission) ou encore, intégrer les paramètres démographiques de la population, tels que les pics de naissances (qui implémentent la population de nouveaux individus sensibles), ou encore la mortalité naturelle (*e.g.* Peel *et al.* 2014). La finalité du modèle ainsi que les questions scientifiques sous-jacentes sont importantes pour déterminer le niveau de détails et les paramètres à intégrer.

IV.2. Modélisation des dynamiques infectieuses chez les chauves-souris

IV.2.1. Généralités

La modélisation en épidémiologie a principalement été employée dans le cadre de l'étude des maladies infectieuses humaines. Depuis quelques années elle s'est transposée à l'étude des infections chez les animaux domestiques et sauvages. Les chauves-souris, réservoirs d'agents infectieux pouvant être responsables de maladies émergentes et hautement pathogènes chez l'Homme, font l'objet d'une grande attention (Calisher *et al.* 2006). La diversité des agents infectieux circulant chez ces mammifères est de mieux en mieux décrite. De même, de plus en plus d'études se penchent sur la compréhension des mécanismes régissant les dynamiques de transmission et d'infection au sein des communautés de chauves-souris (Olival et Hayman 2014 ; Plowright *et al.* 2016 ; Schountz *et al.* 2017). Néanmoins, les études de terrain présentent des limites liées à la complexité des systèmes naturels, et ces mécanismes restent mal caractérisés. Ainsi, l'emploi de modèles mécanistes en complément des investigations menées sur le terrain est de plus en plus fréquent afin d'explorer les dynamiques infectieuses chez les chauves-souris avec précision (Lloyd-Smith *et al.* 2009 ; Lessler et Cummings 2016).

IV.2.2. Modèles mécanistes chez les chauves-souris

Les études portant sur la modélisation épidémiologique chez les chauves-souris se sont principalement focalisées sur des virus d'intérêt médical (Gentles *et al.* 2020). Dans une synthèse parue en 2020, Gentles et ses collaborateurs font état de près de 25 publications, parues entre 2007 et 2020, et utilisant des modèles mécanistes pour l'étude des dynamiques infectieuses chez ces mammifères (Gentles *et al.* 2020). Parmi ces études, la majorité des modèles développés (92%) est originale, et utilisée pour un système unique chauves-souris – virus. Cependant, malgré la diversité des espèces de chauves-souris décrites dans le monde, seules quelques espèces ont été ciblées, principalement en milieu continental (Figure 27) (Gentles *et al.* 2020). Une grande partie des études recensées ont été conduites à l'échelle des populations, contre quelques-unes seulement à l'échelle de l'hôte (Gentles *et al.* 2020). Enfin, sur l'ensemble des études comportant de la modélisation (modèles mécanistes et autres), près de la moitié correspond à des modèles ajustés aux données de terrain (Amengual *et al.* 2007 ; Pons-Salort *et al.* 2014 ; Gentles *et al.* 2020). L'autre moitié comprend des

modèles théoriques ou des modèles comportant des paramètres estimés à partir de la littérature (Figure 27) (Gentles *et al.* 2020). En proportion, la majorité des modèles recensés (44%) traite des dynamiques de transmission des lyssavirus, viennent ensuite les modèles traitant des filovirus (28%), des paramyxovirus (20%), et enfin des coronavirus (8%) (Gentles *et al.* 2020). L'ensemble de ces modèles a apporté des éléments de compréhension importants sur les dynamiques infectieuses. Par exemple, pour les lyssavirus, et particulièrement pour le virus de la rage, trois études reposant sur des modèles théoriques à l'échelle de l'hôte ont mis en évidence que l'hétérogénéité des réponses immunitaires au niveau individuel pouvait favoriser le maintien du virus au niveau d'une population (Dimitrov *et al.* 2007 ; 2008 ; Dimitrov et King 2008 ; Gentles *et al.* 2020). Ces résultats ont été confortés par d'autres modèles investiguant les dynamiques infectieuses à l'échelle des populations (George *et al.* 2011).

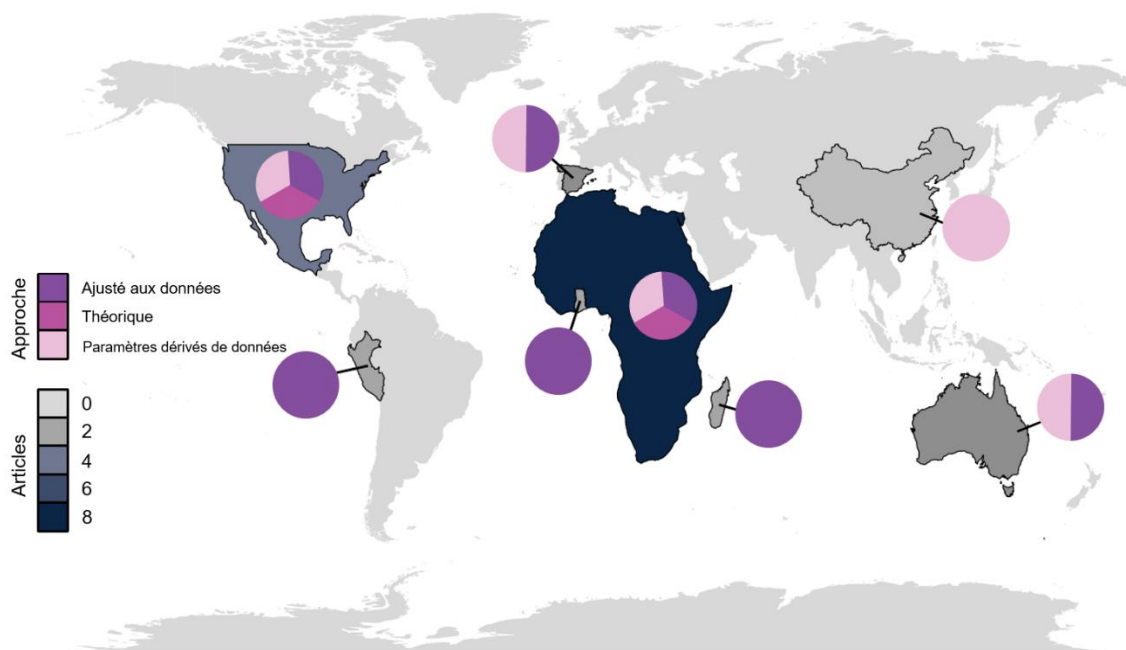


Figure 27. Distribution géographique des études de modélisation épidémiologique de virus de chauves-souris (Adapté de Gentles *et al.* 2020). Les pays ou régions dans lesquelles les études ont été menées sont mis en valeur. L'échelle de couleurs employée indique le nombre d'articles publiés. Les diagrammes indiquent le type de modèle employé (théorique, simulé à l'aide de paramètres dérivés de données, ou explicitement ajusté aux données) pour chaque zone géographique.

IV.2.3. Modèles associés aux coronavirus de chauves-souris

Sur les 25 études mécanistes recensées par Gentles et collaborateurs, seules deux études se sont penchées sur les coronavirus associés aux chauves-souris. La

première étude a comparé plusieurs modèles en compartiments construits à partir de données de terrains de captures-marquages-recaptures, pour étudier la dynamique d'infection du Murin à Grandes Pattes (*Myotis macropus*) par un α -coronavirus, en Australie. Cette étude a mis en exergue que des infections transitoires et persistantes pourraient coexister au sein des populations, et permettrait d'expliquer les patrons d'infection observés sur le terrain (Jeong *et al.* 2017). La seconde étude a été publiée au début de la pandémie de COVID-19, alors que les autorités Chinoises évoquaient une potentielle émergence du SARS-CoV-2 depuis le marché de fruit de mer de Huanan. Elle visait à tester si une transmission entre chauves-souris et humains pouvait expliquer les données épidémiologiques (évolution du nombre de cas à Wuhan) (Chen *et al.* 2020). Les résultats issus des simulations et illustrant l'évolution du nombre de cas de la COVID-19 à Wuhan étaient semblables aux données, suggérant un potentiel changement d'hôte du virus, néanmoins sans conclusion définitive sur ce point. Par ailleurs, l'étude a permis d'estimer un taux de reproduction (R_0) pour le virus. Aujourd'hui, bien que la diversité des coronavirus circulant chez les chauves-souris soit de mieux en mieux décrite (Chen *et al.* 2014 ; Anthony *et al.* 2017 ; *Database of bat-associated viruses* 2021), les études de terrain et les modèles visant à comprendre la circulation de ces virus dans leurs réservoirs sauvages restent très limités (Gentles *et al.* 2020).

IV.3. Modélisation de la transmission des coronavirus chez le Petit Molosse de La Réunion

IV.3.1. Contexte

Les dynamiques d'infection par les coronavirus ont été décrites chez le Petit Molosse de La Réunion (Joffrin *et al.* 2022). La régularité des pics d'infections dans la colonie de maternité suggère un lien fort avec la saisonnalité de gestation et d'élevage des jeunes. Dans l'étude présentée ci-après, nous avons développé un modèle épidémiologique mécaniste en nous basant sur des données épidémiologiques d'excrétion virale (Joffrin *et al.* 2022) et sur la structure de la population de la colonie de maternité située dans la grotte dans la commune de Trois-Bassins (Dietrich *et al.* 2015b ; Hoarau *et al.* *En préparation*). Les objectifs étaient de (i) développer un modèle épidémiologique intégrant fidèlement les caractéristiques démographiques de la population, et (ii) de tester l'effet de l'évolution de la structure de la population (classe d'âge, présence d'individus sensibles) sur la dynamique d'infection.

IV.3.2. Résumé de l'étude (Article 4)

Nous avons établi un modèle mécaniste constitué de cinq compartiments : MSITR (« M » : « Immunité maternelle », « S » : « Sensible », « I » : « Infecté », « T » : « Excrétion transitoire des acides nucléiques du virus », et « R » : « Rétablis »), en nous appuyant sur les données épidémiologiques (Joffrin *et al.* 2022), des observations de terrain (sur la structure de la population), et les hypothèses avancées concernant la dynamique de transmission de ces CoV (e.g. présence d'une immunité maternelle). À ce modèle, nous avons appliqué un découpage en classes d'âge (nouveau-nés, juvéniles, adultes) et intégré des aspects démographiques (e.g. naissances, flux migratoires) afin de nous rapprocher au mieux de l'évolution de la structure de la colonie au cours de la saison. Nous avons défini des paramètres épidémiologiques et démographiques que nous avons pu approcher au cours de cette étude, et avons conduit des simulations à l'échelle d'une saison de gestation et d'élevage des jeunes. Nous avons pu montrer que notre modèle reproduisait la dynamique démographique de notre population. Par ailleurs, nous avons également pu recréer la dynamique de transmission des CoV, et avons pu retrouver la présence des pics infectieux aux mêmes temps que ceux mis en évidence au cours de l'étude précédemment publiée (Joffrin *et al.* 2022), et avec des amplitudes similaires. Nous avons ainsi pu illustrer l'efficacité des approches de modélisation dans le cadre de l'étude des dynamiques infectieuses, en dépit des manques de données reflétant la complexité des systèmes naturels.

IV.3.3. Article 4 : « Highly predictable coronavirus shedding pulses in a tropical bat maternity colony »

En préparation

1 **Highly predictable coronavirus shedding pulses in a tropical bat**
2 **maternity colony**

3 Axel O. G. Hoarau^{1*}, Patrick Mavingui¹, Benjamin Roche^{2,3}, and Camille Lebarbenchon¹

4 ¹ Université de La Réunion, Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, INSERM 1187,
5 CNRS 9192, IRD 249, Sainte-Clotilde, La Réunion, France.

6 ² MIVEGEC, IRD, CNRS, Université de Montpellier, Montpellier, France International Center
7 for Mathematical and Computational Modeling of Complex Systems (UMI IRD/UPMC
8 UMMISCO), Bondy, France

9 ³ Departamento de Etología, Fauna Silvestre y Animales de Laboratorio, Facultad de Medicina
10 Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de
11 México, México

12 ***Corresponding author:**

13 axel.hoarau@univ-reunion.fr

14

15 **INTRODUCTION**

16 Environmental seasonal changes such as temperature fluctuations, or variations in
17 resource availability, are known to influence many features of wildlife biology [1].
18 Modifications occurring in social behavior (e.g. aggregation of hundreds or thousands
19 of individuals), or variations in population structure (e.g. births) related to these
20 changes, are factors that can critically affect the maintenance and circulation of
21 infectious agents in populations [1–3]. However, seasonal fluctuations of infections, as
22 well as the underlying factors, remain poorly investigated in natural conditions.

23 Bats are reservoirs of many infectious agents [4–6]. Among them, a high genetic
24 diversity of coronaviruses (CoVs), has been identified worldwide [7–10]. During the
25 past 20 years, the Severe Acute Respiratory Syndrome coronaviruses 1 and 2 (SARS-
26 CoV and SARS-CoV-2) likely originated in bats [11–13], emerged in human
27 populations, emphasizing the need to decipher the epidemiology of CoVs in bat
28 populations.

29 Several studies have highlighted that the circulation of CoVs in bats is seasonal, and
30 that juveniles may be more prone to shed viruses [14–18]. In a recent work, we
31 conducted a longitudinal study in a maternity colony of an endemic species of Reunion
32 Island: the Reunion free-tailed bat (RFTB; *Mormopterus francoismoutoui*), over two
33 consecutive birthing seasons (2016-2017 and 2017-2018) [19]. We highlighted a
34 strong variation of the proportion of bats shedding coronavirus every years, and
35 emphasized repeatable patterns among years [19]. Specifically, we described the
36 presence of two CoV shedding pulses at the beginning of the birthing season and
37 within two months after parturition, each year, potentially reflecting major changes in
38 the host population structure and herd immunity [19].

39 We hypothesized that pregnant females and juveniles may be involved in the two
40 shedding pulses. However because of the non-invasive sampling approach (collection
41 of feces under the colony) we were not able to confirm our assumptions. Here, we
42 examined the effects of variations in population structure related to the seasonality of
43 reproduction on CoV infection dynamics in the RFTB with a modeling approach. We (i)
44 modeled the population dynamics and (ii) investigated its effects on coronavirus
45 transmission pattern.

46

47 MATERIAL AND METHODS

48 *Bat population*

49 We focused on the largest bat colony on Reunion Island. This colony, located in a ~
50 30 m³ natural cave on the West coast of the island, is occupied only by RFTB, from
51 October to June [19,20]. This seasonal occupation is associated to a highly
52 synchronous and repeatable birthing in this species. Between October and December,
53 the colony is mainly composed of pregnant females, with a population reaching about
54 40,000 to 50,000 flying bats before parturition. Parturition is reported in mid-December
55 and lasts for about a month. From January onwards, the colony is mainly composed of
56 newborns becoming juvenile bats approximately one month after birth. Population size
57 then decreases progressively towards the end of the season (June), until the cave
58 remains empty and until the income of new pregnant females, in October. RFTB
59 relative population size was estimated throughout the course of the birthing season
60 based on field observations (**Figure 1**; [19,20]).

61

62 *Model structure*

63 We designed a deterministic compartmental model using ordinary differential
64 equations (“ODEs”) and comprising maternally immune “*M*”, susceptible “*S*”, infectious
65 “*I*”, transitory excreting “*T*”, and recovered “*R*” classes (**Figure 2**). We implemented the
66 model with three age classes corresponding to newborns (1), juveniles (2) and adults
67 (3). All bats had the same mortality rate μ (we assumed that coronavirus infection did
68 not affect bat fitness).

69 We considered that newborns become juveniles with an ageing rate α_1 , and juveniles
70 become adults with an aging rate α_2 . Only newborns from immune mothers were

3

71 expected to integrate the “*M*” class. We assimilated the duration of this immunity as
72 the equivalent of the duration of the lactation. We considered the weaning to occur
73 when newborns become juveniles. The *Alphacoronavirus* was detected in fresh
74 droppings suggesting the transmission probably occurs via the fecal-oral route.
75 Therefore, we assumed the transmission to be density-dependent [21–23]. Susceptible
76 individuals “*S*” thus become infected “*I*” at the rate βSI . The different age classes were
77 spotted successively but not simultaneously during the season (**Figure 1**). Therefore,
78 we anticipated that viral transmission mainly occurred between individuals of the same
79 age classes, and described transmission rates associated to each of them: β_1 , β_2 , and
80 β_3 . We nevertheless described transmission among individuals of different age classes
81 with the transmission rate β_{inter} .

82 In our previous study, coronavirus RNA was detected in up to 78% of tested samples
83 [19]. Because the detection of viral RNA may not reflect the shedding level of infectious
84 particles, we assumed that not all bats were infectious during coronavirus shedding
85 pulses. Therefore, we considered that infected individuals integrate the intermediary
86 class “*T*” consisting of individuals shedding viruses below a threshold leading to
87 coronavirus transmission, at the rate θ . Finally, we considered that individuals integrate
88 the recovered class “*R*” at the recovery rate γ , and remain immune for life. We assumed
89 that recovery rate was specific to each age classes: γ_1 , γ_2 and γ_3 .

90 We tried to integrate migration flows occurring in the colony. We simulated the arrival
91 of pregnant females with a function *mig*. To this function, we applied p_S , p_I , p_T and p_R
92 in each associated compartment, corresponding to the proportion of susceptible,
93 infectious, transitory excreting, or recovered individuals, immigrating into the colony
94 (see ODEs below). Then, we simulated the emigration of adults and juveniles at the

95 end of the season respectively with the E_A and E_J functions. Finally, we simulated the
 96 birth pulse using the function b .

97 The ODEs associated to each age classes are therefore:

98 $i=1$ (Newborns):

$$99 \quad \left\{ \begin{array}{l} \frac{dM_i}{dt} = b(\text{time}) * (I_{i+2} + R_{i+2} + T_{i+2}) - \alpha_i M_i - \mu M_i \\ \frac{dS_i}{dt} = b(\text{time}) * S_{i+2} - \beta_i S_i I_i - \beta_{inter} S_i * (I_{i+1} + I_{i+2}) - S_i(\alpha_i + \mu) \\ \frac{dI_i}{dt} = \beta_i S_i I_i + \beta_{inter} S_i * (I_{i+1} + I_{i+2}) - I_i(\alpha_i + \mu + \theta) \\ \frac{dT_i}{dt} = \theta * I_i - T_i(\alpha_i + \mu + \gamma) \\ \frac{dR_i}{dt} = \gamma T_i - R_i(\alpha_i + \mu) \end{array} \right.$$

100 $i=2$ (Juveniles):

$$101 \quad \left\{ \begin{array}{l} \frac{dS_i}{dt} = \alpha_{i-1} M_{i-1} + \alpha_{i-1} S_{i-1} - \beta_i S_i I_i - \beta_{inter} S_i * (I_{i-1} + I_{i+1}) - S_i(\alpha_i + \mu) - E_J(\text{time}) * S_i \\ \frac{dI_i}{dt} = \alpha_{i-1} I_{i-1} + \beta_i S_i I_i + \beta_{inter} S_i * (I_{i-1} + I_{i+1}) - I_i(\alpha_i + \mu + \theta) - E_J(\text{time}) * I_i \\ \frac{dT_i}{dt} = \theta * I_i - T_i(\alpha_i + \mu + \gamma) - E_J(\text{time}) * T_i \\ \frac{dR_i}{dt} = \gamma T_i + \alpha_{i-1} R_{i-1} - R_i(\alpha_i + \mu) - E_J(\text{time}) * R_i \end{array} \right.$$

102 $i=3$ (Adults):

$$103 \quad \left\{ \begin{array}{l} \frac{dS_i}{dt} = mig(\text{time}) * p_s + \alpha_{i-1} S_{i-1} - \beta_i S_i I_i - \beta_{inter} S_i * (I_{i-1} + I_{i-2}) - \mu S_i - E_A(\text{time}) * S_i \\ \frac{dI_i}{dt} = mig(\text{time}) * p_l + \alpha_{i-1} I_{i-1} + \beta_i S_i I_i + \beta_{inter} S_i * (I_{i-1} + I_{i-2}) - I_i(\mu + \theta) - E_A(\text{time}) * I_i \\ \frac{dT_i}{dt} = mig(\text{time}) * p_T + \theta * I_i - T_i(\mu + \gamma) - E_A(\text{time}) * T_i \\ \frac{dR_i}{dt} = mig(\text{time}) * p_R + \alpha_{i-1} R_{i-1} + \gamma T_i - \mu R_i - E_A(\text{time}) * R_i \end{array} \right.$$

104

105 **Parameters estimation**

106 Simulations were performed over one birthing season. We set the beginning of the
107 season at October 1st, and the end of the season at June 30th, corresponding to 273
108 days. For the initial conditions, we set the number of pregnant females to 1,500
109 individuals based on visual counting on field. The number of initially susceptible,
110 infectious, transitory excreting and recovered bats (S_0, I_0, T_0, R_0), the proportions of
111 susceptible, infectious, transitory excreting and recovered individuals (p_S, p_I, p_T and
112 p_R) immigrating to the colony, the transmission rates ($\beta_1, \beta_2, \beta_3$, and β_{inter}), the recovery
113 rates (γ_1, γ_2 and γ_3), and the transition rate (θ) were estimated by exploring gradients
114 of values and by selecting the best values following the least squared method (**Table**
115 **1**).

116 The arrival of pregnant females (mig), the birth pulse (b), the emigration of adults (E_A)
117 and juveniles (E_J), were defined as functions of time, and estimated based on field
118 observations (**Table 1**). The mig function consisted of a linear function simulating the
119 continuous arrival of individuals during the first weeks of the birthing season. It was
120 assessed based on the initial number of bats and the maximum individuals recorded
121 in late November [20] and was applied from October to late November. For the birth
122 rate, we assumed that each pregnant female gives birth to one only pup and applied
123 the function from mid-December to mid-January [20]. The interval of application of
124 emigration functions (E_A and E_J) was assessed based on the visual observations of the
125 corresponding age classes throughout the season (**Figure 1**), and the values were
126 estimated by exploring gradients and by selecting the best values following the least
127 squared method. E_A (1/4 per capita per day) was applied from mid-January to mid-
128 February and E_J (1/20 per capita per day) from mid-February to late-June. The ageing
129 rate α_1 was estimated to 1/30 per capita per day based on the fact that we massively
130 observe juvenile bats one month after the first births (**Figure 1, Table 1**). The time

131 needed for juveniles to become adults was expected to be higher than the duration of
 132 one birthing season (> 273 days) (**Figure 1**). We set the value to 365 days and used it
 133 to estimate the ageing rate α_2 to $1/365$ per capita per day (**Table 1**). Finally, the
 134 mortality rate was approximated based on the lifespan of the Mexican free-tailed bat
 135 (*Tadarida brasiliensis*), a species of the same bat family (Molossidae) [24].

136 **Table 1.** Model variables and parameters.

| Parameter | Symbol | Type of parameter | Value | Interval for application | Unit |
|---|----------------------|-------------------|----------|--------------------------|---------------------------|
| Newborns transmission rate | β_1 | Epidemiological | 0.0001 | - | <i>per capita per day</i> |
| Juveniles transmission rate | β_2 | Epidemiological | 0.00001 | - | <i>per capita per day</i> |
| Adults transmission rate | β_3 | Epidemiological | 0.00001 | - | <i>per capita per day</i> |
| Inter-age classes transmission rate | β_{inter} | Epidemiological | 0.000012 | - | <i>per capita per day</i> |
| Transition rate | θ | Epidemiological | 1/10 | - | <i>per capita per day</i> |
| Newborns recovery rate | γ_1 | Epidemiological | 1/10 | - | <i>per capita per day</i> |
| Juveniles recovery rate | γ_2 | Epidemiological | 1/20 | - | <i>per capita per day</i> |
| Adults recovery rate | γ_3 | Epidemiological | 1/5 | - | <i>per capita per day</i> |
| Proportion of susceptible adults immigrating | p_S | Epidemiological | 0.7 | - | <i>per day</i> |
| Proportion of Infectious adults immigrating | p_I | Epidemiological | 0.09 | - | <i>per day</i> |
| Proportion of transitory excreting adults immigrating | p_T | Epidemiological | 0.01 | - | <i>per day</i> |
| Proportion of recovered adults immigrating | p_R | Epidemiological | 0.2 | - | <i>per day</i> |
| Number of initial susceptible adults | S_0 | Epidemiological | 300 | - | <i>individuals</i> |
| Number of initial infectious adults | I_0 | Epidemiological | 0 | - | <i>individuals</i> |
| Number of initial transitory excreting adults | T_0 | Epidemiological | 0 | - | <i>individuals</i> |
| Number of initial recovered adults | R_0 | Epidemiological | 1200 | - | <i>individuals</i> |
| Immigration of pregnant females | $\frac{mig}{(time)}$ | Demographical | 1000 | Day 1 to day 51 | <i>per day</i> |

| | | | | | |
|-------------------------|-------------|---------------|----------------------------|--------------------|--------------------|
| Emigration of adults | $E_A(time)$ | Demographical | 1/4 | Day 107 to day 138 | per day |
| Emigration of juveniles | $E_J(time)$ | Demographical | 1/20 | Day 138 to day 273 | per day |
| Birth rate | $b(time)$ | Demographical | 1/30 | Day 76 to day 107 | per capita per day |
| Newborns aging rate | α_1 | Demographical | 1/30 | - | per capita per day |
| Juveniles aging rate | α_2 | Demographical | 1/365 | - | per capita per day |
| Natural mortality rate | μ | Demographical | 0.00034247 ^[24] | - | per capita per day |

137

138 RESULTS

139 *Bat population dynamics*

140 The model output representing the evolution of the total population size of the colony
 141 was characterized by three main phases, in accordance with field observations (**Figure**
 142 **3**). At the beginning of the season, we observed a first increase in the population size,
 143 corresponding to the arrival of pregnant females (**Figure 3**). Shortly after parturition,
 144 the size of the population reached a maximum and then gradually decreased until the
 145 end of the season, because of the departure of (i) females and then (ii) juveniles
 146 (**Figure 3**). When considering the different age classes provided by the model output,
 147 we observed adults at the beginning of the season until one month after parturition,
 148 newborns only one month after the beginning of the birth pulse, and juveniles from
 149 approximately one month after the beginning of parturition until the end of the season
 150 (**Figure 3**).

151

152 *Coronavirus infection dynamics*

153 The model output simulating the infection dynamics of CoVs was very similar to the
 154 data obtained based on field studies [19] (**Figure 4**). For the whole population, the

155 model output provided two periods of virus transmission: the first one at the beginning
156 of the season, and the second one after the parturition (**Figure 4B**). The first
157 transmission increase occurred earlier than the first coronavirus shedding pulse
158 measured in the field, however the second and major one seemed to coincide with
159 empirical data (**Figure 4A** and **Figure 4B**). However, we did not observe the third
160 excretion peak detected during the second year of follow-up (2017-2018) [19]. When
161 considering the age classes involved in the two excretion peaks, the first peak
162 consisted only of adults whereas the second one involved mostly juveniles (**Figure**
163 **4C**).

164

165 **DISCUSSION**

166 In this study, we investigated the effects of population and age structure associated to
167 the seasonality of reproduction, on coronavirus transmission dynamics in an endemic
168 tropical bat species of Reunion Island (*Mormopterus francoismoutoui*). Based on a
169 mechanistic epidemiological model we described the population dynamics of the bat
170 population in a birthing colony, and investigated its effects on CoV infection.

171 The simulations representing the evolution of population size and structure, as well as
172 variation of the proportion of bats shedding viruses in the course of the birthing season,
173 were consistent with field observations. Infection peaks were observed involving
174 respectively adults and juveniles, thus validating our assumptions, and confirming the
175 role that maternity colonies and population structure have in the transmission of CoVs
176 in bat populations [14,19,25].

177 However, some level of variations was identified. The first excretion peak occurred
178 earlier in the birthing season in the model outputs. This result probably originated from

179 the difficulty to estimate precisely the number of adults immigrating to the colony at the
180 beginning of the season, and from missing information about their infectious status
181 upon arrival. Indeed, the geographical origin of females colonizing the cave at the
182 beginning of the season, as well as the destination of adults and juveniles after the
183 parturition remain unknown. Longitudinal studies involving capture-mark-recaptures
184 (CMRs) of individuals are needed to understand and clarify population dynamics and
185 characterize migration flows within this colony and between colonies. Such studies
186 may also allow to refine the demographical parameters used in the model such as
187 ageing rates and migration rates. CMRs combined with molecular and serological
188 approaches may further provide useful information about the epidemiology of the
189 *Alphacoronavirus* detected in this species. For instance, this will inform about the
190 duration of either maternal immunity or viral infection, as well as the time needed to
191 recover from the infection.

192 Epidemiological modelling are fundamental and complementary to field studies to
193 better understand the dynamics of viral transmission within populations of reservoir
194 hosts [26]. During the past decades, the number of studies based on mechanistic
195 models and focusing on bat-borne viruses increased, suggesting that research
196 interested in the mechanisms underpinning bat virus dynamics is on the rise [27].
197 However, despite bat-borne CoVs are recognized as a growing threat to public health,
198 the number of models focusing on these viruses are limited [23,27,28]. Although further
199 adjustments and comprehensive datasets are needed, this study highlighted the
200 importance of longitudinal studies for the establishment of CoV models able to predict
201 variations in transmission dynamics and consequently the potential spillover risks.

202

203

204 **REFERENCES**

- 205 1. Altizer S, Dobson A, Hosseini P, Hudson P, Pascual M, Rohani P. Seasonality
206 and the dynamics of infectious diseases. *Ecology Letters*. 2006;9: 467–484.
207 doi:10.1111/j.1461-0248.2005.00879.x
- 208 2. Swinton J, Harwood J, Grenfell BT, Gilligan CA. Persistence thresholds for
209 phocine distemper virus infection in harbour seal *Phoca vitulina* metapopulations.
210 *Journal of Animal Ecology*. 1998;67: 54–68.
- 211 3. Hosseini PR, Dhondt AA, Dobson A. Seasonality and wildlife disease: How
212 seasonal birth, aggregation and variation in immunity affect the dynamics of
213 *Mycoplasma gallisepticum* in house finches. *Proceedings of the Royal Society B:*
214 *Biological Sciences*. 2004;271: 2569–2577. doi:10.1098/rspb.2004.2938
- 215 4. Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T. Bats: Important
216 reservoir hosts of emerging viruses. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006;19: 531–
217 545. doi:10.1128/CMR.00017-06
- 218 5. Han H-J, Wen H, Zhou C-M, Chen F-F, Luo L-M, Liu J, et al. Bats as reservoirs of
219 severe emerging infectious diseases. *Virus Research*. 2015;205: 1–6.
220 doi:10.1016/j.virusres.2015.05.006
- 221 6. Smith I, Wang L-F. Bats and their virome: An important source of emerging viruses
222 capable of infecting humans. *Current Opinion in Virology*. 2013;3: 84–91.
223 doi:10.1016/j.coviro.2012.11.006

- 224 7. Chan JF-W, To KK-W, Tse H, Jin D-Y, Yuen K-Y. Interspecies transmission and
225 emergence of novel viruses: Lessons from bats and birds. *Trends in Microbiology*.
226 2013;21: 544–555. doi:10.1016/j.tim.2013.05.005
- 227 8. Anthony SJ, Johnson CK, Greig DJ, Kramer S, Che X, Wells H, et al. Global
228 patterns in coronavirus diversity. *Virus Evolution*. 2017;3. doi:10.1093/ve/vex012
- 229 9. Chen L, Liu B, Yang J, Jin Q. DBatVir: The database of bat-associated viruses.
230 Database. 2014;2014: bau021. doi:10.1093/database/bau021
- 231 10. Woo PCY, Lau SKP, Huang Y, Yuen K-Y. Coronavirus diversity, phylogeny and
232 interspecies jumping. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2009;234: 1117–1127.
233 doi:10.3181/0903-MR-94
- 234 11. Cui J, Li F, Shi Z-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature*
235 *Reviews Microbiology*. 2019;17: 181–192. doi:10.1038/s41579-018-0118-9
- 236 12. Holmes, Edward C, Goldstein, Stephen A, Rasmussen, Angela L, Robertson,
237 David L, Crits-Christoph, Alexander, Wertheim, Joel O, et al. The origins of SARS-
238 CoV-2: A critical review. 2021. doi:10.5281/ZENODO.5075888
- 239 13. Temmam S, Vongphayloth K, Salazar EB, Munier S, Bonomi M, Régnault B, et
240 al. Coronaviruses with a SARS-CoV-2-like receptor-binding domain allowing
241 ACE2-mediated entry into human cells isolated from bats of Indochinese
242 peninsula. In Review; 2021 Sep. doi:10.21203/rs.3.rs-871965/v1
- 243 14. Drexler JF, Corman VM, Wegner T, Tateno AF, Zerbinati RM, Gloza-Rausch F,
244 et al. Amplification of emerging viruses in a bat colony. *Emerging Infectious*
245 *Diseases*. 2011;17: 449–456. doi:10.3201/eid1703.100526

- 246 15. Wacharapluesadee S, Duengkae P, Chaiyes A, Kaewpom T, Rodpan A,
247 Yingsakmongkon S, et al. Longitudinal study of age-specific pattern of coronavirus
248 infection in Lyle's flying fox (*Pteropus lylei*) in Thailand. Virol J. 2018;15: 38.
249 doi:10.1186/s12985-018-0950-6
- 250 16. Maganga GD, Pinto A, Mombo IM, Madjitobaye M, Mbeang Beyeme AM,
251 Boundenga L, et al. Genetic diversity and ecology of coronaviruses hosted by
252 cave-dwelling bats in Gabon. Sci Rep. 2020;10: 7314. doi:10.1038/s41598-020-
253 64159-1
- 254 17. Montecino-Latorre D, Goldstein T, Gilardi K, Wolking D, Van Wormer E, Kazwala
255 R, et al. Reproduction of East-African bats may guide risk mitigation for
256 coronavirus spillover. One Health Outlook. 2020;2: 2. doi:10.1186/s42522-019-
257 0008-8
- 258 18. Cappelle J, Furey N, Hoem T, Ou TP, Lim T, Hul V, et al. Longitudinal monitoring
259 in Cambodia suggests higher circulation of alpha and betacoronaviruses in
260 juvenile and immature bats of three species. Sci Rep. 2021;11: 24145.
261 doi:10.1038/s41598-021-03169-z
- 262 19. Joffrin L, Hoarau AOG, Lagadec E, Torrontegi O, Le Minter G, Dietrich M, et al.
263 Seasonality of coronavirus shedding in tropical bats. R Soc open sci. 2022;9:
264 211600. doi:10.1098/rsos.211600
- 265 20. Dietrich M, Wilkinson DA, Benlali A, Lagadec E, Ramasindrazana B, Dellagi K, et
266 al. *Leptospira* and paramyxovirus infection dynamics in a bat maternity enlightens
267 pathogen maintenance in wildlife: Dual infection dynamics in a bat maternity.
268 Environmental Microbiology. 2015;17: 4280–4289. doi:10.1111/1462-2920.12766

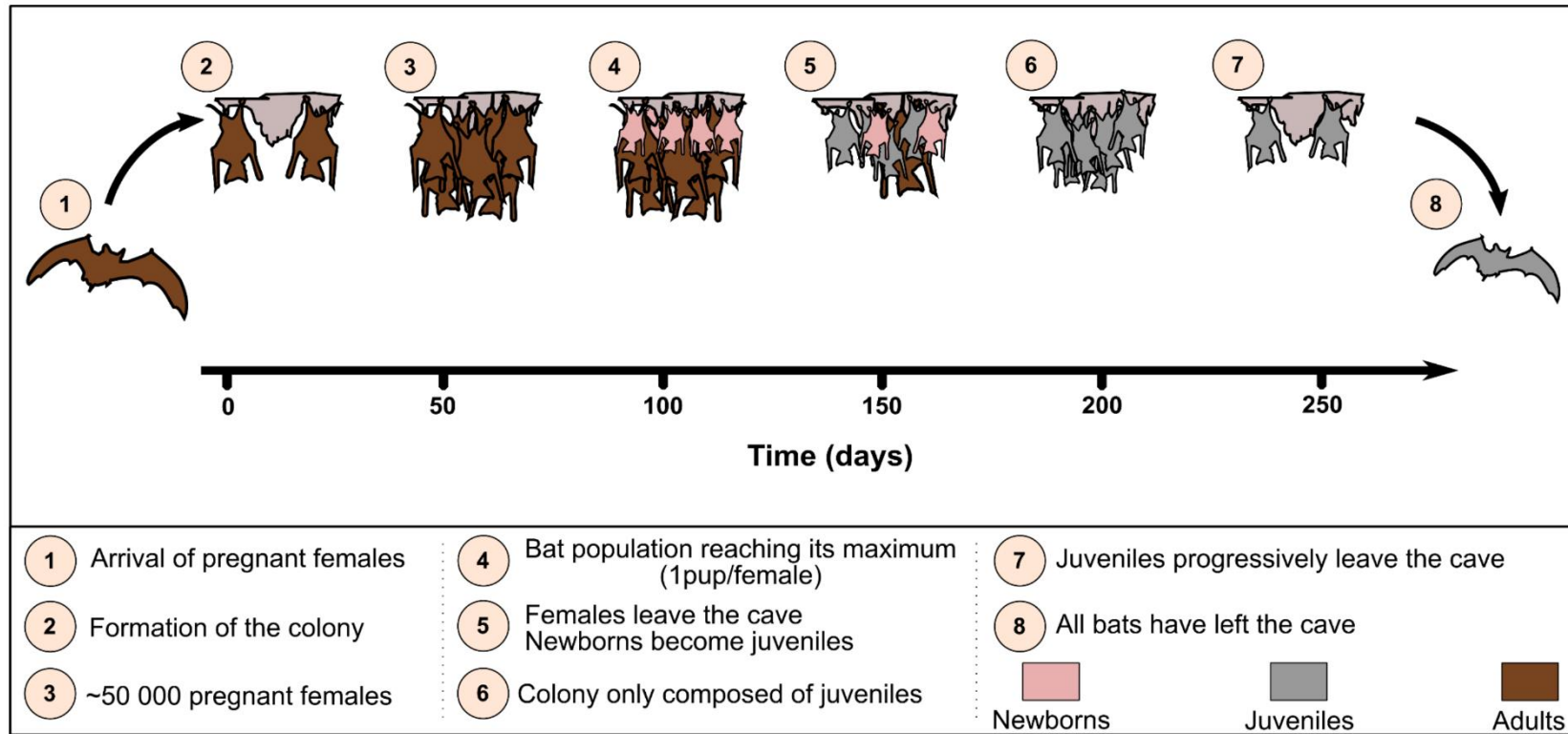
- 269 21. Tang XC, Zhang JX, Zhang SY, Wang P, Fan XH, Li LF, et al. Prevalence and
270 genetic diversity of coronaviruses in bats from China. *J Virol.* 2006;80: 7481–
271 7490. doi:10.1128/JVI.00697-06
- 272 22. Peel AJ, Sargan DR, Baker KS, Hayman DTS, Barr JA, Crameri G, et al.
273 Continent-wide panmixia of an African fruit bat facilitates transmission of
274 potentially zoonotic viruses. *Nat Commun.* 2013;4: 2770.
275 doi:10.1038/ncomms3770
- 276 23. Jeong J, Smith CS, Peel AJ, Plowright RK, Kerlin DH, Mcbroom J, et al. Persistent
277 infections support maintenance of a coronavirus in a population of Australian bats
278 (*Myotis macropus*). *Epidemiol Infect.* 2017;145: 2053–2061.
279 doi:10.1017/S0950268817000991
- 280 24. Tuttle MD, Stevenson D. Growth and survival of bats. In: Kunz TH, editor. *Ecology*
281 *of bats*. Boston, MA: Springer US; 1982. pp. 105–150. doi:10.1007/978-1-4613-
282 3421-7_3
- 283 25. Gloza-Rausch F, Ipsen A, Seebens A, Götttsche M, Panning M, Drexler JF, et al.
284 Detection and prevalence patterns of group I coronaviruses in bats, Northern
285 Germany. *Emerg Infect Dis.* 2008;14: 626–631. doi:10.3201/eid1404.071439
- 286 26. Heesterbeek H, Anderson RM, Andreasen V, Bansal S, De Angelis D, Dye C, et
287 al. Modeling infectious disease dynamics in the complex landscape of global
288 health. *Science.* 2015;347: aaa4339. doi:10.1126/science.aaa4339
- 289 27. Gentles AD, Guth S, Rozins C, Brook CE. A review of mechanistic models of viral
290 dynamics in bat reservoirs for zoonotic disease. *Pathogens and Global Health.*
291 2020;114: 407–425. doi:10.1080/20477724.2020.1833161

292 28. Chen T-M, Rui J, Wang Q-P, Zhao Z-Y, Cui J-A, Yin L. A mathematical model for
293 simulating the phase-based transmissibility of a novel coronavirus. *Infect Dis*
294 *Poverty*. 2020;9: 24. doi:10.1186/s40249-020-00640-3

295

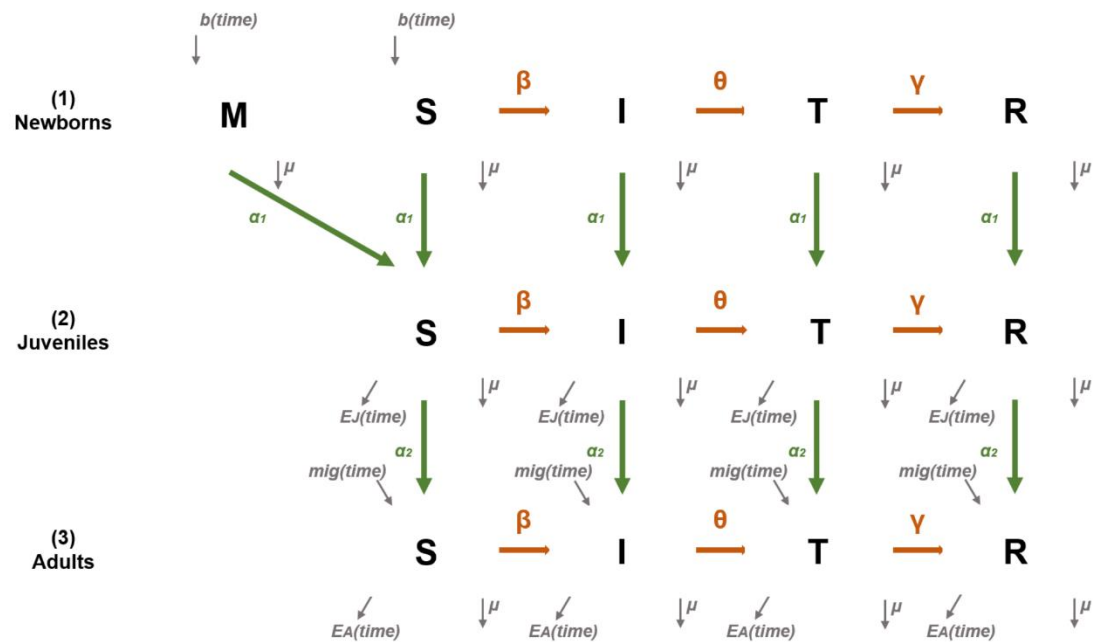
296

297



299

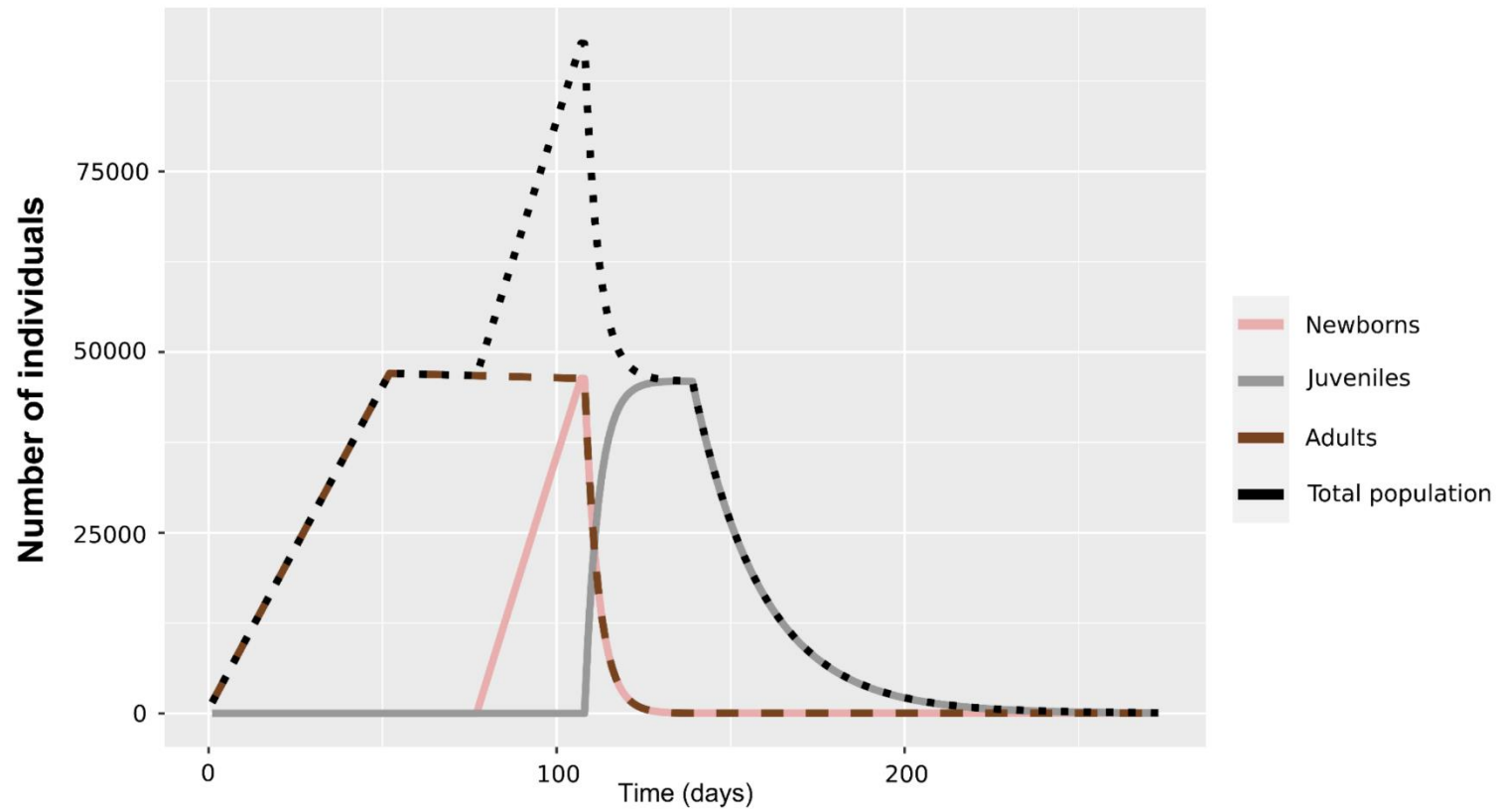
300 **Figure 1.** Succession of age classes and evolution of the relative population size in the maternity colony throughout the course of a
 301 birthing season.



302

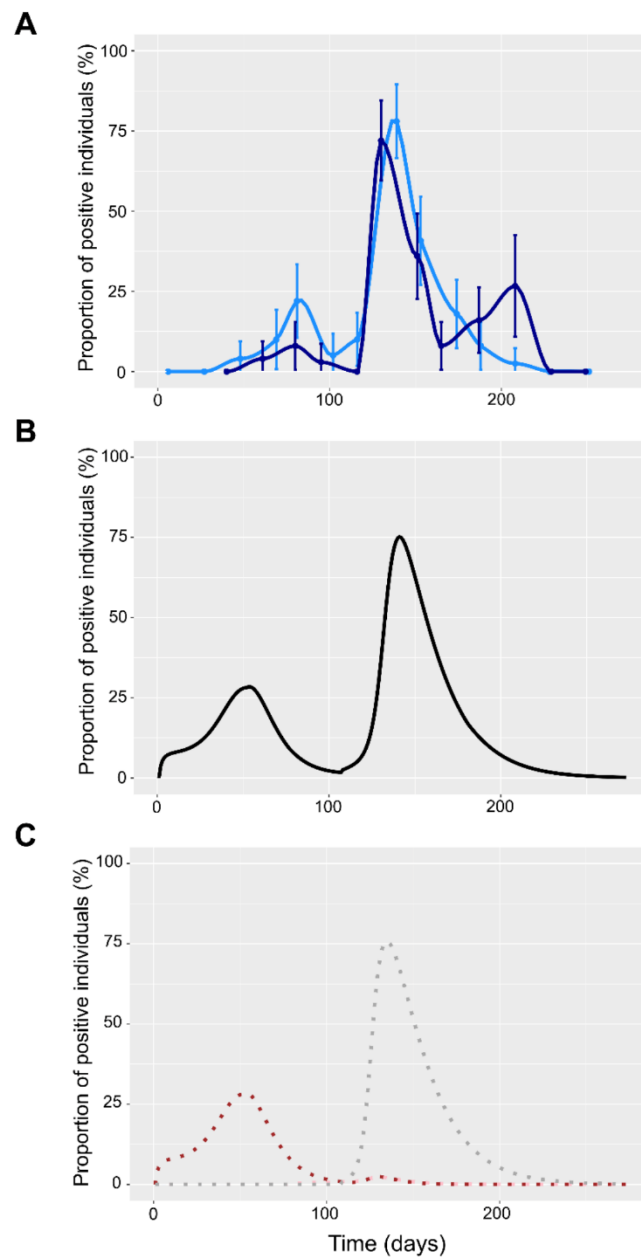
303 **Figure 2.** Flow diagram of the epidemiological model. The five compartments are: maternally immune "M", susceptible "S", infectious "I",
 304 transitory excreting "T" and recovered "R". The first line corresponds to newborns (age class (1)), the second line to juveniles (age class (2)), and
 305 the third line to adults (age class (3)). Epidemiological parameters are presented in orange. β : transmission rate, θ : transition rate, γ : recovery
 306 rate. Demographical parameters are in green and grey. α_1 and α_2 : aging rates between age classes, μ : natural mortality rate, $b(\text{time})$: birth pulse
 307 in function of time, $\text{mig}(\text{time})$: immigration of adults in function of time, $E_A(\text{time})$: emigration of adults in function of time, and $E_J(\text{time})$: emigration
 308 of juveniles in function of time.

17



309

310 **Figure 3.** Model output of the evolution of the number of individuals in the total population and within each age classes. We consider
 311 adults to be exclusively female bats.



312

313 **Figure 4.** Proportion of bats shedding coronavirus in the course of a birthing season
 314 (data versus model output). (A) Data. Light blue: 2016-2017; dark blue: 2017-2018. (B)
 315 Model output for total population. (C) Model output with details by age classes. Pink: newborn
 316 bats; brown: Adult bats; grey: juvenile bats.

V. Discussion générale et perspectives

La caractérisation de la diversité des agents infectieux circulant dans les populations d'animaux sauvages et la compréhension de leur épidémiologie sont des enjeux majeurs à l'aube de l'émergence de nouvelles zoonoses dans les populations humaines (e.g. Morse 1995 ; Jones *et al.* 2008 ; Morens *et al.* 2004). Les travaux menés au cours de cette thèse avaient pour objectif de caractériser l'effet de la diversité et de la structure des populations de chauves-souris sur les dynamiques de co-infections des coronavirus, paramyxovirus et astrovirus au sein de plusieurs espèces de la région du sud-ouest de l'océan Indien. Après une synthèse de la littérature sur les co-infections et leurs impacts sur l'épidémiologie des agents infectieux au sein de la faune sauvage (Article 1), cette thèse s'est organisée autour de trois axes de recherche. Dans un premier temps, nous avons investigué la cooccurrence des trois familles virales ainsi que l'existence de potentielles interactions entre ces virus, dans des échantillons provenant de près de la moitié des espèces de chauves-souris recensées dans la région (Article 2). Dans un second temps, nos travaux se sont focalisés sur une espèce endémique de l'île de La Réunion. Nous avons examiné la co-circulation des trois virus au sein du Petit Molosse, dans deux colonies de maternité, au cours d'une étude longitudinale sur quatre saisons de gestation et d'élevage. Ce travail visait à analyser les effets de la variation de la structure et de la taille de la population en lien avec la saisonnalité de reproduction, sur les dynamiques infectieuses (Article 3). Enfin, nous avons exploré l'effet de l'évolution de la structure de la population dans une colonie de maternité de Petits Molosses sur la dynamique d'infection aux coronavirus, au travers d'une approche de modélisation épidémiologique reposant sur un modèle construit à partir de données publiées, et d'observations de terrain (Article 4).

Nos travaux ont mis en avant plusieurs résultats originaux. Tout d'abord, nous avons pu mettre en évidence, pour la première fois, l'existence de co-infections entre coronavirus, paramyxovirus et astrovirus, au sein de plusieurs espèces de chauves-souris de la région, et de possibles interactions entre certains de ces virus. Par ailleurs, nous avons démontré l'existence d'une dynamique de circulation saisonnière marquée, répétable entre années et entre colonies de maternité, chez le Petit Molosse, avec des différences majeures pour chacun des virus étudiés. Enfin, nous avons construit et validé un modèle mécaniste permettant l'étude de la dynamique d'infection aux coronavirus chez le Petit Molosse.

V.1. Co-infections virales chez les chauves-souris

Les études investiguant la présence de co-infections virales chez les chauves-souris sont rares (Kaufman 2020). La majorité des co-infections rapportées à ce jour le sont de manière fortuite, ou provient d'investigations moléculaires ne recherchant pas spécifiquement des co-infections (Kaufman 2020). Parmi ces données, seulement un quart correspond à des co-infections impliquant des virus appartenant à des familles virales différentes (*i.e.* co-infection interfamiliales) (Kaufman 2020). Au cours de cette thèse, nous avons axé nos travaux sur la recherche systématique de co-infections interfamiliales au sein de nos échantillons, et avons rapporté pour la première fois l'existence de co-infections entre coronavirus, paramyxovirus et astrovirus, au sein de chauves-souris de la région. Par ailleurs, près de 90% des co-infections interfamiliales décrites dans la littérature sont des co-infections bipartites (Kaufman 2020). De manière intéressante, nous avons identifié des co-infections tripartites impliquant les trois familles virales chez des chauves-souris du Mozambique (Article 2), ce qui, à notre connaissance, n'avait jamais été documenté. Bien qu'anecdotique, ce résultat est marquant. Dans notre étude longitudinale conduite sur quatre saisons de reproduction, nous n'avons jamais détecté la présence de co-infections simultanées par ces trois virus chez le Petit Molosse. Ces trois familles virales sont détectées communément chez les chauves-souris à l'échelle mondiale (*cf.* Introduction générale), et pourtant, la détection de co-infections impliquant les trois virus à la fois reste exceptionnelle. Cette tendance pourrait s'expliquer par des interactions négatives sous-jacentes entre ces virus, engendrant une exclusion virale.

Malgré un très grand nombre de chauves-souris testées ($n = 4293$), les prévalences globales de co-infections rapportées dans nos travaux (Article 2 et Article 3) étaient plus faibles que celles des études menées sur les mêmes virus en région continentale, chez d'autres espèces (*e.g.* Rizzo *et al.* 2017). Par ailleurs, nous avons pu détecter la présence de co-infections chez le Petit Molosse de La Réunion au cours de l'étude longitudinale (Article 3), mais pas dans la méta-analyse (Article 2). Ces résultats soulignent l'importance de conduire des études longitudinales dans le cadre de l'investigation de co-infections (Vaumourin *et al.* 2015) afin d'estimer les variations temporelles dans les dynamiques infectieuses, et d'observer des événements rares.

Dans la continuité de ces travaux, des approches de séquençage de nouvelle génération (*e.g.* séquençage Illumina), pourraient être appliquées. Ces méthodes

permettent de détecter simultanément et sans *a priori* une plus grande diversité d'agents infectieux. Par exemple, une étude intégrant de la métagénomique et de la métatranscriptomique a pu identifier près de 15 familles virales au sein d'une dizaine d'espèces de chauves-souris insectivores et frugivores échantillonnées en Guinée (Hermida Lorenzo *et al.* 2021). Cette même étude a permis de décrire, pour la première fois, la présence de quatre familles virales (Carbovirus, hepacivirus, paramyxovirus, et pestivirus) au sein de quatre des espèces investiguées (la Phyllorhine de Jones : *Hipposideros jonesi*, la Phyllorhine de Noack : *Hipposideros ruber*, la Chauve-souris à queue libre Anglaise : *Mops condylurus*, et la Chauve-souris à grandes oreilles : *Nycteris macrotis*) (Hermida Lorenzo *et al.* 2021). Du fait du grand nombre d'échantillons collectés, les études longitudinales sont appropriées pour investiguer les co-infections. Il est envisageable, dans un premier temps, de mélanger les échantillons issus de mêmes dates d'échantillonnage pour décrire à l'aide des méthodes globales de génomique la diversité virale existante au cours du temps, à l'échelle de la population. Des méthodes de détection plus spécifiques (*i.e.* PCR) pourraient être appliquées dans un second temps, à l'échelle individuelle, afin de détecter les co-infections, après avoir mis en évidence les familles virales dominantes. Une étude menée en Allemagne a démontré que des approches de détection par PCR, par séquençage de virome, ou par isolement viral n'apportaient pas les mêmes résultats concernant la diversité virale contenue dans des mêmes échantillons (Kohl *et al.* 2021), soulignant ainsi l'importance d'approches combinées.

Une description exhaustive de l'ensemble des agents infectieux présents au sein d'un hôte reste néanmoins un objectif ambitieux. Les « niches » dans lesquelles ces agents infectieux peuvent se trouver sont très variées (*e.g.* sang, tractus urinaire, tractus digestif, tractus respiratoire). Dans le cadre de notre étude longitudinale nous n'avons prélevé qu'un seul type d'échantillons, des fèces fraîches, et les trois familles virales recherchées ont un tropisme pour les voies gastro-intestinales. Il est indéniable qu'un échantillonnage basé sur d'autres types de prélèvements aurait apporté des résultats contrastés concernant la détection de ces virus et des co-infections. Par exemple, si nous avions effectué des prélèvements d'urine, seuls les PMV qui ont également un tropisme pour les voies urinaires auraient pu être détectés. Il est donc important de combiner les types de prélèvements à l'échelle des individus afin de multiplier les probabilités de détecter les co-infections (Dietrich *et al.* 2018).

L'ensemble des agents infectieux présents au sein d'un même hôte est connu pour former une « communauté » d'agents infectieux, dans laquelle chacun peut interagir avec les autres (Cox 2001 ; Vaumourin *et al.* 2015 ; Telfer *et al.* 2010). Ces interactions peuvent donner lieu à des modifications des conditions biologiques et de la valeur sélective des hôtes, mais également à des modifications des dynamiques infectieuses (Article 1). Dans l'Article 2 de cette thèse, nous avons pu détecter une association entre les AstV et les PMV, suggérant l'existence d'une interaction positive entre eux. Ainsi, la présence de l'un des virus pourrait favoriser la présence de l'autre virus. Néanmoins, nous n'avons détecté aucune interaction entre familles virales au cours de l'étude longitudinale (Article 3). Il est important de souligner que les systèmes naturels restent des systèmes complexes. Les approches exploratoires, employées classiquement pour analyser la co-occurrence des agents infectieux, ne peuvent conduire à des conclusions fermes concernant les interactions (Vaumourin *et al.* 2015).

Des expérimentations *in vitro* pourraient être réalisées afin d'étudier les interactions et les mécanismes moléculaires sous-jacents, entre virus, à l'échelle cellulaire. Une contrainte méthodologique réside cependant dans l'isolement préalable des virus. Des PMV issus de chauves-souris des Comores ont été isolés dans le passé (Wilkinson *et al.* 2012), mais représentent cependant une diversité limitée des PMV circulant dans les communautés des chauves-souris du SOOI. À ce jour, les CoV et AstV issus de la faune sauvage du SOOI n'ont pas pu être isolés. Pour effectuer ces isolements, il faudrait utiliser des lignées cellulaires adéquates, notamment des cellules Vero (lignée cellulaire issue de cellules épithéliales de rein de singe vert Africain, *Chlorocebus* sp.), communément employées en laboratoire pour l'isolement viral (Wilkinson *et al.* 2012 ; Ge *et al.* 2013). Il est aussi envisageable d'utiliser des lignées cellulaires immortalisées issues de chauves-souris, telles que la lignée Tb1Lu dérivée de cellules pulmonaires de Tadaride du Brésil, espèce proche du Petit Molosse (*Tadarida brasiliensis*, famille : Molossidae), ou encore de générer des lignées cellulaires primaires à partir de tissus de chauves-souris du SOOI (*e.g.* Eckerle *et al.* 2014). Les souches virales permettraient de réaliser des infections expérimentales et explorer de possibles interactions *in cellulo*. Par exemple nous pourrions nous attendre à observer des effets sur la réplication virale : titres viraux plus faibles pour une interaction négative, ou plus élevés si l'interaction est positive (*e.g.* Zhou *et al.* 2015).

Des phénomènes de facilitation ou au contraire d'inhibition de l'infection sont aussi possibles. Ces tests *in cellulo* pourraient révéler des mécanismes moléculaires plus fins impliqués dans ces interactions, comme par exemple les voies immunitaires activées ou réprimées, en mesurant par exemple les variations dans la production de cytokines (e.g. Thanawongnuwech *et al.* 2001).

Par ailleurs, nous pourrions également envisager d'employer des approches mécanistes pour appréhender les effets de la co-circulation des trois familles virales sur leurs épidémiologies respectives à l'échelle des populations de Petits Molosses. Nous avons pu illustrer au cours de cette thèse, que la modélisation mathématique est une approche pertinente pour s'affranchir des données manquantes et des difficultés émanant des études de terrain. Nous avons pu acquérir suffisamment de données épidémiologiques au cours de nos travaux pour établir un modèle original ciblant la co-circulation des trois virus. Cette approche de modélisation nécessiterait néanmoins de formaliser les mécanismes sous-jacents aux interactions potentielles ayant lieu entre les trois agents infectieux (Arduin 2018 ; Rohani *et al.* 1998). Pour cela, les travaux fondamentaux menés en amont apporteraient les informations nécessaires pour retranscrire les interactions virus-virus dans un langage mathématique qui serait ensuite implémenté au modèle construit.

Enfin, au cours de cette thèse, nous n'avons pas pu évaluer les effets des co-infections par les trois familles virales, sur la biologie de leurs hôtes. Il serait intéressant de conduire des études de terrain impliquant des captures afin d'identifier l'âge, le statut reproducteur, ainsi que les conditions corporelles des individus (e.g. « *body mass index* »), afin de tester s'il existe des liens ou des effets des co-infections sur ces variables biologiques. Par ailleurs, il serait intéressant de considérer des approches expérimentales *in vivo*. Il existe de nombreux exemples d'espèces de chauves-souris qui sont maintenues au laboratoire ou en semi-captivité et qui permettent d'investiguer les effets des infections à l'échelle de l'individu (e.g. Renard volant noir : *Pteropus alecto* (Woon *et al.* 2020), Roussette d'Égypte : *Rousettus aegyptiacus* (Amman *et al.* 2015 ; Paweska *et al.* 2016)). Par exemple, une étude menée chez la Petite Chauve-Souris Brune (*Myotis lucifugus*) a pu mettre en évidence que la co-infection entre un coronavirus et *Pseudogymnoascus destructans* (un champignon responsable du syndrome du nez blanc chez les chauves-souris) induisait une plus forte excrétion d'ARN viral que dans le cadre d'une mono-infection (Davy *et al.* 2018). Néanmoins, le

statut de porteur souvent asymptomatique laisse présager des difficultés de mise en évidence des conséquences des co-infections et interactions virus-virus sur les physiologie des chauves-souris (Calisher *et al.* 2006).

V.2. Saisonnalité de l'infection et changements d'hôtes

Au cours de ces travaux nous avons pu suivre de manière précise les variations temporelles des prévalences d'infection chez le Petit Molosse, sur plusieurs années (Article 3). Nous avons mis en évidence des patrons propres à chacune des familles virales, en termes de prévalences d'infection et pour certaines une répétabilité d'une année à l'autre, et au sein de chaque site. Nous avons également pu relier les dynamiques observées à la saisonnalité de gestation et d'élevage des jeunes chez cette espèce, notamment l'implication des modifications de la structure des populations (*i.e.* âge, statut reproducteur) au cours de la saison. Cette saisonnalité marquée et très conservée suggère une possibilité de prédictibilité de la survenue des pics d'excrétion virale dans les colonies, *a minima* pour les coronavirus. Par ailleurs, les simulations conduites avec notre modèle épidémiologique (Article 4) se sont révélées fidèles aux dynamiques infectieuses attendues, validant l'emploi de cet outil pour appréhender les mécanismes de transmission virale, en dépit des informations manquantes sur la biologie de l'hôte et du virus. De plus, les résultats des simulations semblent également corroborer les hypothèses avancées concernant l'âge et le statut reproducteur des individus comme variables impliquées dans les pics d'infection recensés pour les CoV (Joffrin *et al.* 2022).

Pour aller plus loin, nous pourrions envisager de développer d'avantage les approches de modélisation pour évaluer les liens entre saisonnalité de la reproduction et les dynamiques infectieuses des CoV. La gestation et l'élevage des jeunes semblent être un phénomène synchrone et prévisible d'une année à l'autre, chez le Petit Molosse. Néanmoins, il est possible que des perturbations environnementales viennent affecter la répétabilité du phénomène biologique. La Réunion est une île au climat subtropical caractérisé par une saison sèche et une saison pluvieuse (Ah-Peng *et al.* 2005). La parturition du Petit Molosse a lieu au cours de la saison des pluies qui correspond également à la saison cyclonique. Au cours de cette période, les conditions météorologiques sont parfois très défavorables, et pourraient affecter les comportements de recherche de nourriture, et indirectement impacter les conditions biologiques des mères et des petits. Par exemple, une étude menée aux États-Unis

en Oregon et à Washington a montré que les activités nocturnes des chauves-souris sont réduites lors des soirs de pluie (Erickson et West 2002). Une autre étude menée au Brésil a illustré que les précipitations favorisaient une activité irrégulière des chauves-souris, par rapport aux nuits sans précipitations (Appel *et al.* 2019). Par ailleurs, une étude menée sur la Chauve-souris à queue courte de Sowell (*Carollia sowelli*) au Costa Rica a mis en évidence une augmentation du métabolisme pendant le vol lorsque les chauves-souris étaient mouillées ou exposées à la pluie, suggérant que la pluie génère des contraintes énergétiques importantes à ces mammifères (Voigt *et al.* 2011). Ainsi, nous pourrions émettre l'hypothèse que de mauvaises conditions météorologiques pourraient indirectement impacter la survie au sein de la colonie, ou alors engendrer des perturbations dans les cycles de naissances. La présence de précipitations importantes au printemps en Allemagne est déjà connue pour réduire le succès de reproduction des femelles primipares du Murin de Natterer (*Myotis nattereri*) (Stapelfeldt *et al.* 2022). Ce type de perturbations, facilement mesurable sur le terrain, pourrait être traduit en langage mathématique et implémenté au modèle préalablement construit, à des fins de prédiction des modifications induites dans la dynamique d'infection des CoV. Cela permettrait par exemple de tester les effets de naissances moins synchronisées, de naissances décalées dans le temps, ou encore de naissances en plusieurs vagues, sur l'apparition du deuxième pic d'infection observé dans nos données.

Il est également envisageable de développer une approche de modélisation pour appréhender les mécanismes de transmission des PMV détectés dans notre étude chez le Petit Molosse. Comme nous avons pu le montrer, la circulation des PMV est également marquée par une saisonnalité qui semble liée à la gestation et l'élevage des jeunes, comme suggéré dans une étude précédente (Dietrich *et al.* 2015b). Nous pourrions adopter une approche similaire à celle conduite pour les CoV et développer un modèle propre à ces virus et à cette espèce. Moins d'une dizaine de modèles épidémiologiques ont exploré les dynamiques d'infection des PMV chez les chauves-souris (Gentles *et al.* 2020). Cependant, l'ensemble de ces modèles s'est focalisé sur des *Henipavirus* et sur des chauves-souris frugivores (principalement du genre *Pteropus*) qui ont une écologie très différente des chauves-souris insectivores (Gentles *et al.* 2020). Il serait alors pertinent d'apporter des connaissances nouvelles sur des PMV appartenant à des genres différents, qui ont un potentiel de transmission à

d'autres hôtes vertébrés, mais également d'investiguer les mécanismes de transmission au sein de chauves-souris insectivores en milieu tropical (Wilkinson *et al.* 2014 ; Dietrich *et al.* 2015b).

Enfin, les variations dans les dynamiques infectieuses, et notamment l'apparition de pics épidémiques, sont des phases propices à la transmission des agents infectieux zoonotiques entre espèces vertébrées (Plowright *et al.* 2016). Au cours de cette thèse nous avons mis en évidence l'existence de pics d'infection dans les dynamiques de transmission des CoV et PMV. Nous pourrions nous interroger sur les risques d'observer au cours de ces périodes, une transmission virale vers d'autres espèces. À l'échelle de la région et à La Réunion, des études antérieures ont déjà pu démontrer que les PMV du genre *Morbillivirus* étaient transmis entre chauves-souris et petits mammifères terrestres (rongeurs, musaraignes, et tenrecs) (Wilkinson *et al.* 2014 ; Dietrich *et al.* 2015b). Par ailleurs, les CoV sont connus comme ayant un fort potentiel de transmission inter-espèces (Chan *et al.* 2013). De plus, dans une étude que nous avons publié récemment (Annexe 6) nous avons également suggéré la possibilité que des AstV puissent être partagés entre le Petit Molosse et des espèces mammifères (*e.g.* rongeurs, chiens), et de manière plus surprenante entre le Petit Molosse et des espèces aviaires, des reptiles, et amphibiens (Joffrin *et al.* 2021). Il serait pertinent de conduire des études visant à déterminer la fréquence et la diversité d'espèces impliquées dans ces changements d'hôtes. Dans le cadre des échantillonnages effectués sur le terrain au cours de cette thèse, nous avons pu à plusieurs reprises observer la présence d'animaux autour de la colonie de maternité située dans la grotte, tel que des bovins (*Bos taurus*), des chiens (*Canis lupus familiaris*), des rongeurs (rats : *Rattus rattus*), des reptiles (*e.g.* agame versicolore : *Calotes versicolor*), et diverses espèces aviaires (*e.g.* martin triste : *Acridotheres tristis*, moineau : *Passer domesticus*, tisserin : *Ploceus cucullatus*). Des captures et prélèvements biologiques pourraient être réalisés sur l'ensemble des espèces composant la communauté de vertébrés présente dans cet habitat, afin de rechercher la présence d'ARN viral et de mettre en évidence les potentiels changements d'hôtes. Comme évoqué précédemment, des approches de séquençage de viromes permettraient d'identifier une plus grande diversité d'agents infectieux.

Par ailleurs, il serait aussi pertinent d'explorer expérimentalement la capacité de ces virus à infecter différents hôtes, par le biais d'approches *in vivo*. Une fois

encore, un des prérequis serait d'avoir pu isoler en amont ces virus à partir des échantillons collectés sur le terrain. Des tests pourraient être menés sur des rongeurs tels que des rats et/ou souris afin de confirmer les résultats des études de terrain montrant des échanges de PMV et AstV entre les chauves-souris et ces petits mammifères (Wilkinson *et al.* 2014 ; Dietrich *et al.* 2015b ; Joffrin *et al.* 2021). Par ailleurs, ces tests permettraient également d'explorer les conséquences de l'infection par ces virus sur les fonctions biologiques et physiologiques de ces hôtes, voire sur leur capacité à être, elles aussi, des espèces réservoirs pour ces agents infectieux.

Finalement, il serait intéressant d'investiguer les modes de transmission de ces agents infectieux entre les chauves-souris et les autres animaux vertébrés. Comme nous avons pu le présenter dans l'Introduction générale à cette thèse, la transmission des agents infectieux zoonotiques peut s'effectuer de différentes manières (Allocati *et al.* 2016 ; Joffrin *et al.* 2018). Une des hypothèses que nous pourrions avancer, au vu des résultats décrivant la présence d'acides nucléiques d'AstV et de CoV dans le guano présent en dessous de la colonie située dans la grotte (Joffrin *et al.* 2021 ; 2022), est la possibilité d'une transmission indirecte entre les différents hôtes *via* l'environnement contaminé par des particules virales. Pour étayer cette hypothèse, il serait pertinent de démontrer que les acides nucléiques détectés dans le guano proviennent de particules virales infectieuses. Pour cela, nous pourrions tenter des isollements viraux à partir des échantillons de guano. Par ailleurs, au cours des échantillonnages sur le terrain nous avons également remarqué la présence d'une mare en contrebas de la grotte. Cette mare se situe sur le trajet des chauves-souris lorsqu'elles s'éveillent au crépuscule pour la recherche de nourriture. Il est commun que ces chauves-souris défèquent en vol à la sortie du gîte. Ces comportements pourraient contribuer au dépôt de matières fécales infectées dans l'eau. Ce point d'eau douce est probablement un lieu de rassemblement des différentes espèces vivant dans cet environnement lorsqu'elles ont besoin de s'hydrater. Nous pouvons donc supposer qu'il s'agit d'un point de contamination qui pourrait contribuer à la propagation virale et aux transmissions inter-espèces, d'autant plus que les virus étudiés dans cette thèse ont un tropisme pour les voies gastro-intestinales. Une étude a déjà soulevé la question du rôle des environnements aquatiques dans la transmission inter-espèces de coronavirus issus de chauves-souris et d'oiseaux (Wartecki et Rzymiski 2020). Pour autant, ces questions restent partiellement

explorées, et peu d'études se sont intéressées à l'évaluation des capacités de persistance de virus dans les eaux (e.g. coronavirus : Wang *et al.* 2005 ; Casanova *et al.* 2009). Par ailleurs, les conditions expérimentales appliquées en laboratoire sont souvent très différentes des conditions naturelles (Wartecki et Rzymiski 2020). En perspective, il serait donc intéressant de faire des prélèvements, analyses moléculaires, et tentatives d'isolement viraux sur les échantillons d'eau de cette mare, afin de confirmer ou d'infirmer ces hypothèses.

V.3. Habitats, contacts avec les populations humaines, et risque d'émergence

Les chauves-souris du SOOI occupent des habitats très divers. Comme évoqué précédemment, elles peuvent établir des colonies dans des gîtes naturels (e.g. grottes, arbres, fissures), mais aussi en milieu anthropique (e.g. bâtiments, ponts). Dans le cadre de cette thèse, nous avons eu l'opportunité d'investiguer la présence des trois familles virales dans des échantillons issus de chauves-souris nichant dans différents habitats (Article 2 et Article 3). Nous avons pu mettre en évidence que les échantillons collectés chez les espèces vivant dans des grottes étaient plus souvent positifs à la présence des virus ciblés, seuls ou en co-infections, que ceux provenant de chauves-souris vivant dans des arbres ou bâtiments (Article 2). Néanmoins, à l'échelle de La Réunion, notre étude longitudinale conduite en simultané dans un site naturel (grotte) et dans un site anthropique (bâtiment), n'a pas révélé de variation majeure dans les dynamiques d'excrétion virale entre les deux sites (Article 3), suggérant que la taille de la population et le type de gîte (naturel *versus* anthropique) ne soient pas impliqués dans les dynamiques de transmission dans ce contexte. Une autre étude, basée sur une méta-analyse rassemblant une base de données de 595 associations hôte-virus représentant 114 virus et 205 espèces de chauves-souris, a par ailleurs démontré qu'il n'y avait pas de différence de diversité virale entre des espèces vivant, ou non, dans des grottes (Willoughby *et al.* 2017). Chez les Tadarides du Brésil (*Tadarida brasiliensis*), une étude a illustré que le type d'habitat (naturel *versus* artificiel) ne semblait pas être un facteur déterminant dans les séroprévalences au virus de la rage (Turmelle *et al.* 2010).

À Madagascar, les Molossidae exploitent fréquemment des greniers, des ponts, ou encore des écoles (Goodman 2011). De plus, au cours des 100 dernières années, le développement de constructions sur l'île a fortement contribué à augmenter le

nombre de gîtes en milieu anthropique (Goodman 2011). Par ailleurs, sur cette même île, d'autres comportements amènent les populations à être en contact avec ces mammifères. Plusieurs grottes de l'île abritant des chauves-souris (e.g. dans la réserve naturelle d'Ankarana) sont connues pour être des lieux touristiques très visités. De plus, dans certaines régions, les chauves-souris frugivores sont chassées et consommées pour leur apport protéique. Bien qu'il soit difficile de quantifier l'impact de la chasse, on estime à près de 10 000 ou 15 000 le nombre de chauves-souris du genre *Pteropus*, chassées chaque année à des fins de consommation (Goodman 2011). Ces contacts réguliers avec ces mammifères et ce type de comportements soulèvent des interrogations d'un point de vue sanitaire sur le risque potentiel de transmission de zoonoses. Par exemple, des contacts entre Hommes et chauves-souris dans des grottes durant des phases accrues de circulation du virus Marburg ont été à l'origine de la transmission du virus à l'Homme en Ouganda (Amman *et al.* 2012). Par ailleurs, il a déjà été rapporté de manière ponctuelle que la consommation de viandes de brousse soit à l'origine de l'apparition d'épidémies au virus Ébola chez l'Homme (Leroy *et al.* 2005 ; 2009). À ce jour, à notre connaissance, aucune épidémie de maladie zoonotique impliquant des virus provenant de chauves-souris n'a été recensée dans la région. Néanmoins, la région du SOOI fait partie des zones à risque d'émergence en raison de la grande biodiversité qu'elle héberge (Allen *et al.* 2017), mais également des fortes pressions anthropiques subies (e.g. Murcia 1995 ; Allnutt *et al.* 2008 ; Gibson *et al.* 2013 ; Vieilledent *et al.* 2018).

Plusieurs études ont souligné la circulation potentielle (données provenant de tests sérologiques à faible spécificité) de virus zoonotiques d'intérêt médical dans le SOOI, et particulièrement à Madagascar. Par exemple, des anticorps dirigés contre le virus Ébola (*Zaire ebolavirus*) ont été détectées au sein des chauves-souris frugivores (Brook *et al.* 2019). Des variations saisonnières de séroprévalences probablement liées à la saisonnalité de la reproduction ont été mis en évidence aux échelles individuelle et populationnelle pour certaines espèces (Brook *et al.* 2019). Similairement, des études ont rapporté la circulation potentielle de paramyxovirus du genre *Henipavirus* sur cette île. Des anticorps dirigés contre plusieurs virus appartenant à ce genre, ont été identifiés au sein des chauves-souris frugivores (Iehlé *et al.* 2007 ; Brook *et al.* 2019). Là encore, des variations saisonnières de séroprévalences ont été enregistrées à l'échelle de l'hôte et des populations pour

certaines espèces, avec un lien fort avec la saisonnalité de la reproduction. Néanmoins, aucune trace moléculaire de ces virus n'a été détectée chez ces chauves-souris jusqu'à présent. La circulation éventuelle de ces virus illustre la nécessité d'identifier la diversité virale présente chez les chauves-souris, et d'évaluer les risques de transmission, à l'Homme, mais aussi à d'autres espèces, notamment au cours des phases accrues de circulation dans les populations de chauves-souris. Le rôle clé des hôtes intermédiaires domestiques ou d'élevage (e.g. le porc dans l'émergence du virus Nipah) est par ailleurs souvent négligé dans les travaux visant à investiguer les risques d'émergence d'agents infectieux au sein des populations humaines, et devrait être pris en compte dans des études futures.

Il serait pertinent d'approfondir les études et de conduire des suivis impliquant des approches moléculaires pour confirmer ou infirmer la présence de virus d'intérêt médical, de caractériser leur diversité, et d'identifier leur origine. Dans ce contexte, Madagascar est un site approprié puisque caractérisé par une grande biodiversité qui subit de fortes pressions anthropiques, et au sein de laquelle plusieurs virus zoonotiques ont déjà été identifiés dans la faune (Hoarau *et al.* *Sous presse*). Il serait pertinent de conduire des investigations au sein des espèces de chauves-souris connues pour être régulièrement en contact avec les populations (e.g. espèces de la famille des Molossidae), et en ciblant les colonies présentes dans les constructions humaines, dans les lieux touristiques, ou encore connues pour être chassées. Des approches impliquant un séquençage sans *a priori* permettraient de décrire l'étendue de la diversité des virus circulant au sein de ces espèces à l'instant donné. Néanmoins, il serait également pertinent, à l'image des travaux que nous avons menés à La Réunion au cours de cette thèse, de mettre en place un suivi longitudinal à l'aide de criblages plus spécifiques des familles virales les plus répandues et/ou qui représentent une menace pour la santé humaine ou animale. Le suivi longitudinal permettrait de révéler les variations saisonnières dans les dynamiques de transmission des différents virus et identifier des périodes à risque de changement d'hôtes. En parallèle, il serait également intéressant de conduire des investigations en populations humaines à l'aide d'approches sérologiques afin de détecter des expositions passées mais non détectées. Plusieurs études récentes ont exploré la présence d'anticorps dirigés contre certains virus de chauves-souris dans les populations humaines à risque. Par exemple, une étude menée en Chine dans les provinces du Guangdong

(province où a émergé le SARS-CoV), du Yunnan, et de Guangxi, a recherché des anticorps anti-coronavirus chez 1497 habitants. Un total de 9 personnes (soit 0.6%) a été testé positif. Ces habitants présentaient des anticorps dirigés contre des virus apparentés aux SARS-CoV, coronavirus HKU10-CoV (un *α-coronavirus* de chauves-souris) et d'autres CoV phylogénétiquement proches (Li *et al.* 2019), soulignant l'existence de transmissions ponctuelles de virus entre chauves-souris et Homme.

V.4. Risques zoonotiques et conservation des chauves-souris

Les chauves-souris sont des animaux particulièrement vulnérables. Elles sont sensibles aux changements environnementaux et aux impacts des activités humaines (Mickleburgh *et al.* 2002 ; Voigt et Kingston 2016). La perte ou la modification des habitats, la perturbation des colonies ou encore la surexploitation des espèces pour la consommation, représentent des menaces identifiées depuis maintenant près de 20 ans (Mickleburgh *et al.* 2002). Récemment, de nouvelles menaces sont apparues. En effet, des mortalités massives liées au réchauffement climatique et aux vagues de forte chaleur (Welbergen *et al.* 2008), ou encore l'émergence de nouvelles maladies infectieuses (e.g. syndrome du nez blanc causé par *Pseudogymnoascus destructans*) (O'Shea *et al.* 2016 ; Voigt et Kingston 2016 ; Frick *et al.* 2020), ont été observées. Ces menaces soulignent l'importance de mener des actions pour la conservation de ces mammifères (Kunz *et al.* 2011; Russo *et al.* 2018). Parmi les 1400 espèces de chauves-souris décrites à ce jour, 1200 sont inscrites sur les listes de l'UICN (Frick *et al.* 2020). Parmi elles, 25% sont des espèces menacées et 15% présentent des données insuffisantes pour la détermination de leur statut de conservation (Frick *et al.* 2020). Par ailleurs, près de 20% de l'ensemble des espèces décrites vivent en milieux insulaires (Conenna *et al.* 2017), où elles sont d'avantage menacées qu'en milieu continental (Jones *et al.* 2009 ; Conenna *et al.* 2017).

Il convient de souligner que les chauves-souris sont depuis longtemps stigmatisées en raison de nombreux préjugés négatifs, alimentés par les mythes, légendes et folklores à travers le monde (Voigt et Kingston 2016 ; López-Baucells *et al.* 2018). Cette perception erronée autour de ces mammifères n'a fait que s'accroître au cours de ces dernières décennies. Le nombre d'études investiguant la circulation de virus zoonotiques chez les chauves-souris a considérablement augmenté, leur associant une image menaçante (López-Baucells *et al.* 2018). Ce phénomène s'est accompagné d'une augmentation de l'attention portée par les médias sur le sujet, ce qui a pu

alimenter des clichés déjà existants au sein des populations (Lunney et Moon 2011 ; López-Baucells *et al.* 2018). Pourtant, le risque sanitaire représenté par les chauves-souris reste faible (Voigt et Kingston 2016 ; Anthony *et al.* 2017 ; López-Baucells *et al.* 2018). En effet, bien que les chauves-souris soient des réservoirs d'une grande diversité de virus, cette dernière est attribuable à la grande diversité spécifique connue pour ces mammifères (Johnson *et al.* 2020 ; Mollentze et Streicker 2020). Il est important de souligner qu'un nombre croissant d'événements d'émergences est imputable aux activités humaines, notamment à l'empiétement de l'Homme sur les territoires naturels favorisant les filtres de rencontre (Buttke *et al.* 2015 ; Brierley *et al.* 2016 ; Terraube *et al.* 2017 ; López-Baucells *et al.* 2018).

Plusieurs exemples illustrent les conséquences de l'appréhension humaine vis-à-vis des chauves-souris. En Ouganda, en 2007, après l'émergence du virus Marburg dans la mine de Kitaka, plusieurs mineurs locaux ont tenté de détruire la colonie de Roussette d'Égypte (*Rousettus aegyptiacus*) présente dans les lieux, en obstruant la grotte pour empêcher la sortie des individus et leur alimentation durant plusieurs semaines (Amman *et al.* 2014). En Australie, l'identification des Renards Volant (*Pteropus* sp.) en tant que réservoirs naturels du virus Hendra a pu engendrer le massacre et le harcèlement de ces chauves-souris sur une large échelle dans le pays (Roberts *et al.* 2012).

Dans le contexte pandémique actuel, les liens phylogénétiques établis entre le SARS-CoV-2 et des CoV détectés chez des chauves-souris du genre *Rhinolopus* sp. (e.g. RaTG13 , RmYN02) (Zhou *et al.* 2020 ; Temmam *et al.* 2021) ont aggravé la situation. De plus, de fausses informations ont largement circulé sur les réseaux sociaux, reliant l'émergence potentielle de SARS-CoV-2 à la consommation de soupe de chauves-souris (Franceinfo 2020), renforçant d'avantage l'association chauves-souris – risques zoonotiques, ainsi que la peur et l'animosité déjà éprouvées à l'égard de ces mammifères (Rocha *et al.* 2021). En Australie, en Inde, ou encore au Pérou, des témoignages d'abatage de chauves-souris ont été recensés (Duràn 2020 ; Goyal 2020 ; Lentini *et al.* 2020 ; Tsang 2020 ; Rocha *et al.* 2021), alors qu'ils ne permettent pas d'éliminer les risques pour les populations humaines. Dans certains cas, ces comportements peuvent même les renforcer puisqu'ils peuvent rapprocher les Hommes des chauves-souris, ou encore engendrer un stress physiologique qui affecte l'excrétion virale et facilite la transmission (Olival 2016).

Le défis à relever est donc d'informer les populations des risques sanitaires associés aux chauves-souris, tout en prenant en compte les conséquences négatives que cela pourrait engendrer sur leur conservation (Rocha *et al.* 2021). Ce problème complexe nécessite une approche transdisciplinaire afin d'élaborer des mesures et actions adéquates pour limiter les risques de transmission à l'Homme, tout en promouvant le rôle des chauves-souris pour leurs services écosystémiques (Rocha *et al.* 2021). Des travaux de recherche approfondis sur l'écologie et l'évolution des agents infectieux associés aux chauves-souris sont indispensables afin de caractériser les risques réels représentés par les chauves-souris et les virus qu'elles hébergent (Hayman *et al.* 2013 ; Brook *et al.* 2020 ; Rocha *et al.* 2021). Ces travaux devraient intégrer l'évaluation de la répartition des populations d'hôtes, les dynamiques de transmission, ou encore explorer les mécanismes immunitaires impliqués chez les chauves-souris lors des infections (Rocha *et al.* 2021). Il semble également nécessaire d'identifier les facteurs impliqués dans les épisodes d'émergence des agents infectieux de chauves-souris dans chacun des contextes investigués (*e.g.* empiètement de l'Homme sur les milieux naturels, collecte de guano, cohabitation Homme – chauves-souris dans les gîtes synanthropiques) (Rocha *et al.* 2021). Par ailleurs, les dimensions liées à la perception des chauves-souris et à l'identification de conflits pouvant les opposer aux populations humaines (*e.g.* cultures de fruits, présence de gîtes de chauves-souris en milieu urbain) doivent être prises en compte. De même, les sensibilisations autour des services écosystémiques des chauves-souris, y compris en rapport avec la santé humaine (*e.g.* consommation de moustiques vecteurs de maladies par les chauves-souris), sont des éléments précieux à promouvoir.

En conclusion, dans ce manuscrit nous avons pu illustrer que la région du SOOI présentait un cadre particulièrement propice à l'étude de la circulation des virus au sein des communautés de chauves-souris, en raison de l'histoire géologique singulière de cette région, de sa biodiversité, et des forts taux d'endémisme. Nos travaux ont pu consolider les connaissances déjà existantes concernant la diversité des virus circulant. Ils apportent des connaissances nouvelles sur la co-circulation de plusieurs familles virales à l'échelle de la région, l'existence d'interactions entre ces virus, tout en révélant la saisonnalité des infections en lien avec la biologie des hôtes. Plus encore, nous avons pu souligner que les territoires de la région subissaient de fortes pressions anthropiques et des modifications profondes de leurs habitats naturels (*e.g.*

Allnutt *et al.* 2008 ; Vieilledent *et al.* 2018), pouvant impacter la conservation des espèces. À l'instar des autres milieux insulaires (Jones *et al.* 2009 ; Conenna *et al.* 2017), de nombreuses chauves-souris de la région sont menacées ou ont un statut de conservation non établi par l'UICN (*cf.* Introduction générale). En raison de la circulation potentielle d'agent infectieux d'intérêt médical (Iehlé *et al.* 2007 ; Brook *et al.* 2019), et de la présence de nombreux facteurs favorables au franchissement de la barrière d'espèces des pathogènes vers les populations humaines (*e.g.* chasse, consommation de viande de brousse), les perspectives de recherche évoquées dans cette discussion générale devraient être prises en considération. Une approche holistique en écologie de la santé d'identification des risques et de mise en place de mesures préventives pour la santé de l'Homme, la santé animale, et la santé environnementale devrait être encouragée.

VI. Références

- Adjemian, J., Farnon, E.C., Tschiko, F., Wamala, J.F., Byaruhanga, E., Bwire, G.S., Kansiime, E., Kagirita, A., Ahimbisibwe, S., Katunguka, F., *et al.* (2011). Outbreak of Marburg hemorrhagic fever among miners in Kamwenge and Ibanda Districts, Uganda, 2007. *J Infect Dis* 204 Suppl 3, S796-799. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir312>.
- Ah-Peng, C., Bardat, J., et Ellis, L. (2005). Additions to the bryoflora of Réunion Island (France). *Lindbergia* 30, 43–45. <http://www.jstor.org/stable/20150180>.
- Alizon, S., de Roode, J.C., et Michalakis, Y. (2013). Multiple infections and the evolution of virulence. *Ecology Letters* 16, 556–567. <https://doi.org/10.1111/ele.12076>.
- Allen, T., Murray, K.A., Zambrana-Torrel, C., Morse, S.S., Rondinini, C., Di Marco, M., Breit, N., Olival, K.J., et Daszak, P. (2017). Global hotspots and correlates of emerging zoonotic diseases. *Nature Communications* 8, 124. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00923-8>.
- Allnutt, T.F., Ferrier, S., Manion, G., Powell, G.V.N., Ricketts, T.H., Fisher, B.L., Harper, G.J., Irwin, M.E., Kremen, C., Labat, J.-N., *et al.* (2008). A method for quantifying biodiversity loss and its application to a 50-year record of deforestation across Madagascar: Extinction estimates in Madagascar from deforestation. *Conservation Letters* 1, 173–181. <https://doi.org/10.1111/j.1755-263X.2008.00027.x>.
- Allocati, N., Petrucci, A.G., Di Giovanni, P., Masulli, M., Di Ilio, C., et De Laurenzi, V. (2016). Bat–man disease transmission: Zoonotic pathogens from wildlife reservoirs to human populations. *Cell Death Discovery* 2, 16048. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.48>.
- Altizer, S., Davis, A.K., Cook, K.C., et Cherry, J.J. (2004). Age, sex, and season affect the risk of mycoplasmal conjunctivitis in a southeastern house finch population. *Can. J. Zool.* 82, 755–763. <https://doi.org/10.1139/z04-050>.
- Altizer, S., Dobson, A., Hosseini, P., Hudson, P., Pascual, M., et Rohani, P. (2006). Seasonality and the dynamics of infectious diseases. *Ecology Letters* 9, 467–484. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00879.x>.
- Altizer, S., Bartel, R., et Han, B.A. (2011). Animal migration and infectious disease risk. *Science* 331, 296–302. <https://doi.org/10.1126/science.1194694>.

Amengual, B., Bourhy, H., López-Roig, M., et Serra-Cobo, J. (2007). Temporal dynamics of European bat lyssavirus Type 1 and survival of *Myotis myotis* bats in natural colonies. PLoS ONE 2, e566. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000566>.

Amman, B.R., Carroll, S.A., Reed, Z.D., Sealy, T.K., Balinandi, S., Swanepoel, R., Kemp, A., Erickson, B.R., Comer, J.A., Campbell, S., *et al.* (2012). Seasonal pulses of Marburg virus circulation in juvenile *Rousettus aegyptiacus* bats coincide with periods of increased risk of human infection. PLoS Pathogens 8, e1002877. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002877>.

Amman, B.R., Nyakarahuka, L., McElroy, A.K., Dodd, K.A., Sealy, T.K., Schuh, A.J., Shoemaker, T.R., Balinandi, S., Atimnedi, P., Kaboyo, W., *et al.* (2014). Marburgvirus resurgence in Kitaka mine bat population after extermination attempts, Uganda. Emerg. Infect. Dis. 20, 1761–1764. <https://doi.org/10.3201/eid2010.140696>.

Amman, B.R., Jones, M.E.B., Sealy, T.K., Uebelhoer, L.S., Schuh, A.J., Bird, B.H., Coleman-McCray, J.D., Martin, B.E., Nichol, S.T., et Towner, J.S. (2015). Oral shedding of Marburg virus in experimentally infected Egyptian fruit bats (*Rousettus aegyptiacus*). Journal of Wildlife Diseases 51, 113–124. <https://doi.org/10.7589/2014-08-198>.

Anthony, S.J., Johnson, C.K., Greig, D.J., Kramer, S., Che, X., Wells, H., Hicks, A.L., Joly, D.O., Wolfe, N.D., Daszak, P., *et al.* (2017). Global patterns in coronavirus diversity. Virus Evolution 3. <https://doi.org/10.1093/ve/vex012>.

Appel, G., López-Baucells, A., Magnusson, W.E., et Bobrowiec, P.E.D. (2019). Temperature, rainfall, and moonlight intensity effects on activity of tropical insectivorous bats. Journal of Mammalogy 100, 1889–1900. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyz140>.

Arduin, H. (2018). Modélisation mathématique des interactions entre pathogènes chez l'hôte humain : Application aux virus de la grippe et au pneumocoque. Université Paris-Saclay. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01778961/>.

Arrêté du 17 février 1989 fixant des mesures de protection des espèces animales représentées dans le département de la Réunion (1989). <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000000327123/>.

Bahl, J., Krauss, S., Kühnert, D., Fourment, M., Raven, G., Pryor, S.P., Niles, L.J., Danner, A., Walker, D., Mendenhall, I.H., *et al.* (2013). Influenza A virus migration and persistence in North American wild birds. *PLoS Pathog* 9, e1003570. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003570>.

Baker, R.E., Mahmud, A.S., Miller, I.F., Rajeev, M., Rasambainarivo, F., Rice, B.L., Takahashi, S., Tatem, A.J., Wagner, C.E., Wang, L.-F., *et al.* (2021). Infectious disease in an era of global change. *Nat Rev Microbiol* 20, 193–205. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00639-z>.

Banerjee, A., Kulcsar, K., Misra, V., Frieman, M., *et al.* (2019). Bats and coronaviruses. *Viruses* 11, 41. <https://doi.org/10.3390/v11010041>.

Belak, S., Karlsson, O.E., Leijon, M., *et al.* (2013). High-throughput sequencing in veterinary infection biology and diagnostics. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE* 32, 893–915. <https://doi.org/10.20506/rst.32.2.2206>.

Biedinger, N., *et al.* (2000). Seychelles ecological studies. Dans *Inselbergs, S. Porembski, and W. Barthlott, eds.* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 277–290. http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-59773-2_14.

Binder, S. (1999). Emerging infectious diseases: Public health issues for the 21st century. *Science* 284, 1311–1313. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1311>.

Bonilla-Aldana, D.K., Acevedo-López, D., Aristizábal-Carmona, B.S., Díaz-García, F.A., Sarmiento-Cano, C.C., Gutiérrez-Soleibe, S., Del Mar España-Cerquera, M., Obando-Cardona, D.M., Castrillón-Correa, L.P., Castro-Henao, J., *et al.* (2021). Molecular and serological prevalence of coronavirus in Chiropterans: A systematic review with meta-analysis. *Infez Med* 29, 181–190.

Bordes, F., *et al.* (2011). The impact of multiple infections on wild animal hosts: A review. *Infection Ecology & Epidemiology* 1, 7346. <https://doi.org/10.3402/iee.v1i0.7346>.

Bosch, A., Pintó, R.M., *et al.* (2014). Human astroviruses. *Clinical Microbiology Reviews* 27, 1048–1074. <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-14>.

Boyles, J.G., Cryan, P.M., McCracken, G.F., et Kunz, T.H. (2011). Economic importance of bats in agriculture. *Science* 332, 41–42. <https://doi.org/10.1126/science.1201366>.

Brierley, L., Vonhof, M.J., Olival, K.J., Daszak, P., et Jones, K.E. (2016). Quantifying global drivers of zoonotic bat viruses: A process-based perspective. *The American Naturalist* 187(2), E53–E64. <https://doi.org/10.1086/684391>.

Brook, C.E., Ranaivoson, H.C., Broder, C.C., Cunningham, A.A., Héraud, J., Peel, A.J., Gibson, L., Wood, J.L.N., Metcalf, C.J., et Dobson, A.P. (2019). Disentangling serology to elucidate henipa- and filovirus transmission in Madagascar fruit bats. *Journal of Animal Ecology* 88, 1001–1016. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12985>.

Brook, C.E., Boots, M., Chandran, K., Dobson, A.P., Drosten, C., Graham, A.L., Grenfell, B.T., Müller, M.A., Ng, M., Wang, L.-F., et al. (2020). Accelerated viral dynamics in bat cell lines, with implications for zoonotic emergence. *ELife* 9, e48401. <https://doi.org/10.7554/eLife.48401>.

Brosset, A. (1990). Les migrations de la pipistrelle de Nathusius, *Pipistrellus nathusii*, en France. Ses incidences possibles sur la propagation de la rage. *Mammalia* 54, 207–212. <https://doi.org/10.1515/mamm-1990-0205>.

Burnet, F.M.S., et White, D.O. (1972). *Natural history of infectious disease* (London: Cambridge U. P).

Buttke, D.E., Decker, D.J., et Wild, M.A. (2015). The role of one health in wildlife conservation: a challenge and opportunity. *Journal of Wildlife Diseases* 51, 1–8. <https://doi.org/10.7589/2014-01-004>.

Caceres, S. (2010). Plan de conservation de la Roussette noire (*Pteropus niger*) dans l'île de La Réunion. (ONCFS/DEAL Réunion). https://www.reunion.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/PDC_Roussette_cle0b11cd.pdf.

Calisher, C.H., Childs, J.E., Field, H.E., Holmes, K.V., et Schountz, T. (2006). Bats: Important reservoir hosts of emerging viruses. *Clinical Microbiology Reviews* 19, 531–545. <https://doi.org/10.1128/CMR.00017-06>.

Caminade, C., Kovats, S., Rocklov, J., Tompkins, A.M., Morse, A.P., Colón-González, F.J., Stenlund, H., Martens, P., et Lloyd, S.J. (2014). Impact of climate change on

global malaria distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 3286–3291. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302089111>.

Cardiff, S.G., et Jenkins, R.K.B. (2016). The bats of Madagascar: A conservation Challenge.

Lessons in Conservation. 6, 80-108.

Casanova, L., Rutala, W.A., Weber, D.J., et Sobsey, M.D. (2009). Survival of surrogate coronaviruses in water. *Water Research* 43, 1893–1898. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.02.002>.

Cattadori, I., Boag, B., Bjørnstad, O., Cornell, S., et Hudson, P. (2005). Peak shift and epidemiology in a seasonal host–nematode system. *Proc Biol Sci* 272, 1163–1169. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.3050>.

Cauchemez, S., Fraser, C., Van Kerkhove, M.D., Donnelly, C.A., Riley, S., Rambaut, A., Enouf, V., van der Werf, S., et Ferguson, N.M. (2014). Middle East respiratory syndrome coronavirus: Quantification of the extent of the epidemic, surveillance biases, and transmissibility. *The Lancet Infectious Diseases* 14, 50–56. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70304-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70304-9).

Cauchemez, S., Nouvellet, P., Cori, A., Jombart, T., Garske, T., Clapham, H., Moore, S., Mills, H.L., Salje, H., Collins, C., et al. (2016). Unraveling the drivers of MERS-CoV transmission. *Proc Natl Acad Sci USA* 113, 9081–9086. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519235113>.

Centers for Disease Control and Prevention (2019). Transmission - Hendra Virus Disease. <https://www.cdc.gov/vhf/hendra/transmission/index.html> consulté le 21/09/2021

Chan, J.F.-W., To, K.K.-W., Tse, H., Jin, D.-Y., et Yuen, K.-Y. (2013). Interspecies transmission and emergence of novel viruses: Lessons from bats and birds. *Trends in Microbiology* 21, 544–555. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.05.005>.

Cheke, A., et Hume, J.P. (2008). *Lost land of the Dodo: An ecological history of Mauritius, Réunion & Rodrigues* (New Haven London: Yale University Press).

- Cheke, A.S., et Dahl, J.F. (1981). The Status of bats on western Indian Ocean islands, with special reference to *Pteropus*. *Mammalia* 45, 205-238. <https://doi.org/10.1515/mamm.1981.45.2.205>.
- Chen, L., Liu, B., Yang, J., et Jin, Q. (2014). DBatVir: The database of bat-associated viruses. *Database* 2014. <https://doi.org/10.1093/database/bau021>.
- Chen, T.-M., Rui, J., Wang, Q.-P., Zhao, Z.-Y., Cui, J.-A., et Yin, L. (2020). A mathematical model for simulating the phase-based transmissibility of a novel coronavirus. *Infect Dis Poverty* 9, 24. <https://doi.org/10.1186/s40249-020-00640-3>.
- Christe, P., Arlettaz, R., et Vogel, P. (2000). Variation in intensity of a parasitic mite (*Spinturnix myoti*) in relation to the reproductive cycle and immunocompetence of its bat host (*Myotis myotis*). *Ecology Letters* 3, 207–212. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2000.00142.x>.
- Christidis, L., Goodman, S.M., Naughton, K., et 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092440>.
- Chua, K.B. (2000). Nipah virus: A recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* 288, 1432–1435. <https://doi.org/10.1126/science.288.5470.1432>.
- Chua, K.B., Goh, K.J., Wong, K.T., Kamarulzaman, A., Tan, P.S.K., Ksiazek, T.G., Zaki, S.R., Paul, G., Lam, S.K., et Tan, C.T. (1999). Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia. *The Lancet* 354, 1257–1259. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)04299-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)04299-3).
- Conenna, I., Rocha, R., Russo, D., et Cabeza, M. (2017). Insular bats and research effort: a review of global patterns and priorities. *Mammal Review* 47, 169–182. <https://doi.org/10.1111/mam.12090>.
- Cox, F.E.G. (2001). Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology* 122, S23–S38. <https://doi.org/10.1017/S003118200001698X>.
- Crosby, A.W. (2003). *The Columbian exchange: biological and cultural consequences of 1492* (Westport, Conn. London: Praeger).

Cui, J., Li, F., et Shi, Z.-L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology* 17, 181–192. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>.

Daszak, P. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife - Threats to biodiversity and human health. *Science* 287, 443–449. <https://doi.org/10.1126/science.287.5452.443>.

Daszak, P., Field, H.E., Hyatt, A.D., Smith, C., Halpin, K., Epstein, J.H., Middleton, D., Fogarty, R., Hughes, T., Bingham, J., *et al.* (2011). Pteropid bats are confirmed as the reservoir hosts of Henipaviruses: A comprehensive experimental study of virus transmission. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 85, 946–951. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0567>.

Database of bat-associated viruses (2021) <http://www.mgc.ac.cn/DBatVir/>.

Dato, V.M., Campagnolo, E.R., Long, J., et Rupprecht, C.E. (2016). A systematic review of human bat rabies virus variant cases: Evaluating unprotected physical contact with claws and teeth in support of accurate risk assessments. *PLoS ONE* 11, e0159443. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159443>.

Davy, C.M., Donaldson, M.E., Subudhi, S., Rapin, N., Warnecke, L., Turner, J.M., Bollinger, T.K., Kyle, C.J., Dorville, N.A.S.-Y., Kunkel, E.L., *et al.* (2018). White-nose syndrome is associated with increased replication of a naturally persisting coronaviruses in bats. *Scientific Reports* 8, 15508. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33975-x>.

De Benedictis, P., Schultz-Cherry, S., Burnham, A., et Cattoli, G. (2011). Astrovirus infections in humans and animals – Molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infection, Genetics and Evolution* 11, 1529–1544. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.07.024>.

Demos, T.C., Goodman, S.M., et Patterson, B.D. (2021). The Status of *Nycteris madagascariensis* G. Grandidier, 1937, a reputed endemic to Madagascar. *Acta Chiropterologica* 23(1),21-32. <https://doi.org/10.3161/15081109ACC2021.23.1.002>.

Desselberger, U. (2000). Emerging and re-emerging infectious diseases. *Journal of Infection* 40, 3–15. <https://doi.org/10.1053/jinf.1999.0624>.

- Dietrich, M., Mühldorfer, K., Tortosa, P., et Markotter, W. (2015a). *Leptospira* and bats: Story of an emerging friendship. *PLoS Pathog* 11, e1005176. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005176>.
- Dietrich, M., Wilkinson, D.A., Benlali, A., Lagadec, E., Ramasindrazana, B., Dellagi, K., et Tortosa, P. (2015b). *Leptospira* and paramyxovirus infection dynamics in a bat maternity enlightens pathogen maintenance in wildlife: Dual infection dynamics in a bat maternity. *Environmental Microbiology* 17, 4280–4289. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12766>.
- Dietrich, M., Kearney, T., Seamark, E.C.J., Paweska, J.T., et Markotter, W. (2018). Synchronized shift of oral, faecal and urinary microbiotas in bats and natural infection dynamics during seasonal reproduction. *R. Soc. Open Sci.* 5, 180041. <https://doi.org/10.1098/rsos.180041>.
- Dimitrov, D.T., et King, A.A. (2008). Modeling evolution and persistence of neurological viral diseases in wild populations. *Mathematical Biosciences and Engineering* 5, 729–741. <https://doi.org/10.3934/mbe.2008.5.729>.
- Dimitrov, D.T., Hallam, T.G., Rupprecht, C.E., Turmelle, A.S., et McCracken, G.F. (2007). Integrative models of bat rabies immunology, epizootiology and disease demography. *Journal of Theoretical Biology* 245, 498–509. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2006.11.001>.
- Dimitrov, D.T., Hallam, T.G., Rupprecht, C.E., et McCracken, G.F. (2008). Adaptive modeling of viral diseases in bats with a focus on rabies. *Journal of Theoretical Biology* 255, 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2008.08.007>.
- Dingle, H. (2014). *Migration: The biology of life on the move* (Oxford University Press).
- Donaldson, E.F., Haskew, A.N., Gates, J.E., Huynh, J., Moore, C.J., et Frieman, M.B. (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. <https://doi.org/10.1128/JVI.01255-10>.
- Donato, C., et Vijaykrishna, D. (2017). The broad host range and genetic diversity of mammalian and avian astroviruses. *Viruses* 9, 102. <https://doi.org/10.3390/v9050102>.

- Dowell, S.F. (2001). Seasonal variation in host susceptibility and cycles of certain infectious diseases. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 369–374. <https://doi.org/10.3201/eid0703.017301>.
- Drexler, J.F., Corman, V.M., Wegner, T., Tateno, A.F., Zerbini, R.M., Gloza-Rausch, F., Seebens, A., Müller, M.A., et Drosten, C. (2011). Amplification of emerging viruses in a bat colony. *Emerging Infectious Diseases* 17, 449–456. <https://doi.org/10.3201/eid1703.100526>.
- Drexler, J.F., Corman, V.M., Müller, M.A., Maganga, G.D., Vallo, P., Binger, T., Gloza-Rausch, F., Rasche, A., Yordanov, S., Seebens, A., et al. (2012). Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nature Communications* 3, 796. <https://doi.org/10.1038/ncomms1796>.
- Drexler, J.F., Corman, V.M., et Drosten, C. (2014). Ecology, evolution and classification of bat coronaviruses in the aftermath of SARS. *Antiviral Research* 101, 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.10.013>.
- Duràn, T.G. (2020). En defensa de los murciélagos: resistentes a los virus, pero no a los humanos. <https://es.mongabay.com/2020/03/coronavirus-murcielagos-humanos-virus-covid-19/> consulté le 20/02/2022.
- Eckerle, I., Ehlen, L., Kallies, R., Wollny, R., Corman, V.M., Cottontail, V.M., Tschapka, M., Oppong, S., Drosten, C., et Müller, M.A. (2014). Bat airway epithelial cells: A novel tool for the study of zoonotic viruses. *PLoS ONE* 9, e84679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084679>.
- Erickson, J.L., et West, S.D. (2002). The influence of regional climate and nightly weather conditions on activity patterns of insectivorous bats. *Acta Chiropterologica* 4, 17–24. <https://doi.org/10.3161/001.004.0103>.
- Etienne, L., et Peeters, M. (2010). Origine du VIH, une réussite émergente. *Virologie* 14, 171–184. <https://doi.org/10.1684/vir.2010.0307>.
- European Centre for Disease Prevention and Control (2021). MERS-CoV worldwide overview. <https://www.ecdc.europa.eu/en/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-mers-cov-situation-update> consulté le 06/10/2021.

Ezenwa, V.O. (2016). Helminth-microparasite co-infection in wildlife: Lessons from ruminants, rodents and rabbits. *Parasite Immunology* 38, 527–534. <https://doi.org/10.1111/pim.12348>.

Ezenwa, V.O., Jolles, A.E., Beechler, B.R., Budischak, S.A., et Gorsich, E.E. (2019). The cause and consequences of parasite interactions: African buffalo as a case study (Cambridge University Press).

Fan, Y., Zhao, K., Shi, Z.-L., et Zhou, P. (2019). Bat coronaviruses in China. *Viruses* 11, 210. <https://doi.org/10.3390/v11030210>.

Festa-Bianchet, M. (1989). Individual differences, parasites, and the costs of reproduction for bighorn ewes (*Ovis canadensis*). *The Journal of Animal Ecology* 58, 785. <https://doi.org/10.2307/5124>.

Field, H., Young, P., Yob, J.M., Mills, J., Hall, L., et Mackenzie, J. (2001). The natural history of Hendra and Nipah viruses. *Microbes and Infection* 3, 307–314. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01384-3](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01384-3).

Fischer, K., Pinho dos Reis, V., et Balkema-Buschmann, A. (2017). Bat astroviruses: Towards understanding the transmission dynamics of a neglected virus family. *Viruses* 9, 34. <https://doi.org/10.3390/v9020034>.

Florens, F.B.V. (2016). Mauritius culls threatened fruit bats. *Nature* 530, 33–33. <https://doi.org/10.1038/530033a>.

Foley, N.M., Hughes, G.M., Huang, Z., Clarke, M., Jebb, D., Whelan, C.V., Petit, E.J., Touzalin, F., Farcy, O., Jones, G., et al. (2018). Growing old, yet staying young: The role of telomeres in bats' exceptional longevity. *Science Advances* 4, eaao0926. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aao0926>.

Food and agriculture organization of the United Nations (2021). MERS-CoV situation update.

http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/mers/situation_update.html
consulté le 06/10/2021.

Fourasté, S. (2019). Utilisation du territoire par la Roussette noire en été austral.

Franceinfo (2020). Coronavirus : La consommation de chauve-souris à Wuhan est-elle à l'origine de l'épidémie en Chine ?

https://www.francetvinfo.fr/sante/maladie/coronavirus/coronavirus-la-consommation-de-chauve-souris-a-wuhan-est-elle-a-l-origine-de-l-epidemie-comme-l-affirment-plusieurs-videos_3803119.html consulté le 14/03/2022.

Fraser, C., Donnelly, C.A., Cauchemez, S., Hanage, W.P., Van Kerkhove, M.D., Hollingsworth, T.D., Griffin, J., Baggaley, R.F., Jenkins, H.E., Lyons, E.J., *et al.* (2009). Pandemic potential of a strain of Influenza A (H1N1): Early findings. *Science* 324, 1557–1561. <https://doi.org/10.1126/science.1176062>.

Frick, W.F., Kingston, T., et Flanders, J. (2020). A review of the major threats and challenges to global bat conservation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1469, 5–25. <https://doi.org/10.1111/nyas.14045>.

Frith, J. (2012). The history of plague - part 1: The three great pandemics. *Journal of military and veterans' health* 20, 11–16. <https://search.informit.org/doi/10.3316/informit.722091776908373>.

Ge, X.-Y., Li, J.-L., Yang, X.-L., Chmura, A.A., Zhu, G., Epstein, J.H., Mazet, J.K., Hu, B., Zhang, W., Peng, C., *et al.* (2013). Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature* 503, 535–538. <https://doi.org/10.1038/nature12711>.

Gentles, A.D., Guth, S., Rozins, C., et Brook, C.E. (2020). A review of mechanistic models of viral dynamics in bat reservoirs for zoonotic disease. *Pathogens and Global Health* 114, 407–425. <https://doi.org/10.1080/20477724.2020.1833161>.

George, D.B., Webb, C.T., Farnsworth, M.L., O'Shea, T.J., Bowen, R.A., Smith, D.L., Stanley, T.R., Ellison, L.E., et Rupprecht, C.E. (2011). Host and viral ecology determine bat rabies seasonality and maintenance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 10208–10213. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010875108>.

Gibson, L., Lynam, A.J., Bradshaw, C.J.A., He, F., Bickford, D.P., Woodruff, D.S., Bumrungsri, S., et Laurance, W.F. (2013). Near-complete extinction of native small mammal fauna 25 years after forest fragmentation. *Science* 341, 1508–1510. <https://doi.org/10.1126/science.1240495>.

Goodman, S.M. (2011). Les chauves-souris de Madagascar (Association Vahatra, Antananarivo, Madagascar).

Goodman, S.M., et Benstead, J.P. (2005). Updated estimates of biotic diversity and endemism for Madagascar. *Oryx* 39, 73–77. <https://doi.org/10.1017/S0030605305000128>.

Goodman, S.M., et Ramasindrazana, B. (2015). Description of a new species of the *Miniopterus aelleni* group (Chiroptera: Miniopteridae) from upland areas of central and northern Madagascar. *Zootaxa* 3936, 538. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3936.4.4>.

Goodman, S.M., Ramasindrazana, B., et Schoeman, C.M. (Sous presse). The bats of Madagascar. In *The New Natural History of Madagascar* (Princeton: Princeton University Press.).

Goodman, S.M., Van Vuuren, B.J., Ratrimomanarivo, F., Probst, J.-M., et Bowie, R.C.K. (2008). Specific status of populations in the Mascarene Islands referred to *Mormopterus acetabulosus* (Chiroptera: Molossidae), with description of a new species. *Journal of Mammalogy* 89, 1316–1327. <https://doi.org/10.1644/07-MAMM-A-232.1>.

Goodman, S.M., Weyeneth, N., Ibrahim, Y., Saïd, I., et Ruedi, M. (2010). A review of the bat fauna of the comoro archipelago. *Acta Chiropterologica* 12, 117–141. <https://doi.org/10.3161/150811010X504635>.

Goodman, S.M., Ramasindrazana, B., Maminirina, C.P., Schoeman, M.C., et Appleton, B. (2011). Morphological, bioacoustical, and genetic variation in *Miniopterus* bats from Eastern Madagascar, with the description of a new species. *Zootaxa* 2880, 1. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2880.1.1>.

Goodman, S.M., Taylor, P.J., Ratrimomanarivo, F., et Hooper, S.R. (2012a). The genus *Neoromicia* (Family Vespertilionidae) in Madagascar, with the description of a new species. *Zootaxa* 3250, 1. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3250.1.1>.

Goodman, S.M., Puechmaille, Sé.J., Friedli-Weyeneth, N., Gerlach, J., Ruedi, M., Schoeman, M.C., Stanley, W.T., et Teeling, E.C. (2012b). Phylogeny of the *Emballonurini* (Emballonuridae) with descriptions of a new genus and species from Madagascar. *J Mammal* 93, 1440–1455. <https://doi.org/10.1644/11-MAMM-A-271.1>.

Goodman, S.M., Raherilalao, M.J., Rakotondratsimba, H.M., et Razafimpahanana, M. (2013). *Atlas d'une sélection de vertébrés terrestres de Madagascar* (Antananarivo: Association Vahatra).

Goodman, S.M., Rakotondramanana, C.F., Ramasindrazana, B., Kearney, T., Monadjem, A., Schoeman, M.C., Taylor, P.J., Naughton, K., et 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*: Characterization of Malagasy vesper bats. *Zool J Linn Soc* 173, 988–1018. <https://doi.org/10.1111/zoj.12223>.

Goodman, S.M., Schoeman, M.C., Rakotoarivelo, A., et Willows-Munro, S. (2016). How many species of *Hipposideros* have occurred on Madagascar since the late Pleistocene?: Systematics of Malagasy *Hipposideros*. *Zool J Linn Soc* 177, 428–449. <https://doi.org/10.1111/zoj.12368>.

Goyal, Y. (2020). More than 150 bats killed in Rajasthan owing to fear of COVID-19 spread. <https://www.tribuneindia.com/news/nation/more-than-150-batskilled-in-rajasthan-owing-to-fear-of-covid-19-spread>
[81668?fbclid=IwAR0WcG8b_EIRVDOJCYTi_jmVNiFrCduH_JRzNVUu_2_EBmLI51L_TJxQ9IbY](https://www.tribuneindia.com/news/nation/more-than-150-batskilled-in-rajasthan-owing-to-fear-of-covid-19-spread) consulté le 10/02/2022.

Graham, R.L., et Baric, R.S. (2010). Recombination, reservoirs, and the modular spike: Mechanisms of coronavirus cross-species transmission. *J Virol* 84, 3134–3146. <https://doi.org/10.1128/JVI.01394-09>.

Graham, A.L., Cattadori, I.M., Lloyd-Smith, J.O., Ferrari, M.J., et Bjørnstad, O.N. (2007). Transmission consequences of coinfection: cytokines writ large? *Trends in Parasitology* 23, 284–291. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.04.005>.

Gremillion-Smith, C., et Woolf, A. (1988). Epizootiology of skunk rabies in North America. *Journal of Wildlife Diseases* 24, 620–626. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-24.4.620>.

Halpin, K., Young, P.L., Field, H.E., et Mackenzie, J.S. (2000). Isolation of Hendra virus from Pteropid bats: A natural reservoir of Hendra virus. *Journal of General Virology* 81, 1927–1932. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-8-1927>.

Han, H.-J., Wen, H., Zhou, C.-M., Chen, F.-F., Luo, L.-M., Liu, J., et Yu, X.-J. (2015). Bats as reservoirs of severe emerging infectious diseases. *Virus Research* 205, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.05.006>.

Hayman, D.T.S., Bowen, R.A., Cryan, P.M., McCracken, G.F., O’Shea, T.J., Peel, A.J., Gilbert, A., Webb, C.T., et Wood, J.L.N. (2013). Ecology of zoonotic infectious diseases in bats: Current knowledge and future directions. *Zoonoses and Public Health* 60, 2–21. <https://doi.org/10.1111/zph.12000>.

He, B., Li, Z., Yang, F., Zheng, J., Feng, Y., Guo, H., Li, Y., Wang, Y., Su, N., Zhang, F., *et al.* (2013). Virome profiling of bats from Myanmar by metagenomic analysis of tissue samples reveals more novel mammalian viruses. *PLoS ONE* 8, e61950. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061950>.

Heesterbeek, H., Anderson, R.M., Andreasen, V., Bansal, S., De Angelis, D., Dye, C., Eames, K.T.D., Edmunds, W.J., Frost, S.D.W., Funk, S., *et al.* (2015). Modeling infectious disease dynamics in the complex landscape of global health. *Science* 347, aaa4339. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4339>.

Hellard, E., Fouchet, D., Vavre, F., et Pontier, D. (2015). Parasite–parasite interactions in the wild: How to detect them? *Trends in Parasitology* 31, 640–652. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.07.005>.

Henderson, D.A. (2011). The eradication of smallpox – An overview of the past, present, and future. *Vaccine* 29, D7–D9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.06.080>.

Hermida Lorenzo, R.J., Cadar, D., Koundouno, F.R., Juste, J., Bialonski, A., Baum, H., García-Mudarra, J.L., Hakamaki, H., Bencsik, A., Nelson, E.V., *et al.* (2021). Metagenomic snapshots of viral components in Guinean bats. *Microorganisms* 9, 599. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030599>.

Hernández-Aguilar, I., Lorenzo, C., Santos-Moreno, A., Naranjo, E.J., et Navarrete-Gutiérrez, D. (2021). Coronaviruses in bats: A review for the Americas. *Viruses* 13, 1226. <https://doi.org/10.3390/v13071226>.

Hillgarth, N., et Wingfield, J.C. (1997). Testosterone and immunosuppression in vertebrates: Implications for parasite-mediated sexual selection. Dans *Parasites and Pathogens: Effects on host hormones and behavior* (Boston, MA: Springer US), 143–155.

Hoarau, A.O.G., Andriamandimby, S.F., Joffrin, L., Brook, C.E., Rabemananjara, H.A., Filippone, C., Wilkinson, D.A., Héraud, J.-M., et Lebarbenchon, C. (Sous presse). *Virus*

transmission in mammalian hosts. Dans *The new natural history of Madagascar* (Princeton: Princeton University Press).

Hoarau, A.O.G., Köster, M., Dietrich, M., Le Minter, G., Joffrin, L., Ramanantsalama, R.V., Mavingui, P., et Lebarbenchon, C. (En préparation). Bat virus on a tropical island: Shedding dynamics and co-infections in maternity colonies.

Hoarau, A.O.G., Mavingui, P., et Lebarbenchon, C. (2020). Coinfections in wildlife: Focus on a neglected aspect of infectious disease epidemiology. *PLOS Pathogens* 16, e1008790. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008790>.

Hoarau, F., Le Minter, G., Joffrin, L., Schoeman, C.M., Lagadec, E., Ramasindrazana, B., Dos Santos, A., Goodman, S.M., Gudo, E.S., Mavingui, P., *et al.* (2018). Bat astrovirus in Mozambique. *Virology Journal* 15,4. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-1011-x>.

Holmes, E.C. (2010). The comparative genomics of viral emergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 1742–1746. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906193106>.

Holmes, Edward C, Goldstein, Stephen A, Rasmussen, Angela L, Robertson, David L, Crits-Christoph, Alexander, Wertheim, Joel O, Anthony, Simon J, Barclay, Wendy S, Boni, Maciej F, Doherty, Peter C, *et al.* (2021). The Origins of SARS-CoV-2: A critical review. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.5075888>. <https://zenodo.org/record/5075888> consulté le 16/08/2021.

Hood, C.S. (1983). *Ecology of bats*. Plenum Press, New York and London. *Journal of Mammalogy* 64, 549–550. <https://doi.org/10.2307/1380387>.

Hosseini, P.R., Dhondt, A.A., et Dobson, A. (2004). Seasonality and wildlife disease: How seasonal birth, aggregation and variation in immunity affect the dynamics of *Mycoplasma gallisepticum* in house finches. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 271, 2569–2577. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2938>.

Hoyt, J.R., Kilpatrick, A.M., et Langwig, K.E. (2021). Ecology and impacts of white-nose syndrome on bats. *Nat Rev Microbiol* 19, 196–210. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00493-5>.

Iehlé, C., Razafitrimo, G., Razainirina, J., Andriaholinirina, N., Goodman, S.M., Faure, C., Georges-Courbot, M.-C., Rousset, D., et Reynes, J.-M. (2007). Henipavirus and Tioman virus antibodies in Pteropodid bats, Madagascar. *Emerging Infectious Diseases* 13, 159–161. <https://doi.org/10.3201/eid1301.060791>.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (2021). <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>.

International Union for Conservation of Nature (IUCN) (2021). The IUCN Red List of Threatened Species. <https://www.iucnredlist.org/en>.

Jenkins, R., et Racey, P. (2009). Bats as bushmeat in Madagascar. *Madagascar Conservation & Development* 3(1), 22-30. <https://doi.org/10.4314/mcd.v3i1.44132>.

Jenkins, R.K.B., Tatayah, V., et Racey, P.A. (2008). *Pteropus niger* (IUCN Red List of Threatened Species).

Jeong, J., Smith, C.S., Peel, A.J., Plowright, R.K., Kerlin, D.H., Mccbroom, J., et Mccallum, H. (2017). Persistent infections support maintenance of a coronavirus in a population of Australian bats (*Myotis macropus*). *Epidemiol. Infect.* 145, 2053–2061. <https://doi.org/10.1017/S0950268817000991>.

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

Joffrin, L., Goodman, S.M., Wilkinson, D.A., Ramasindrazana, B., Lagadec, E., Gomard, Y., Le Minter, G., Dos Santos, A., Corrie Schoeman, M., Sookhareea, R., et al. (2020). Bat coronavirus phylogeography in the Western Indian Ocean. *Scientific Reports* 10, 6873. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63799-7>.

Joffrin, L., Hoarau, A.O.G., Lagadec, E., Köster, M., Ramanantsalama, R.V., Mavingui, P., et Lebarbenchon, C. (2021). Astrovirus in Reunion free-tailed bat (*Mormopterus francoismoutou*). *Viruses* 13, 1524. <https://doi.org/10.3390/v13081524>.

Joffrin, L., Hoarau, A.O.G., Lagadec, E., Torrontegi, O., Le Minter, G., Dietrich, M., Mavingui, P., et Lebarbenchon, C. (2022). Seasonality of coronavirus shedding in tropical bats. *R. Soc. Open Sci.* 9, 211600. <https://doi.org/10.1098/rsos.211600>.

Johnson, N.P.A.S., et Mueller, J. (2002). Updating the accounts: Global mortality of the 1918-1920 “Spanish” Influenza pandemic. *Bulletin of the History of Medicine* 76, 105–115. <https://doi.org/10.1353/bhm.2002.0022>.

Johnson, C.K., Hitchens, P.L., Pandit, P.S., Rushmore, J., Evans, T.S., Young, C.C.W., et Doyle, M.M. (2020). Global shifts in mammalian population trends reveal key predictors of virus spillover risk. *Proc. R. Soc. B.* 287, 20192736. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.2736>.

Jolles, A.E., Ezenwa, V.O., Etienne, R.S., Turner, W.C., et Olf, H. (2008). Interactions between macroparasites and microparasites drive infection patterns in free-ranging African buffalo. *Ecology* 89, 2239–2250. <https://doi.org/10.1890/07-0995.1>.

Jones, G., Jacobs, D., Kunz, T., Willig, M., et Racey, P. (2009). Carpe noctem: The importance of bats as bioindicators. *Endangered Species Research* 8, 93–115. <https://doi.org/10.3354/esr00182>.

Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., et Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990–993. <https://doi.org/10.1038/nature06536>.

Kasso, M., et Balakrishnan, M. (2013). Ecological and economic importance of bats (Order Chiroptera). *ISRN Biodiversity 2013*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2013/187415>.

Kaufman, E. (2020). Two (or more) viruses in one bat: A systematic quantitative literature review of viral coinfection in bats (Independent Study Project (ISP)). https://digitalcollections.sit.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=4369&context=isp_collecti
[on](https://digitalcollections.sit.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=4369&context=isp_collecti).

Keck, J.G., Matsushima, G.K., Makino, S., Fleming, J.O., Vannier, D.M., Stohlman, S.A., et Lai, M.M. (1988). In vivo RNA-RNA recombination of coronavirus in mouse brain. *J Virol* 62, 1810–1813. <https://doi.org/10.1128/jvi.62.5.1810-1813.1988>.

Keeling, M.J., et Rohani, P. (2011). *Modeling Infectious Diseases in Humans and Animals* (Princeton University Press).

Keeling, M.J., Woolhouse, M.E.J., Shaw, D.J., Matthews, L., Chase-Topping, M., Haydon, D.T., Cornell, S.J., Kappey, J., Wilesmith, J., et Grenfell, B.T. (2001). Dynamics of the 2001 UK foot and mouth epidemic: Stochastic dispersal in a

heterogeneous landscape. *Science* 294, 813–817.
<https://doi.org/10.1126/science.1065973>.

Keesing, F., Belden, L.K., Daszak, P., Dobson, A., Harvell, C.D., Holt, R.D., Hudson, P., Jolles, A., Jones, K.E., Mitchell, C.E., *et al.* (2010). Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature* 468, 647–652.
<https://doi.org/10.1038/nature09575>.

Kingston, T., Florens, F.B.V., Oleksy, R.Z., Ruhomaun, K., et Tatayah, V. (2017). *Pteropus niger*. The IUCN Red List of Threatened Species 2018 (International Union for Conservation of Nature).

Klein, S. (1999). Influence of social factors on immune function and reproduction. *Reviews of Reproduction* 4, 168–178. <https://doi.org/10.1530/ror.0.0040168>.

Kohl, C., Brinkmann, A., Radonić, A., Dabrowski, P.W., Mühlendorfer, K., Nitsche, A., Wibbelt, G., et Kurth, A. (2021). The virome of German bats: comparing virus discovery approaches. *Sci Rep* 11, 7430. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86435-4>.

Kunz, T.H., Braun de Torrez, E., Bauer, D., Lobova, T., et Fleming, T.H. (2011). Ecosystem services provided by bats. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1223, 1–38. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06004.x>.

Lai, M.M., Baric, R.S., Makino, S., Keck, J.G., Egbert, J., Leibowitz, J.L., et Stohlman, S.A. (1985). Recombination between nonsegmented RNA genomes of murine coronaviruses. *J Virol* 56, 449–456. <https://doi.org/10.1128/jvi.56.2.449-456.1985>.

Lass, S., Hudson, P.J., Thakar, J., Saric, J., Harvill, E., Albert, R., et Perkins, S.E. (2012). Generating super-shedders: Co-infection increases bacterial load and egg production of a gastrointestinal helminth. *Journal of The Royal Society Interface* 10, 20120588–20120588. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0588>.

Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., Li, K.S.M., Huang, Y., Tsoi, H.-W., Wong, B.H.L., Wong, S.S.Y., Leung, S.-Y., Chan, K.-H., et Yuen, K.-Y. (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 14040–14045.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0506735102>.

Lebarbenchon, C., Ramasindrazana, B., Joffrin, L., Bos, S., Lagadec, E., Le Minter, G., Gomard, Y., Tortosa, P., Wilkinson, D.A., Goodman, S.M., *et al.* (2017). Astroviruses in bats, Madagascar. *Emerging Microbes & Infections* 6, 1–3. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.47>.

Lentini, P., Peel, A.J., Field, H.E., et Welbergen, J.A. (2020). No, Aussie bats won't give you COVID-19. We rely on them more than you think. <https://theconversation.com/no-aussie-bats-wont-give-you-covid-19-we-rely-on-them-more-than-you-think-137168> consulté le 10/12/2021.

Leroy, E.M., Kumulungui, B., Pourrut, X., Rouquet, P., Hassanin, A., Yaba, P., Délicat, A., Paweska, J.T., Gonzalez, J.-P., et Swanepoel, R. (2005). Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* 438, 575–576. <https://doi.org/10.1038/438575a>.

Leroy, E.M., Epelboin, A., Mondonge, V., Pourrut, X., Gonzalez, J.-P., Muyembe-Tamfum, J.-J., et Formenty, P. (2009). Human Ebola outbreak resulting from direct exposure to fruit bats in Luebo, Democratic Republic of Congo, 2007. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 9, 723–728. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0167>.

Lessler, J., et Cummings, D.A.T. (2016). Mechanistic models of infectious disease and their impact on public health. *Am. J. Epidemiol.* 183, 415–422. <https://doi.org/10.1093/aje/kww021>.

Li, H., Mendelsohn, E., Zong, C., Zhang, W., Hagan, E., Wang, N., Li, S., Yan, H., Huang, H., Zhu, G., *et al.* (2019). Human-animal interactions and bat coronavirus spillover potential among rural residents in Southern China. *Biosafety and Health* 1, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2019.10.004>.

Li, L., Victoria, J.G., Wang, C., Jones, M., Fellers, G.M., Kunz, T.H., et Delwart, E. (2010). Bat Guano Virome: Predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses. *Journal of Virology* 84, 6955–6965. <https://doi.org/10.1128/JVI.00501-10>.

Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J.H., Wang, H., Crameri, G., Hu, Z., Zhang, H., *et al.* (2005). Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* 310, 5. <https://doi.org/10.1126/science.1118391>.

Lloyd-Smith, J.O., George, D., Pepin, K.M., Pitzer, V.E., Pulliam, J.R.C., Dobson, A.P., Hudson, P.J., et Grenfell, B.T. (2009). Epidemic dynamics at the human-animal interface. *Science* 326, 1362–1367. <https://doi.org/10.1126/science.1177345>.

Longdon, B., Brockhurst, M.A., Russell, C.A., Welch, J.J., et Jiggins, F.M. (2014). The evolution and genetics of virus host shifts. *PLoS Pathog* 10, e1004395. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004395>.

López-Baucells, A., Rocha, R., et Fernández-Llamazares, Á. (2018). When bats go viral: Negative framings in virological research imperil bat conservation. *Mammal Review* 48, 62–66. <https://doi.org/10.1111/mam.12110>.

Lord, J.S., Parker, S., Parker, F., et Brooks, D.R. (2012). Gastrointestinal helminths of pipistrelle bats (*Pipistrellus pipistrellus*/*Pipistrellus pygmaeus*) (Chiroptera: Vespertilionidae) of England. *Parasitology* 139, 366–374. <https://doi.org/10.1017/S0031182011002046>.

Louette, M., Meirte, D., Jocqué, R., et Musée royal de l’Afrique centrale (2004). La faune terrestre de l’archipel des Comores (Tervuren: Musée royal de l’Afrique centrale).

Luby, S., Rahman, M., Hossain, M., Blum, L., Husain, M., Gurley, E., Khan, R., Ahmed, B.-N., Rahman, S., Nahar, N., et al. (2006). Foodborne transmission of Nipah Virus, Bangladesh. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1888–1894. <https://doi.org/10.3201/eid1212.060732>.

Luis, A.D., Hayman, D.T.S., O’Shea, T.J., Cryan, P.M., Gilbert, A.T., Pulliam, J.R.C., Mills, J.N., Timonin, M.E., Willis, C.K.R., Cunningham, A.A., et al. (2013). A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: Are bats special? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280, 20122753. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2753>.

Lunney, D., et Moon, D. (2011). Traditional prejudices and today’s bad press render bats invisible to public consciousness. Dans *Biology and Conservation of Australasian Bats* (Mosman, Australia: Royal Zoological Society of New South Wales), 44–63.

McCracken, G.F. (1989). Cave conservation: Special problems of bats. *Bulletin of the National Speleological Society* 49–51.

- Mélade, J., Wieseke, N., Ramasindrazana, B., Flores, O., Lagadec, E., Gomard, Y., Goodman, S.M., Dellagi, K., et Pascalis, H. (2016a). An eco-epidemiological study of *Morbilli*-related paramyxovirus infection in Madagascar bats reveals host-switching as the dominant macro-evolutionary mechanism. *Scientific Reports* 6, 23752. <https://doi.org/10.1038/srep23752>.
- Mélade, J., McCulloch, S., Ramasindrazana, B., Lagadec, E., Turpin, M., Pascalis, H., Goodman, S.M., Markotter, W., et Dellagi, K. (2016b). Serological evidence of lyssaviruses among bats on Southwestern Indian Ocean islands. *PLOS ONE* 11, e0160553. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160553>.
- Mendenhall, I.H., Smith, G.J.D., et Vijaykrishna, D. (2015). Ecological drivers of virus evolution: Astrovirus as a case study. *Journal of Virology* 89, 6978–6981. <https://doi.org/10.1128/JVI.02971-14>.
- Mendez, E., et Arias, C.F. (2007). Astroviruses. Dans *Fields Virology*, (Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins), 981–1000.
- Metcalf, C.J.E., et Lessler, J. (2017). Opportunities and challenges in modeling emerging infectious diseases. *Science* 357, 149–152. <https://doi.org/10.1126/science.aam8335>.
- Meyer, C.T., Bauer, I.K., Antonio, M., Adeyemi, M., Saha, D., Oundo, J.O., Ochieng, J.B., Omere, R., Stine, O.C., Wang, D., *et al.* (2015). Prevalence of classic, MLB-clade and VA-clade astroviruses in Kenya and the Gambia. *Virology Journal* 12, 78. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0299-z>.
- Mickleburgh, S.P., Hutson, A.M., et Racey, P.A. (2002). A review of the global conservation status of bats. *Oryx* 36, 18–34. <https://doi.org/10.1017/S0030605302000054>.
- Moat, J., et Smith, P.P. (2007). *Atlas of the vegetation of Madagascar* (Kew: Kew publ., Royal botanic gardens).
- Mollentze, N., et Streicker, D.G. (2020). Viral zoonotic risk is homogenous among taxonomic orders of mammalian and avian reservoir hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117, 9423–9430. <https://doi.org/10.1073/pnas.1919176117>.

- Monadjem, A., Schoeman, M.C., Reside, A., Pio, D.V., Stoffberg, S., Bayliss, J., (Woody) Cotterill, F.P.D., Curran, M., Kopp, M., et Taylor, P.J. (2010). A recent inventory of the bats of Mozambique with documentation of seven new species for the country. *Acta Chiropterologica* 12, 371–391. <https://doi.org/10.3161/150811010X537963>.
- Moratelli, R., et Calisher, C.H. (2015). Bats and zoonotic viruses: Can we confidently link bats with emerging deadly viruses? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 1–22. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150048>.
- Moreno, J., Sanz, J., Merino, S., et Arriero, E. (2001). Daily energy expenditure and cell-mediated immunity in pied flycatchers while feeding nestlings: Interaction with moult. *Oecologia* 129, 492–497. <https://doi.org/10.1007/s004420100767>.
- Morens, D.M., et Fauci, A.S. (2012). Emerging infectious diseases in 2012: 20 Years after the institute of medicine report. *MBio* 3(6). <https://doi.org/10.1128/mBio.00494-12>.
- Morens, D.M., Folkers, G.K., et Fauci, A.S. (2004). The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature* 430, 242–249. <https://doi.org/10.1038/nature02759>.
- Morse, S.S. (1995). Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases* 1, 7–15. <https://dx.doi.org/10.3201/eid0101.950102>.
- Morse, S.S., Mazet, J.A., Woolhouse, M., Parrish, C.R., Carroll, D., Karesh, W.B., Zambrana-Torrel, C., Lipkin, W.I., et Daszak, P. (2012). Prediction and prevention of the next pandemic zoonosis. *The Lancet* 380, 1956–1965. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61684-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61684-5).
- Moutou, F. (1982). Note sur les chiroptères de l'île de la Réunion (Océan Indien). *Mammalia* 46(1), 35-52. <https://doi.org/10.1515/mamm.1982.46.1.35>.
- Murcia, C. (1995). Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 10, 58–62. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)88977-6](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)88977-6).

Murray, K., Selleck, P., Hooper, P., Hyatt, A., Gould, A., Gleeson, L., Westbury, H., Hiley, L., Selvey, L., et Rodwell, B. (1995). A *Morbillivirus* that caused fatal disease in horses and humans. *Science* 268, 94–97. <https://doi.org/10.1126/science.7701348>.

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B., et Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853–858. <https://doi.org/10.1038/35002501>.

National Institute of Allergies and Infectious Diseases (2017). Global examples of emerging and re-emerging infectious diseases. <https://www.niaid.nih.gov/newsevents/three-decades-responding-infectious-disease-outbreaks> consulté le 10/12/2021.

Nougier, J., Cantagrel, J.M., et Karche, J.P. (1986). The Comores archipelago in the Western Indian Ocean: Volcanology, geochronology and geodynamic setting. *Journal of African Earth Sciences* (1983) 5, 135–145. [https://doi.org/10.1016/0899-5362\(86\)90003-5](https://doi.org/10.1016/0899-5362(86)90003-5).

Nyhagen, D.F., Turnbull, S.D., Olesen, J.M., et Jones, C.G. (2005). An investigation into the role of the Mauritian flying fox, *Pteropus niger*, in forest regeneration. *Biological Conservation* 122, 491–497. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2004.08.012>.

O'Brien, J. (2011). Bats of the Western Indian Ocean Islands. *Animals* 1, 259–290. <https://doi.org/10.3390/ani1030259>.

Oleksy, R.Z., Ayady, C.L., Tatayah, V., Jones, C., Froidevaux, J.S.P., Racey, P.A., et Jones, G. (2021). The impact of the endangered Mauritian flying fox *Pteropus niger* on commercial fruit farms and the efficacy of mitigation. *Oryx* 55, 114–121. <https://doi.org/10.1017/S0030605318001138>.

Olival, K.J. (2016). To cull, or not to cull, bat is the question. *EcoHealth* 13, 6–8. <https://doi.org/10.1007/s10393-015-1075-7>.

Olival, K., et Hayman, D. (2014). Filoviruses in bats: Current knowledge and future directions. *Viruses* 6, 1759–1788. <https://doi.org/10.3390/v6041759>.

Ong, K.C., et Wong, K.T. (2015). Henipavirus encephalitis: Recent developments and advances: Update on Henipavirus encephalitis. *Brain Pathology* 25, 605–613. <https://doi.org/10.1111/bpa.12278>.

- O'Shea, T.J., Cryan, P.M., Cunningham, A.A., Fooks, A.R., Hayman, D.T.S., Luis, A.D., Peel, A.J., Plowright, R.K., et Wood, J.L.N. (2014). Bat flight and zoonotic viruses. *Emerging Infectious Diseases* 20, 741–745. <https://doi.org/10.3201/eid2005.130539>.
- O'Shea, T.J., Cryan, P.M., Hayman, D.T.S., Plowright, R.K., et Streicker, D.G. (2016). Multiple mortality events in bats: A global review: Multiple mortality events in bats. *Mammal Review* 46, 175–190. <https://doi.org/10.1111/mam.12064>.
- Parrish, C.R., Holmes, E.C., Morens, D.M., Park, E.-C., Burke, D.S., Calisher, C.H., Laughlin, C.A., Saif, L.J., et Daszak, P. (2008). Cross-species virus transmission and the emergence of new epidemic diseases. *Microbiol Mol Biol Rev* 72, 457–470. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00004-08>.
- Paweska, J., Storm, N., Grobbelaar, A., Markotter, W., Kemp, A., et Jansen van Vuren, P. (2016). Experimental inoculation of Egyptian fruit bats (*Rousettus aegyptiacus*) with Ebola virus. *Viruses* 8, 29. <https://doi.org/10.3390/v8020029>.
- Pedersen, A.B., et Fenton, A. (2007). Emphasizing the ecology in parasite community ecology. *Trends in Ecology & Evolution* 22, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.005>.
- Peel, A.J., Pulliam, J.R.C., Luis, A.D., Plowright, R.K., O'Shea, T.J., Hayman, D.T.S., Wood, J.L.N., Webb, C.T., et Restif, O. (2014). The effect of seasonal birth pulses on pathogen persistence in wild mammal populations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281, 20132962. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2962>.
- Peel, A.J., Field, H.E., Aravena, M.R., Edson, D., McCallum, H., Plowright, R.K., et Prada, D. (2019a). Coronaviruses and Australian bats: A review in the midst of a pandemic. *Aust. J. Zool.* 67, 346. <https://doi.org/10.1071/ZO20046>.
- Peel, A.J., Wells, K., Giles, J., Boyd, V., Burroughs, A., Edson, D., Cramer, G., Baker, M.L., Field, H., Wang, L.-F., et al. (2019b). Synchronous shedding of multiple bat paramyxoviruses coincides with peak periods of Hendra virus spillover. *Emerging Microbes & Infections* 8, 1314–1323. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1661217>.
- Petney, T.N., et Andrews, R.H. (1998). Multiparasite communities in animals and humans: Frequency, structure and pathogenic significance. *International Journal for Parasitology* 28, 377–393. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(97\)00189-6](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00189-6).

Phillips, M.A., Burrows, J.N., Manyando, C., van Huijsduijnen, R.H., Van Voorhis, W.C., et Wells, T.N.C. (2017). Malaria. *Nat Rev Dis Primers* 3, 17050. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.50>.

Plowright, R.K., Field, H.E., Smith, C., Divljan, A., Palmer, C., Tabor, G., Daszak, P., et Foley, J.E. (2008). Reproduction and nutritional stress are risk factors for Hendra virus infection in little red flying foxes (*Pteropus scapulatus*). *Proc. R. Soc. B.* 275, 861–869. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1260>.

Plowright, R.K., Foley, P., Field, H.E., Dobson, A.P., Foley, J.E., Eby, P., et Daszak, P. (2011). Urban habituation, ecological connectivity and epidemic dampening: The emergence of Hendra virus from flying foxes (*Pteropus* spp.). *Proc Biol Sci* 278, 3703–3712. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0522>.

Plowright, R.K., Eby, P., Hudson, P.J., Smith, I.L., Westcott, D., Bryden, W.L., Middleton, D., Reid, P.A., McFarlane, R.A., Martin, G., et al. (2014). Ecological dynamics of emerging bat virus spillover. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282, 20142124–20142124. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2124>.

Plowright, R.K., Peel, A.J., Streicker, D.G., Gilbert, A.T., McCallum, H., Wood, J., Baker, M.L., et Restif, O. (2016). Transmission or within-host dynamics driving pulses of zoonotic viruses in reservoir–host populations. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 10, e0004796. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004796>.

Plowright, R.K., Parrish, C.R., McCallum, H., Hudson, P.J., Ko, A.I., Graham, A.L., et Lloyd-Smith, J.O. (2017). Pathways to zoonotic spillover. *Nature Reviews Microbiology* 15, 502–510. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.45>.

Podlutzky, A.J., Khritankov, A.M., Ovodov, N.D., et Austad, S.N. (2005). A new field record for bat longevity. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 60, 1366–1368. <https://doi.org/10.1093/gerona/60.11.1366>.

Pons-Salort, M., Serra-Cobo, J., Jay, F., López-Roig, M., Lavenir, R., Guillemot, D., Letort, V., Bourhy, H., et Opatowski, L. (2014). Insights into persistence mechanisms of a zoonotic virus in bat colonies using a multispecies metapopulation model. *PLoS ONE* 9, e95610. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095610>.

Porter, R. (1999). *The greatest benefit to mankind: A medical history of humanity* (New York: W.W. Norton).

Pyrce, K., Dijkman, R., Deng, L., Jebbink, M.F., Ross, H.A., Berkhout, B., et van der Hoek, L. (2006). Mosaic structure of human coronavirus NL63, one thousand years of evolution. *Journal of Molecular Biology* 364, 964–973. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.09.074>.

Radolf, J.D., Caimano, M.J., Stevenson, B., et Hu, L.T. (2012). Of ticks, mice and men: Understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nat Rev Microbiol* 10, 87–99. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2714>.

Rahman, M.A., Hossain, M.J., Sultana, S., Homaira, N., Khan, S.U., Rahman, M., Gurley, E.S., Rollin, P.E., Lo, M.K., Comer, J.A., et al. (2012). Date palm sap linked to Nipah virus outbreak in Bangladesh, 2008. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 12, 65–72. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0656>.

Rasmussen, A.L. (2021). On the origins of SARS-CoV-2. *Nat Med* 27, 9. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-01205-5>.

Razanajatovo, N.H., Nomenjanahary, L.A., Wilkinson, D.A., Razafimanahaka, J.H., Goodman, S.M., Jenkins, R.K., Jones, J.P., et Heraud, J.-M. (2015). Detection of new genetic variants of *betacoronaviruses* in endemic frugivorous bats of Madagascar. *Virology Journal* 12, 42. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0271-y>.

Razzauti, M., Galan, M., Bernard, M., Maman, S., Klopp, C., Charbonnel, N., Vayssier-Taussat, M., Eloit, M., et Cosson, J.-F. (2015). A Comparison between transcriptome sequencing and 16S metagenomics for detection of bacterial pathogens in wildlife. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 9, e0003929. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003929>.

Reindel, R., et Fiore, C.R. (2017). Phage therapy: Considerations and challenges for development. *Clinical Infectious Diseases* 64, 1589–1590. <https://doi.org/10.1093/cid/cix188>.

Reusken, C.B., Farag, E.A., Jonges, M., Godeke, G.J., El-Sayed, A.M., Pas, S.D., Raj, V.S., Mohran, K.A., Moussa, H.A., Ghobashy, H., et al. (2014). Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) RNA and neutralising antibodies in milk collected

according to local customs from dromedary camels, Qatar, April 2014. Euro Surveill. 19. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.23.20829>.

Reynes, J.-M., Andriamandimby, S.F., Razafitrimo, G.M., Razainirina, J., Jeanmaire, E.M., Bourhy, H., et Heraud, J.-M. (2011). Laboratory surveillance of rabies in humans, domestic animals, and bats in Madagascar from 2005 to 2010. *Advances in Preventive Medicine* 2011, 1–6. <https://doi.org/10.4061/2011/727821>.

Rigaud, T., Perrot-Minnot, M.-J., et Brown, M.J.F. (2010). Parasite and host assemblages: Embracing the reality will improve our knowledge of parasite transmission and virulence. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 277, 3693–3702. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1163>.

Rizzo, F., Edenborough, K.M., Toffoli, R., Culasso, P., Zoppi, S., Dondo, A., Robetto, S., Rosati, S., Lander, A., Kurth, A., *et al.* (2017). *Coronavirus and paramyxovirus in bats from Northwest Italy*. *BMC Veterinary Research* 13,396. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1307-x>.

Roberts, B.J., Catterall, C.P., Eby, P., et Kanowski, J. (2012). Latitudinal range shifts in Australian flying-foxes: A re-evaluation: Range shifts in Australian flying-foxes. *Austral Ecology* 37, 12–22. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2011.02243.x>.

Rocha, R., Aziz, S.A., Brook, C.E., Carvalho, W.D., Cooper-Bohannon, R., Frick, W.F., Huang, J.C. -C., Kingston, T., López-Baucells, A., Maas, B., *et al.* (2021). Bat conservation and zoonotic disease risk: A research agenda to prevent misguided persecution in the aftermath of COVID-19. *Anim Conserv* 24, 303–307. <https://doi.org/10.1111/acv.12636>.

Rohani, P., Earn, D.J., Finkenstädt, B., et Grenfell, B.T. (1998). Population dynamic interference among childhood diseases. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265, 2033–2041. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0537>.

Russo, D., Bosso, L., et Ancillotto, L. (2018). Novel perspectives on bat insectivory highlight the value of this ecosystem service in farmland: Research frontiers and management implications. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 266, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.07.024>.

Saif, L.J. (2004). Animal coronaviruses: What can they teach us about the severe acute respiratory syndrome? *Revue Scientifique et Technique de l'OIE* 23, 643–660. <https://doi.org/10.20506/rst.23.2.1513>.

Schipper, J., Chanson, J.S., Chiozza, F., Cox, N.A., Hoffmann, M., Katariya, V., Lamoreux, J., Rodrigues, A.S.L., Stuart, S.N., Temple, H.J., *et al.* (2008). The Status of the world's land and marine mammals: Diversity, threat, and knowledge. *Science* 322, 225–230. <https://doi.org/10.1126/science.1165115>.

Schountz, T., Baker, M.L., Butler, J., *et* Munster, V. (2017). Immunological control of viral infections in bats and the emergence of viruses highly pathogenic to humans. *Front. Immunol.* 8, 1098. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01098>.

Seltmann, A., Corman, V.M., Rasche, A., Drosten, C., Czirják, G.Á., Bernard, H., Struebig, M.J., *et* Voigt, C.C. (2017). Seasonal fluctuations of astrovirus, but not coronavirus shedding in bats inhabiting human-modified tropical forests. *EcoHealth* 14, 272–284. <https://doi.org/10.1007/s10393-017-1245-x>.

Selvey, L.A., Wells, R.M., McCormack, J.G., Ansford, A.J., Murray, K., Rogers, R.J., Lavercombe, P.S., Selleck, P., *et* Sheridan, J.W. (1995). Infection of humans and horses by a newly described morbillivirus. *Medical Journal of Australia* 162, 642–645. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1995.tb126050.x>.

Sheldon, B.C., *et* Verhulst, S. (1996). Ecological immunology: Costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution* 11, 317–321. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10039-2](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10039-2).

Simmons, N.B. (2005). Order Chiroptera. In *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference* (Baltimore: Johns Hopkins University Press), 312–529.

Simmons, N.B. (2019). *Bats of the world: A new taxonomic and geographic database.* (Thailand).

Smith, I., *et* Wang, L.-F. (2013). Bats and their virome: An important source of emerging viruses capable of infecting humans. *Current Opinion in Virology* 3, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.11.006>.

- Smith, C.S., de Jong, C.E., Meers, J., Henning, J., Wang, L.-F., et Field, H.E. (2016). Coronavirus infection and diversity in bats in the Australasian region. *EcoHealth* 13, 72–82. <https://doi.org/10.1007/s10393-016-1116-x>.
- Stapelfeldt, B., Scheuerlein, A., Tress, C., Koch, R., Tress, J., et Kerth, G. (2022). Precipitation during two weeks in spring influences reproductive success of first-year females in the long-lived Natterer's bat. *R. Soc. Open Sci.* 9, 211881. <https://doi.org/10.1098/rsos.211881>.
- Stephens, D.S., Moxon, E.R., Adams, J., Altizer, S., Antonovics, J., Aral, S., Berkelman, R., Bond, E., Bull, J., Cauthen, G., *et al.* (1998). Emerging and reemerging infectious diseases: A multidisciplinary perspective. *The American Journal of the Medical Sciences* 315, 64–75. <https://doi.org/10.1097/00000441-199802000-00002>.
- Strassburg, M.A. (1982). The global eradication of smallpox. *American Journal of Infection Control* 10, 53–59. [https://doi.org/10.1016/0196-6553\(82\)90003-7](https://doi.org/10.1016/0196-6553(82)90003-7).
- Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A.C.K., Zhou, J., Liu, W., Bi, Y., et Gao, G.F. (2016). Epidemiology, Genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. *Trends in Microbiology* 24, 490–502. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.003>.
- Subudhi, S., Rapin, N., et Misra, V. (2019). Immune system modulation and viral persistence in bats: Understanding viral spillover. *Viruses* 11, 192. <https://doi.org/10.3390/v11020192>.
- Swinton, J., Harwood, J., Grenfell, B.T., et Gilligan, C.A. (1998). Persistence thresholds for phocine distemper virus infection in harbour seal *Phoca vitulina* metapopulations. *Journal of Animal Ecology* 67, 54–68. <https://www.jstor.org/stable/2647360>.
- Tamerius, J.D., Shaman, J., Alonso, W.J., Bloom-Feshbach, K., Uejio, C.K., Comrie, A., et Viboud, C. (2013). Environmental predictors of seasonal influenza epidemics across temperate and tropical climates. *PLoS Pathog* 9, e1003194. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003194>.
- Taylor, L.H., Latham, S.M., et Woolhouse, M.E.J. (2001). Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 356, 983–989. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0888>.

Teeling, E.C. (2005). A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. *Science* 307, 580–584. <https://doi.org/10.1126/science.1105113>.

Telfer, S., Lambin, X., Birtles, R., Beldomenico, P., Burthe, S., Paterson, S., et Begon, M. (2010). Species interactions in a parasite community drive infection risk in a wildlife population. *Science* 330, 243–246. <https://doi.org/10.1126/science.1190333>.

Temmam, S., Vongphayloth, K., Salazar, E.B., Munier, S., Bonomi, M., Régnauld, B., Douangboubpha, B., Karami, Y., Chretien, D., Sanamxay, D., et al. (2021). Coronaviruses with a SARS-CoV-2-like receptor-binding domain allowing ACE2-mediated entry into human cells isolated from bats of Indochinese peninsula. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-871965/v1>.

Terraube, J., Fernández-Llamazares, Á., et Cabeza, M. (2017). The role of protected areas in supporting human health: A call to broaden the assessment of conservation outcomes. *Current Opinion in Environmental Sustainability* 25, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2017.08.005>.

Thanawongnuwech, R., Young, T.F., Thacker, B.J., et Thacker, E.L. (2001). Differential production of proinflammatory cytokines: In vitro PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-infection model. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 79, 115–127. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(01\)00243-4](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(01)00243-4).

Thébaud, C., Strasberg, D., Warren, B.H., and Cheke, A. (2019). Mascarene islands, biology. Dans *Encyclopedia of Islands* (University of California Press), 612–619.

Tsang, Y. (2020). Hundreds of bats culled in Indonesia to 'prevent spread' of the coronavirus. <https://www.scmp.com/video/asia/3075441/hundreds-bats-culled-indonesia-prevent-spread-coronavirus> consulté le 10/02/2022.

Turmelle, A.S., Allen, L.C., Jackson, F.R., Kunz, T.H., Rupprecht, C.E., et McCracken, G.F. (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. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0163>.

Vaumourin, E., Vourc'h, G., Gasqui, P., et Vayssier-Taussat, M. (2015). The importance of multiparasitism: Examining the consequences of co-infections for human and animal health. *Parasites & Vectors* 8, 545. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1167-9>.

- Veikkolainen, V., Vesterinen, E.J., Lilley, T.M., et Pulliainen, A.T. (2014). Bats as reservoir hosts of human bacterial pathogen, *Bartonella mayotimonensis*. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 960–967. <https://doi.org/10.3201/eid2006.130956>.
- Verhagen, J.H., Herfst, S., et Fouchier, R.A.M. (2015). How a virus travels the world. *Science* 347, 616–617. <https://doi.org/10.1126/science.aaa6724>.
- Vieilledent, G., Grinand, C., Rakotomalala, F.A., Ranaivosoa, R., Rakotoarijaona, J.-R., Allnut, T.F., et Achard, F. (2018). Combining global tree cover loss data with historical national forest cover maps to look at six decades of deforestation and forest fragmentation in Madagascar. *Biological Conservation* 222, 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.04.008>.
- Vincenot, C.E., Florens, F.B.V., et Kingston, T. (2017). Can we protect island flying foxes? *Science* 355, 1368–1370. <https://doi.org/10.1126/science.aam7582>.
- Voigt, C.C., Schneeberger, K., Voigt-Heucke, S.L., et Lewanzik, D. (2011). Rain increases the energy cost of bat flight. *Biol. Lett.* 7, 793–795. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2011.0313>.
- Voigt, C., et Kingston, T. (2016). Bats in the anthropocene: conservation of bats in a changing world (Cham New York: Springer Open).
- Wacharapluesadee, S., Tan, C.W., Maneern, P., Duengkae, P., Zhu, F., Joyjinda, Y., Kaewpom, T., Chia, W.N., Ampoot, W., Lim, B.L., et al. (2021). Evidence for SARS-CoV-2 related coronaviruses circulating in bats and pangolins in Southeast Asia. *Nat Commun* 12, 972. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21240-1>.
- Wang, L.-F. (2009). Bats and viruses: A brief review. *Virolog. Sin.* 24, 93–99. <https://doi.org/10.1007/s12250-009-3032-5>.
- Wang, X.-W., Li, J.-S., Jin, M., Zhen, B., Kong, Q.-X., Song, N., Xiao, W.-J., Yin, J., Wei, W., Wang, G.-J., et al. (2005). Study on the resistance of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. *Journal of Virological Methods* 126, 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.02.005>.
- Warren, B.H., Bermingham, E., Prys-Jones, R.P., et Thebaud, C. (2005). Tracking island colonization history and phenotypic shifts in Indian Ocean bulbuls (*Hypsipetes*: *Pycnonotidae*): Phylogeography and phenotypic shifts in Indian Ocean bulbuls.

Biological Journal of the Linnean Society 85, 271–287. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00492.x>.

Wartecki, A., et Rzymiski, P. (2020). On the coronaviruses and their associations with the aquatic environment and wastewater. *Water* 12, 1598. <https://doi.org/10.3390/w12061598>.

Weiss, R.A., et McMichael, A.J. (2004). Social and environmental risk factors in the emergence of infectious diseases. *Nature Medicine* 10, S70–S76. <https://doi.org/10.1038/nm1150>.

Welbergen, J.A., Klose, S.M., Markus, N., et Eby, P. (2008). Climate change and the effects of temperature extremes on Australian flying-foxes. *Proc. R. Soc. B.* 275, 419–425. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1385>.

Wellems, T.E., et Miller, L.H. (2003). Two worlds of Malaria. *N Engl J Med* 349, 1496–1498. <https://doi.org/10.1056/NEJMp038127>.

Wilkinson, D.A., Temmam, S., Lebarbenchon, C., Lagadec, E., Chotte, J., Guillebaud, J., Ramasindrazana, B., Héraud, J.-M., de Lamballerie, X., Goodman, S.M., *et al.* (2012). Identification of novel paramyxoviruses in insectivorous bats of the Southwest Indian Ocean. *Virus Research* 170, 159–163. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.08.022>.

Wilkinson, D.A., Melade, J., Dietrich, M., Ramasindrazana, B., Soarimalala, V., Lagadec, E., le Minter, G., Tortosa, P., Héraud, J.-M., de Lamballerie, X., *et al.* (2014). Highly diverse *Morbillivirus*-related paramyxoviruses in wild fauna of the Southwestern Indian Ocean Islands: Evidence of Exchange between Introduced and Endemic Small Mammals. *Journal of Virology* 88, 8268–8277. <https://doi.org/10.1128/JVI.01211-14>.

Wilkinson, D.A., Joffrin, L., Lebarbenchon, C., et Mavingui, P. (2020). Analysis of partial sequences of the RNA-dependent RNA polymerase gene as a tool for genus and subgenus classification of coronaviruses. *Journal of General Virology* 101, 1261–1269. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001494>.

Willoughby, A., Phelps, K., Predict Consortium, et Olival, K. (2017). A Comparative analysis of viral richness and viral sharing in cave-roosting bats. *Diversity* 9, 35. <https://doi.org/10.3390/d9030035>.

Wohlgemuth, N., Honce, R., et Schultz-Cherry, S. (2019). Astrovirus evolution and emergence. *Infection, Genetics and Evolution* 69, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.meeqid.2019.01.009>.

Wolfe, N.D., Dunavan, C.P., et Diamond, J. (2007). Origins of major human infectious diseases. *Nature* 447, 279–283. <https://doi.org/10.1038/nature05775>.

Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Huang, Y., et Yuen, K.-Y. (2009). Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp Biol Med (Maywood)* 234, 1117–1127. <https://doi.org/10.3181/0903-MR-94>.

Woolhouse, M.E.J., et Gowtage-Sequeria, S. (2005). Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerging Infectious Diseases* 11, 1842–1847. <https://doi.org/10.3201/eid1112.050997>.

Woon, A.P., Boyd, V., Todd, S., Smith, I., Klein, R., Woodhouse, I.B., Riddell, S., Crameri, G., Bingham, J., Wang, L.-F., *et al.* (2020). Acute experimental infection of bats and ferrets with Hendra virus: Insights into the early host response of the reservoir host and susceptible model species. *PLoS Pathog* 16, e1008412. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008412>.

World Health Organisation (2003). Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November to 31 July 2003. http://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/ consulté le 10/12/2021.

World Health Organisation (2021a). Zoonotic disease: emerging public health threats in the Region. <http://www.emro.who.int/fr/about-who/rc61/zoonotic-diseases.html> consulté le 10/12/2021.

World Health Organisation (2021b). Nipah virus infection. https://www.who.int/health-topics/nipah-virus-infection#tab=tab_1 consulté le 10/12/2021.

World Health Organisation (2021c). Hendra virus infection. <https://www.who.int/westernpacific/health-topics/hendra-virus-infection> consulté le 10/12/2021.

Wray, S.K. (2005). Ole J. Benedictow. The Black Death, 1346–1353: The complete history. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences* 60, 514–516. <https://doi.org/10.1093/jhmas/jri064>.

Wu, Z., Yang, L., Ren, X., He, G., Zhang, J., Yang, J., Qian, Z., Dong, J., Sun, L., Zhu, Y., *et al.* (2016). Deciphering the bat virome catalog to better understand the ecological diversity of bat viruses and the bat origin of emerging infectious diseases. *ISME J* 10, 609–620. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.138>.

Wuerthner, V.P., Hua, J., et Hoverman, J.T. (2017). The benefits of coinfection: Trematodes alter disease outcomes associated with virus infection. *Journal of Animal Ecology* 86, 921–931. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12665>.

Yob, J.M., Field, H., Rashdi, A.M., Morrissy, C., van der Heide, B., Rota, P., bin Adzhar, A., White, J., Daniels, P., Jamaluddin, A., *et al.* (2001). Nipah virus infection in bats (Order Chiroptera) in Peninsular Malaysia. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 439–441. <https://doi.org/10.3201/eid0703.017312>.

Zhang, X.W., Yap, Y.L., et Danchin, A. (2005). Testing the hypothesis of a recombinant origin of the SARS-associated coronavirus. *Arch Virol* 150, 1–20. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0413-9>.

Zhou, H., Chen, X., Hu, T., Li, J., Song, H., Liu, Y., Wang, P., Liu, D., Yang, J., Holmes, E.C., *et al.* (2020). A novel bat coronavirus closely related to SARS-CoV-2 Contains natural insertions at the S1/S2 cleavage site of the spike protein. *Current Biology* 30, 2196-2203.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.05.023>.

Zhou, N., Xing, G., Zhou, J., Jin, Y., Liang, C., Gu, J., Hu, B., Liao, M., Wang, Q., et Zhou, J. (2015). In vitro coinfection and replication of classical swine fever virus and porcine circovirus Type 2 in PK15 cells. *PLoS ONE* 10, e0139457. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139457>.

Zinsstag, J., Schelling, E., Waltner-Toews, D., et Tanner, M. (2011). From “one medicine” to “one health” and systemic approaches to health and well-being. *Preventive Veterinary Medicine* 101, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.07.003>.

Zumla, A., Hui, D.S., et Perlman, S. (2015). Middle East respiratory syndrome. *The Lancet* 386, 995–1007. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60454-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60454-8).

VII. Annexes

Annexe 1. Détection des coronavirus, paramyxovirus et astrovirus chez les chauves-souris à Madagascar, aux Comores, aux Seychelles et dans les Mascareignes.

| | Virus | Ile | Famille | Espèce | N testés | N positifs | Prévalence globale (%) | IC à 95% (%) | Référence | | | | |
|------------|--------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------|---------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|
| Madagascar | Astrovirus | | Miniopteridae | <i>Miniopterus gleni</i> | 2 | 1 | 50 | 1.20 | Lebarbenchon et al. 2017 | | | | |
| | | | | <i>Miniopterus griveaudi</i> | 26 | 15 | 57.7 | 1.47 | Lebarbenchon et al. 2017 | | | | |
| | | | Molossidae | <i>Otomops madagascariensis</i> | 6 | 0 | 0 | 0 | Lebarbenchon et al. 2017 | | | | |
| | | | | <i>Mormopterus jugularis</i> | 40 | 0 | 0 | 0 | Lebarbenchon et al. 2017 | | | | |
| | | | Pteropodidae | <i>Rousettus madagascariensis</i> | 41 | 2 | 4.9 | 0.43 | Lebarbenchon et al. 2017 | | | | |
| | | | Rhinonycteridae | <i>Paratriaenops furculus</i> | 31 | 11 | 35.5 | 1.16 | Lebarbenchon et al. 2017 | | | | |
| | | | | <i>Trienops menamena</i> | 13 | 8 | 61.5 | 1.50 | Lebarbenchon et al. 2017 | | | | |
| | | | Vespertilionidae | <i>Myotis goudoti</i> | 14 | 3 | 21.4 | 0.90 | Lebarbenchon et al. 2017 | | | | |
| | | | | <i>Pipistrellus hesperidus</i> | 5 | 0 | 0 | 0 | Lebarbenchon et al. 2017 | | | | |
| | | | Coronavirus | | | Hipposideridae | <i>Macronycteris commersoni</i> | 19 | 0 | 0 | 0 | Joffrin et al. 2020 | |
| | <i>Miniopterus gleni</i> | 16 | | | | | 0 | 0 | 0 | Joffrin et al. 2020 | | | |
| | Miniopteridae | <i>Miniopterus griveaudi</i> | | | | 28 | 0 | 0 | 0 | Joffrin et al. 2020 | | | |
| | | <i>Miniopterus mahafaliensis</i> | | | | 8 | 0 | 0 | 0 | Joffrin et al. 2020 | | | |
| | | <i>Miniopterus manavi</i> | | | | 19 | 0 | 0 | 0 | Joffrin et al. 2020 | | | |
| | | <i>Miniopterus sororculus</i> | | | | 8 | 0 | 0 | 0 | Joffrin et al. 2020 | | | |
| | | <i>Chaerephon atsinanana</i> | | | | 29 | 0 | 0 | 0 | Joffrin et al. 2020 | | | |
| | Molossidae | <i>Chaerephon leucogaster</i> | | | | 45 | 0 | 0 | 0 | Joffrin et al. 2020 | | | |
| | | <i>Mops leucostigma</i> | | | | 94 | 0 | 0 | 0 | Joffrin et al. 2020 | | | |
| | | <i>Mops midas</i> | | | | 21 | 4 | 19.0 | 0.9 | Joffrin et al. 2020 | | | |
| | | <i>Mormopterus jugularis</i> | | | | 63 | 10 | 15.9 | 0.8 | Joffrin et al. 2020 | | | |
| | | <i>Otomops madagascariensis</i> | | | | 18 | 0 | 0 | 0 | Joffrin et al. 2020 | | | |
| | | <i>Eidolon dupreanum</i> | | | | 96 | 1 | 1.0 | 0.2 | Razanajatovo et al. 2015 | | | |
| | Pteropodidae | <i>Pteropus rufus</i> | | | | 76 | 13 | 17.1 | 0.8 | Razanajatovo et al. 2015 | | | |
| | | <i>Rousettus madagascariensis</i> | | | | 100 | 6 | 6 | 0.5 | Razanajatovo et al. 2015 | | | |
| | | | | | | 124 | 0 | 0 | 0 | Joffrin et al. 2020 | | | |
| | Rhinonycteridae | <i>Paratriaenops furculus</i> | | | | 32 | 0 | 0 | 0 | Joffrin et al. 2020 | | | |
| | | <i>Trienops menamena</i> | | | | 34 | 4 | 11.8 | 0.7 | Joffrin et al. 2020 | | | |
| | Vespertilionidae | <i>Laephotis malagasyensis</i> | | | | 2 | 0 | 0 | 0 | Joffrin et al. 2020 | | | |
| | | <i>Laephotis matroka</i> | | | | 4 | 0 | 0 | 0 | Joffrin et al. 2020 | | | |
| | | <i>Myotis goudoti</i> | | | | 17 | 0 | 0 | 0 | Joffrin et al. 2020 | | | |
| | | <i>Pipistrellus hesperidus</i> | | | | 5 | 0 | 0 | 0 | Joffrin et al. 2020 | | | |
| | Paramyxovirus | | | | | | Emballonuridae | <i>Coleura kibomalandy</i> | 6 | 2 | 33.3 | 1.1 | Mélade et al. 2016 |
| | | | | | | | | <i>Paremballonura tiavato</i> | 3 | 0 | 0 | 0 | Mélade et al. 2016 |
| | | | | | | | Hipposideridae | <i>Macronycteris commersoni</i> | 27 | 0 | 0 | 0 | Mélade et al. 2016 |
| | | | | | | | | <i>Miniopterus aelleni</i> | 7 | 0 | 0 | 0 | Mélade et al. 2016 |
| | | | | | | | Miniopteridae | <i>Miniopterus cambohitrensis</i> | 19 | 1 | 5.3 | 0.4 | Mélade et al. 2016 |
| | | | | | | | | <i>Miniopterus gleni</i> | 7 | 1 | 14.3 | 0.7 | Wilkinson et al. 2012 |
| | | | | | | | | | 22 | 4 | 18.2 | 0.8 | Mélade et al. 2016 |
| | | | | | | | | <i>Miniopterus griffithsi</i> | 2 | 0 | 0 | 0 | Wilkinson et al. 2012 |
| | | | | | | | | | 7 | 0 | 0 | 0 | Mélade et al. 2016 |
| | | | | | | | | <i>Miniopterus griveaudi</i> | 116 | 18 | 15.5 | 0.8 | Mélade et al. 2016 |
| | | | | | | | | <i>Miniopterus mahafaliensis</i> | 11 | 0 | 0 | 0 | Wilkinson et al. 2012 |
| | | | | | | | | | 89 | 4 | 4.5 | 0.4 | Mélade et al. 2016 |
| | | | | | | | | <i>Miniopterus majori</i> | 7 | 0 | 0 | 0 | Mélade et al. 2016 |
| | | | | | | | | <i>Miniopterus sororculus</i> | 1 | 1 | 100 | 0 | Wilkinson et al. 2012 |
| | | | | | | | | 22 | 2 | 9.1 | 0.6 | Mélade et al. 2016 | |
| | | | | | | | Molossidae | <i>Mormopterus jugularis</i> | 13 | 0 | 0 | 0 | Wilkinson et al. 2012 |
| | | | | | | | | <i>Otomops madagascariensis</i> | 8 | 0 | 0 | 0 | Wilkinson et al. 2012 |
| | | | | | | | | <i>Chaerephon atsinanana</i> | 20 | 0 | 0 | 0 | Wilkinson et al. 2012 |
| | | | | 34 | 0 | | | 0 | 0 | Mélade et al. 2016 | | | |
| | | | <i>Chaerephon leucogaster</i> | 94 | 6 | | | 6.4 | 0.5 | Mélade et al. 2016 | | | |
| | | | <i>Mops leucostigma</i> | 68 | 11 | | | 16.2 | 0.8 | Mélade et al. 2016 | | | |
| | | | <i>mops midas</i> | 19 | 1 | | | 5.3 | 0.4 | Mélade et al. 2016 | | | |
| | | | <i>Mormopterus jugularis</i> | 152 | 12 | | | 7.9 | 0.6 | Mélade et al. 2016 | | | |
| | | | <i>Otomops madagascariensis</i> | 39 | 7 | | | 17.9 | 0.8 | Mélade et al. 2016 | | | |
| | | | <i>Eidolon dupreanum</i> | 11 | 0 | | | 0 | 0 | Mélade et al. 2016 | | | |
| | | | Pteropodidae | <i>Pteropus rufus</i> | 20 | | 3 | 15 | 0.8 | Mélade et al. 2016 | | | |
| | | | | <i>Rousettus madagascariensis</i> | 49 | | 0 | 0 | 0 | Mélade et al. 2016 | | | |
| | | | | <i>Trienops menamena</i> | 10 | | 2 | 20 | 0.9 | Wilkinson et al. 2012 | | | |
| | | | Rhinonycteridae | | 42 | | 21 | 50 | 1.4 | Mélade et al. 2016 | | | |
| | | | | <i>Paratriaenops furculus</i> | 1 | | 0 | 0 | 0 | Wilkinson et al. 2012 | | | |
| | | | | | 14 | | 1 | 7.1 | 0.5 | Mélade et al. 2016 | | | |
| | | | Vespertilionidae | <i>Myotis goudoti</i> | 2 | | 0 | 0 | 0 | Wilkinson et al. 2012 | | | |
| | | | | <i>Pipistrellus raceyi</i> | 1 | | 0 | 0 | 0 | Wilkinson et al. 2012 | | | |
| | | | | <i>Neoromicia bemaity</i> | 2 | | 0 | 0 | 0 | Mélade et al. 2016 | | | |
| | | | | <i>Myotis goudoti</i> | 48 | | 5 | 10.4 | 0.6 | Mélade et al. 2016 | | | |
| | | | | <i>Laephotis malagasyensis</i> | 2 | | 0 | 0 | 0 | Mélade et al. 2016 | | | |
| | | | | <i>Laephotis matroka</i> | 4 | | 0 | 0 | 0 | Mélade et al. 2016 | | | |
| | | | | <i>Laephotis robertsi</i> | 1 | | 0 | 0 | 0 | Mélade et al. 2016 | | | |
| | | | | <i>Pipistrellus hesperidus</i> | 19 | | 1 | 5.3 | 0.4 | Mélade et al. 2016 | | | |
| | | | | <i>Pipistrellus raceyi</i> | 3 | | 0 | 0 | 0 | Mélade et al. 2016 | | | |
| | | | | <i>Scotophilus marovaza</i> | 1 | | 0 | 0 | 0 | Mélade et al. 2016 | | | |
| | | | Archipel des Comores | Astrovirus | Mayotte | | Molossidae | <i>Chaerephon pusillus</i> | 58 | 0 | 0 | 0 | Hoarau et al. 2018 |
| | | | | | | | Pteropodidae | <i>Pteropus seychellensis</i> | 21 | 0 | 0 | 0 | Hoarau et al. 2018 |
| | | | | Coronavirus | Mayotte | | Molossidae | <i>Chaerephon sp.</i> | 4 | 1 | 25 | 0.4 | Joffrin et al. 2020 |
| | | | | | | | Pteropodidae | <i>Chaerephon pusillus</i> | 60 | 7 | 11.7 | 0.1 | Joffrin et al. 2020 |
| | | | | Paramyxovirus | Anjouan et Grande Comore | | Miniopteridae | <i>Miniopterus griveaudi</i> | 20 | 3 | 15 | 0.2 | Wilkinson et al. 2012 |
| | | | | | | | Molossidae | <i>Chaerephon pusillus</i> | 26 | 0 | 0 | 0 | Wilkinson et al. 2012 |
| | | | | Pteropodidae | <i>Rousettus obliivius</i> | | 20 | 0 | 0 | 0 | Wilkinson et al. 2012 | | |
| | | | Archipel des Seychelles | Coronavirus | | | Pteropodidae | <i>Pteropus seychellensis</i> | 50 | 0 | 0 | 0 | Joffrin et al. 2020 |
| | | | Archipel des Mascareignes | Astrovirus | Reunion | | Molossidae | <i>Mormopterus francoismoutou</i> | 380 | 27 | 7.1 | 0 | Joffrin et al. 2021 |
| | Reunion | Molossidae | | | <i>Mormopterus francoismoutou</i> | 50 | 2 | 4.0 | 0 | Joffrin et al. 2020 | | | |
| | Coronavirus | Maurice | | Emballonuridae | <i>Taphozous mauritianus</i> | 2 | 0 | 0 | 0 | Joffrin et al. 2020 | | | |
| | | | | Molossidae | <i>Mormopterus acetabulosus</i> | 6 | 0 | 0 | 0 | Joffrin et al. 2020 | | | |
| | | Pteropodidae | | <i>Pteropus niger</i> | 48 | 0 | 0 | 0 | Joffrin et al. 2020 | | | | |
| | Paramyxovirus | Reunion | | Molossidae | <i>Mormopterus francoismoutou</i> | 561 | 180 | 32.1 | 0 | Dietrich et al. 2015 | | | |
| | | Maurice | Molossidae | <i>Mormopterus acetabulosus</i> | 55 | 1 | 1.8 | 0 | Wilkinson et al. 2012 | | | | |

Annexe 2. Joffrin L., Hoarau A.O.G., Lagadec E., Torrontegi O., Le Minter G., Dietrich M., Mavingui P. and Lebarbenchon C. Seasonality of coronavirus shedding in tropical bats. Royal Society Open Science 9 (2): 211600.

Research



Cite this article: Joffrin L, Hoarau AOG, Lagadec E, Torrontegi O, Köster M, Le Minter G, Dietrich M, Mavingui P, Lebarbenchon C. 2022

Seasonality of coronavirus shedding in tropical bats. *R. Soc. Open Sci.* **9**: 211600.
<https://doi.org/10.1098/rsos.211600>

Received: 15 October 2021

Accepted: 14 December 2021

Subject Category:

Ecology, conservation and global change biology

Subject Areas:

ecology/molecular biology

Keywords:

alpha-coronavirus, disease ecology, longitudinal study, Indian Ocean, Molossidae, Reunion Island

Authors for correspondence:

Léa Joffrin

e-mail: lea.joffrin@gmail.com

Camille Lebarbenchon

e-mail: camille.lebarbenchon@univ-reunion.fr

[†]Present address: Evolutionary Ecology Group, Department of Biology, University of Antwerp, Universiteitsplein 1, 2610 Antwerp, Belgium.

[‡]Present address: Department of Animal Health, NEIKER-Basque Institute for Agricultural Research and Development, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Parque Científico y Tecnológico de Bizkaia, P812, 48160 Derio, Spain.

Electronic supplementary material is available online at <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.c.5823168>.

Seasonality of coronavirus shedding in tropical bats

Léa Joffrin[†], Axel O. G. Hoarau, Erwan Lagadec, Olalla Torrontegi[‡], Marie Köster, 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

LJ, 0000-0003-3718-7182; AOGH, 0000-0002-7135-3263; CL, 0000-0002-0922-7573

Anticipating cross-species transmission of zoonotic diseases requires an understanding of pathogen infection dynamics within natural reservoir hosts. Although bats might be a source of coronaviruses (CoVs) for humans, the drivers of infection dynamics in bat populations have received limited attention. We conducted a fine-scale 2-year longitudinal study of CoV infection dynamics in the largest colony of Reunion free-tailed bats (*Mormopterus francoismoutou*), a tropical insectivorous species. Real-time PCR screening of 1080 fresh individual faeces samples collected during the two consecutive years revealed an extreme variation of the detection rate of bats shedding viruses over the birthing season (from 0% to 80%). Shedding pulses were repeatedly observed and occurred both during late pregnancy and within two months after parturition. An additional shedding pulse at the end of the second year suggests some inter-annual variations. We also detected viral RNA in bat guano up to three months after bats had left the cave. Our results highlight the importance of fine-scale longitudinal studies to capture the rapid change of bat CoV infection over months, and that CoV shedding pulses in bats may increase spillover risk.

1. Introduction

Host–pathogen interactions are dynamic and may depend on host life cycle (reproduction, parturition, dispersal of young and migration) and on abiotic factors such as climate or seasonal variations (precipitation, droughts, temperatures and cyclones) [1–5]. Analysing the effect of such factors on animal infections will contribute to deciphering transmission cycles of infectious agents in natural ecosystems. For example, a 6-year survey of a

wild blue tit population showed that infection with *Plasmodium relictum* mainly occurs during postnatal dispersal events [6]. Longitudinal studies of wild animal populations are thus important in disease ecology, with applications to assess risks of spillover of zoonotic infectious agents [5,7].

Seasonal viral shedding or infection has been reported in bats for many pathogens belonging to different viral families (e.g. Paramyxoviridae, Filoviridae, Coronaviridae and Astroviridae) [7–12]. Such seasonality in viral infection dynamics in bats is often driven by host population structure and their reproductive cycles. These cycles can be highly synchronized and may create conducive conditions for viral transmission between hosts (i.e. aggregation of pregnant females and parturition increasing the size of the colony) and infection within hosts (e.g. immune function during gestation and lactation, waning of maternal antibodies in juveniles) [13–16].

Longitudinal studies have been conducted to assess shedding dynamics of viruses associated with bats [7,11,17–19]. For instance, a significant variation in the prevalence of Marburg virus infections in Egyptian fruit bats (*Rousettus aegyptiacus*) has been reported throughout the breeding and the birthing seasons [7]. An increase in Marburg virus prevalence after parturition suggests a major role of juvenile bats in the transmission. More recently, it has been shown that immunity and colony size/density-dependent transmission lead to multi-year fluctuations in Nipah virus transmission intensity among *Pteropus* bats in Bangladesh [20].

Although bat coronaviruses (CoVs) have been detected worldwide [21], the ecological factors involved in CoV infection dynamics remain to be precisely assessed. It has been suggested that parturition and age could be important drivers in bat CoV transmission dynamics [17,18,22,23]. Such studies are currently needed given that bat-associated CoVs can be the progenitors of viruses responsible for outbreaks in humans and livestock (e.g. severe acute respiratory syndrome CoV-2, Middle East respiratory syndrome CoV, swine acute diarrhoea syndrome virus). Only a few bat species have been investigated for CoV shedding dynamics at fine scale [17,18], and further investigations are thus needed, especially in tropical areas.

Reunion free-tailed bats (RFTB; *Mormopterus francoismoutoui*) have recently been identified as hosts for an *Alphacoronavirus* (alpha-CoV) [24]. This small tropical insectivorous species is endemic to Reunion Island [25] and roosts in large monospecific colonies in natural caves and buildings (i.e. bridges and houses [24,25]), especially during the birthing season (austral summer) when females seasonally aggregate in maternity colonies to give birth [11]. Several thousands of individuals, with up to 1000 individuals per square metre, can be found in RFTB colonies [11,26].

We conducted a 2-year longitudinal study of the largest RFTB maternity colony to investigate the effect of the bat colony structure (reproductive status and age) on CoV detection in faeces. We based our sampling scheme on a fine temporal scale (intervals of 2–3 weeks) to capture rapid changes in CoV shedding in faeces. We monitored the colony during the whole period of occupation (nine months each year) and tested (i) whether changes in the colony structure (reproductive status and age) during the birthing season could affect the prevalence of bats shedding CoV, in particular with the addition of newborns and juvenile bats, (ii) if similar patterns of infection occur between years and (iii) if the level of accumulation and persistence of CoV RNA in the environment (dry guano) was associated with temporal variation in CoV shedding in fresh faeces.

2. Material and methods

2.1. Study site

The study was conducted from 2016 to 2018, in a natural cave (30 m³) on the west coast of Reunion Island, occupied by bats from October to June. The bat colony is monospecific and mostly composed of adult females during the early stages of the birthing season (October–December). Previous studies have estimated between 40 000 and 50 000 flying adult bats to be present in the cave before parturition. After the parturition period (starting in mid-December), the population includes lactating females, neonates and juveniles. As the adults progressively leave the cave (late January–March), the remaining population comprises mostly juveniles, which subsequently leave by May, resulting in the cave being empty from June to September [11,27]. In this study, we assessed population age structure and parturition timing based on the presence of adults (brown fur), newborns (nude pink skin) and juveniles (dark grey fur) [27].

2.2. Collection of biological material

A non-invasive sampling strategy was set up to avoid direct manipulation of bats and to limit colony disturbance (electronic supplementary material, figure S1) [27]. Samples were collected every two to three weeks between June 2016 and September 2018. Fresh faeces were collected inside the cave in the morning, by placing benchguard® sheets (60 cm × 49 cm) underneath the roosting bats. To avoid sampling bias associated with potential spatial variation in bat CoVs shedding inside the colony, seven different locations within the cave were selected at the beginning of the study and were coded as 'sheet no. 1' to 'sheet no. 7'. During each sampling session, benchguard® sheets were placed in these locations if bats were present, resulting in sample collection from one to five of the seven defined areas for each sampling event. The objective was to avoid sampling bias associated with potential spatial variation in bat CoVs shedding inside the colony. During each sampling session, between 12 and 50 fresh droppings were collected on each benchguard® sheet within 15 min after fresh faeces were dropped and placed in individual virus transport medium (VTM) [28]. Samples were maintained refrigerated in the field and stored at -80°C .

In parallel, during each sampling session, we also collected dry guano samples from the narrowest part of the cave entrance, at 10 different locations with 50 cm separation from each other, along with a 4.5 m transect (electronic supplementary material, figure S2). Each location was coded with a letter from A to J, leading to the collection of 10 samples for each sampling session (electronic supplementary material, figure S3). Sterile open-ended 2 ml syringes were used to collect a core sample to obtain *ca* 130 mg of guano. Guano sample was immediately mixed with 1.5 ml of VTM and kept refrigerated in the field and stored at -80°C . Details regarding dry guano sampling design are available in Joffrin *et al.* [27].

2.3. Coronavirus detection in faeces and guano

Samples were briefly vortexed and then centrifuged at 1500g for 15 min. RNA was extracted from 140 μl of each sample's supernatant using a QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) and eluted in 60 μl of AVE buffer. Reverse transcription was performed with 10 μl of RNA using ProtoScript II Reverse Transcriptase and Random Primer 6 (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) as previously described [28]. cDNAs were tested for the presence of the RNA-dependent RNA-polymerase (RdRp) gene using a multi-probe real-time (RT) PCR targeting a 179 bp length fragment [29]. RT-PCR was performed with Absolute Blue QPCR Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 2.5 μl of cDNA in a CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) [24].

For each maternity season, a subset of CoV positive faeces (2016–2017, 30%; 2017–2018, 20%) was sequenced by direct Sanger method on both strands by Genoscreen (Lille, France). Sequences were edited with Chromas Lite v.2.6.4 software [30] and aligned with CLC Sequence Viewer 8.0 software [31], with the same reference sequences used in a previous study [24].

2.4. Statistical analysis

We explored the effect of sampling collection date (years, months and weeks), sampling collection sheet (no. 1 to no. 7) inside the cave for fresh faeces, sampling location along the transect (A–J) for dry guano on the probability of CoV detection. We used generalized additive mixed models (GAMMs) with binomial error distributions using the *mgcv* package in R v. 3.5.1 software [32] to model binomial prevalence data as a smoothed function of time (months and weeks) while accounting for sampling location (collection sheet inside the cave and sampling location along the transect) as explanatory variables. The model with the best Akaike information criterion (AIC) score was selected.

We also explored the effect of CoV shedding in fresh faeces on the probability of CoV detection in the guano from October 2016 to June 2018. After checking the autocorrelation of the variables by a Durbin–Watson test (*car* package) and the normality of the residuals by a Shapiro–Wilk test for each maternity season, we used the Spearman test and calculated coefficient rho (ρ) to determine the correlation between the CoV shedding in faeces and the number of positive guano samples at the cave entrance for each sampling season. Rho values were interpreted as follows: 0.00–0.39 'weak' correlation, 0.40–0.59 'moderate' correlation, 0.60–0.79 'strong' correlation and 0.80–1.00 'very strong' correlation. Coefficients were considered significant for p -value < 0.05 . Analyses were conducted with R v. 3.5.1 software [32].

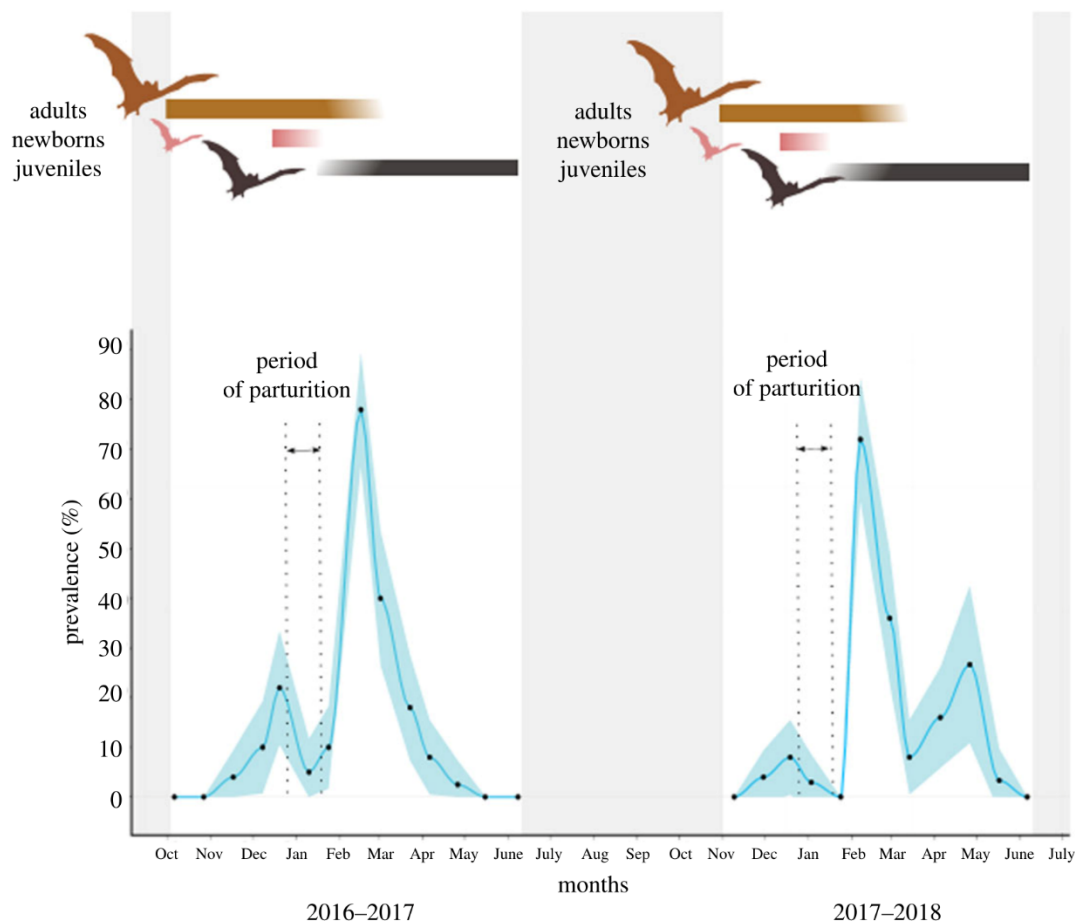


Figure 1. Prevalence of Reunion free-tailed bats (*Mormopterus francoismoutoui*) shedding CoV in faeces during two consecutive maternity seasons (October 2016–June 2018). The blue shaded area represents the 95% confidence interval. Dots indicate sample collection dates. Grey areas correspond to periods without bats in the cave. The presence of adults, newborns and juveniles in the colony is indicated at the top of the figure: brown bats corresponds to adult, pink bats corresponds to newborns, and black bats to juveniles.

3. Results

3.1. Reunion free-tailed bats population dynamic and structure

During our visual monitoring of the colony, the first adult bats were spotted inside the cave in October 2016 and in November 2017 (figure 1). More than half of the cave surface was covered with bats three to six weeks after the arrival of the first colonizing bats and it lasted for two to three months (November–February). Then, occupancy progressively dropped until all bats had left the cave in June. Newborns were sighted from late December onwards, for about a month for the two sampling campaigns. By the end of January, the colony was mainly composed of juvenile bats with no newborns and only a few adults sighted. These observations were consistent with the previous study on this colony [11,26]

3.2. Coronavirus shedding in fresh faeces

Overall, 1080 individual faeces were collected during 26 sampling sessions for two consecutive years. A total of 179 faeces tested positive for CoV (16.6%). None of the faeces tested positive for CoV at the beginning and at the end of both maternity seasons (i.e. during the first and the last sampling sessions).

We observed a first increase in bats shedding CoV at the beginning of the birthing season, with a prevalence ($\pm 95\%$ confidence interval) of $22.0 \pm 11.5\%$ in 2016–2017 and $8.0 \pm 7.5\%$ in 2017–2018 (figure 1). This prevalence then dropped to $5.0 \pm 6.8\%$ in 2016–2017 and to 0% in 2017–2018. A second major increase in the prevalence of bats shedding CoV was observed several weeks after the first one, reaching $78.0 \pm 11.5\%$ in 2016–2017 and $72.0 \pm 12.4\%$ in 2017–2018. In 2016–2017, the prevalence

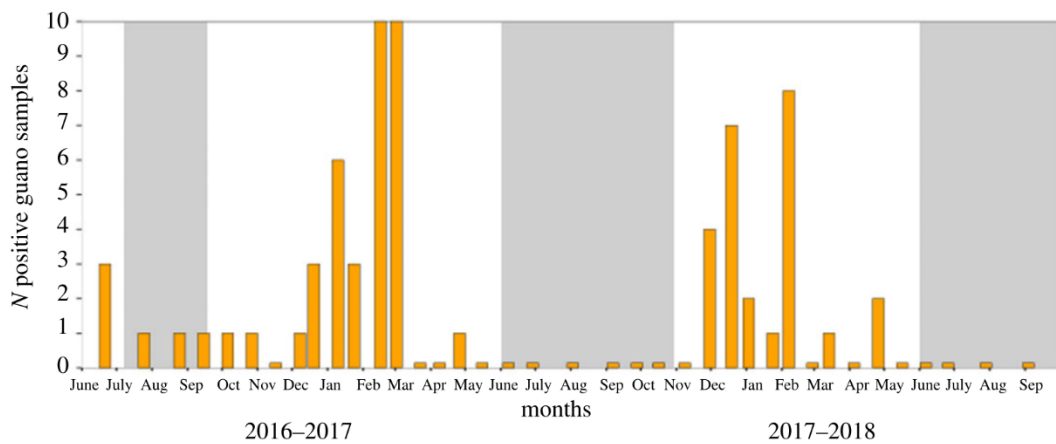


Figure 2. Number of positive guano samples at each sampling session. Grey areas correspond to time of the year without bats in the colony.

decreased from March onward, until all bats left the cave. In 2017–2018, however, a third increase was detected at the end of the season ($26.7 \pm 15.8\%$). Based on AIC score, the best-supported GAMM included the sampling week and the sampling sheet as significant variables (electronic supplementary material, table S3). Fresh faeces were significantly more likely to be CoV positive during weeks 6, 7 and 9 (i.e. in February) as compared to other weeks (respectively, $p < 0.001$, $p < 0.001$ and $p < 0.05$; electronic supplementary material, figure S4), supporting a seasonal increase in bat shedding CoV at this time of the year. Increases of bats shedding CoV during other periods of the year were not significant despite the important variation in the prevalence of bats shedding CoV in December and in March (figure 1). However, this result is likely to be biased by our sampling scheme: samples were not collected in the same weeks during the two monitored seasons. An effect of sampling sheet was also detected for sheet no. 6 ($p < 0.01$), very likely reflecting a bias in sampling effort. Indeed, the location of sheet no. 6 was only sampled for two sampling sessions during weeks 4 and 7, leading to an overestimation of CoV prevalence for this location.

No genetic variation was observed on the 45 partial RdRp sequence fragments (179 bp). Sequences were 100% similar to the alpha-CoV previously detected in RFTB on Reunion Island (sequence accession number MN183188).

3.3. Coronavirus RNA in dry guano

Overall, 380 guano samples were collected at the cave entrance during two consecutive years (190 each year), from June 2016 to September 2018 (10 samples collected along a transect in 38 individual sampling sessions; electronic supplementary material, table S2). In total, 67 guano samples (17.6%) tested positive for the presence of CoV (figure 2). Dry guano samples were found CoV positive all during the year, even when the cave was unoccupied. Interestingly, guano samples collected in July, August and September 2016 tested positive for CoV (electronic supplementary material, table S2) although bats had left the cave by June at the latest. Based on AIC scoring, the best-supported GAMM reveals a significant effect of time and location on the probability of CoV detection in dry guano, with sampling months and weeks as a significant factor ($p < 0.005$; electronic supplementary material, table S4). Overall, a significant decrease of the detection of positive samples was observed after week 9 ($p < 0.001$; electronic supplementary material, table S4). An effect of sampling location on CoV detection was found, with a slightly higher number of positive samples detected from location H than other locations ($p < 0.05$; electronic supplementary material, table S4 and figure S5).

We found a moderate positive correlation between the probability of CoV detection in fresh faeces and the number of positive dry guano samples at the cave entrance, for the first sampling season ($\rho = 0.57$, $p < 0.05$), but not for the second one ($\rho = 0.35$, $p = 0.27$).

4. Discussion

We investigated the infection dynamics of bat CoVs in a RFTB maternity colony during two consecutive years. Our results provide evidence that the prevalence of RFTB shedding alpha-CoV varies during the

course of the birthing season, with a major shedding pulse occurring two months after parturition. Similar patterns were observed for both years, although an increase in the prevalence of RFTB shedding alpha-CoV was detected at the end of the second year. We did not find any spatial variation in bat shedding CoV prevalence inside the colony. Dry guano sampling revealed that viral RNA could be detected in the environment after all bats have left the cave; however, the infectivity of viral particles potentially maintained in bat guano remains to be assessed. Finally, the use of non-invasive sampling methods to explore the alpha-CoV infection dynamics in RFTB seems to be successful and efficient, adding another example to investigations conducted with limited impact on wild animals [11,17–19]. Although a recent study suggests that non-invasive sampling may lead to overestimation of the prevalence of bats shedding viruses [33], we nevertheless highlight that a detailed assessment of the temporal variation of CoV circulation in wild bats can be done with limited impact on the host population.

Major variations in alpha-CoV shedding occurred during the birthing season. Such infection dynamics has previously been observed for other alpha-CoVs in *Myotis myotis* bats in the temperate region [17], and also for other infectious agents in RFTB [11]. Dietrich *et al.* investigated *Leptospira* spp. bacteria and paramyxovirus infection dynamics in RFTB urine over the birthing season in the same colony [11]. The prevalence of these two pathogens increased at the beginning of the birthing season (mid-December), and three months after the parturition period (late March) [11]. Together, these results suggested that the first increase in prevalence could result from a transient pregnancy-related depressed immunity [11]. However, the major shedding pulse we detected for alpha-CoV does not seem to coincide with the second peak observed for *Leptospira* bacteria and paramyxovirus. These distinct patterns may reflect differences in population immunity towards these infectious agents, or differences in the transmission rates between the different pathogens. Seasonal breeding and birthing in high-density colonies lead to a substantial increase in the number of susceptible individuals, therefore enhancing viral transmission [1,5,34]. Moreover, studies on virus transmission in bat colonies have suggested that newborns may be protected against infections by maternal antibodies [11,17,35,36]. The duration of antibody waning seems to vary between viruses; during henipavirus and filovirus infections, it has been estimated that maternal antibodies may persist for three to six months [13–15]. Even if no studies have investigated the duration of maternal antibodies of bat CoVs, one can hypothesize that the major epidemic wave we observed in juvenile bats may coincide with the waning of maternal antibodies [11,17]. Finally, differences in the sampling design (faeces versus urine, sampling inside the cave versus outside) and PCR sensitivity towards each of the infectious agents may also explain differences in infection dynamics between *Leptospira* bacteria, paramyxovirus and CoV in RFTB. Collecting material inside the cave also allows the sampling of all age groups (adults, newborns, non-flying juveniles and flying juveniles) over the maternity season, whereas sampling conducted outside the cave is restricted to flying bats. Further investigations would be required to precisely assess patterns of virus shedding at the individual level, based on bat capture rather than environmental sampling, and give a more accurate estimation of infection dynamics for the whole colony.

We identified an inter-annual variation of bats shedding CoV, with a shedding pulse at the end of the second year. At least two scenarios may explain this potential increase in the prevalence of shedding bats. First, it may reflect a desynchronization in parturition of pregnant females, leading to a second pool of susceptible individuals at the end of the maternity season. However, the absence of newborns in the colony after March 2018 does not support this hypothesis. Second, juvenile bats from other colonies may have prospected the cave as a new potential roost, leading to the introduction of new susceptible individuals to the colony and favouring virus transmission. Our study site is the most important known roosting site for RFTB which can host more than 40 000 individuals during the maternity season [11]. However, little is known about the geographic origin of the females aggregating at the beginning of the maternity season, nor the destination of mothers and juveniles after they leave the cave and more globally, how the RFTB population is structured at the island scale. Knowledge of the structure and connectivity of bat populations is important to understand infection dynamics and viral dispersion within and between colonies and may depend on ecological or physiological factors [37]. Thus, studies on population structure and population dynamics through population genetics (e.g. bat mitochondrial and nuclear DNA) and capture–mark–recapture may provide important information on RFTB seasonal movements and viral transmission between roosting sites.

No genetic variation was observed in the sequenced CoV RdRp, although we cannot exclude that this may be associated with the limited number of viruses we sequenced (25% of the PCR positive samples), the length of the amplicons (179 bp) and the conservative nature of the RdRp CoVs. Therefore, we cannot

exclude the circulation of different CoV variants in the monitored RFTB colony, at different times in the season. Rare co-infections with multiple CoV strains have already been reported elsewhere, either with the same CoV group such as in Lyle's flying fox (*Pteropus lylei*) colony in Thailand and in Old World leaf-nosed bats (*Hipposideros* sp.) in Ghana, or with both alpha- and beta-CoVs in Egyptian fruit bats (*Rousettus aegyptiacus*) in Guinea [18,38,39]. To accurately explore the genetic diversity of CoVs and their evolution, the use of PCR systems targeting structural genes coding for the spike or envelope proteins is needed. Sequencing the aforementioned genes may provide useful information on phylodynamic studies of CoVs in their natural hosts, although it is challenging given the size and variability of the spike gene [40].

A higher proportion of CoV positive samples were found in fresh faeces than in dry guano, and the probability of detection of positive CoV guano samples did not reflect CoV dynamics in faeces. The use of environmental samples such as dry guano instead of fresh samples may then not be appropriate to study virus infection dynamics in bat colonies. Wacharapluesadee *et al.* [41] investigated CoV presence in dry bat guano in Thailand and only 3.8% of guano samples tested positive for CoV. As enveloped viruses are considered more sensitive to denaturation than non-enveloped viruses, full CoV viral particles may be rapidly degraded in the environment under the action of humidity, rain, temperature or ultraviolet exposure [42–46]. On the other hand, the detection of CoV RNA in bat guano before the birthing season, when the cave was empty, might suggest the environmental persistence of viral particles in guano over time. Previous experimental studies revealed that viruses such as other alpha-CoVs (i.e. transmissible gastroenteritis virus and murine hepatitis virus) can survive (i.e. replicate in host cell lines) up to three weeks at 25°C and several months at 4°C in water and pasteurized sewage, and even longer under low humidity on indoor surfaces [45,46]. These patterns also corresponded to those of *Betacoronavirus* (beta-CoVs) such as SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 [44,47–49]. Since most of these studies were focused on water detection and only a few on fomites, there is limited information available regarding CoV survival in soil. Environmental or indirect transmission of bat-borne pathogens to other hosts through the contamination of shared habitats has already been hypothesized for some viruses and bacteria [50]. In our study, the lack of virus isolation limits further interpretation about the potential of dry guano as a suitable route of transmission to other hosts. In addition, our estimation of CoV prevalence is based on RNA detection and may not reflect the prevalence of bats shedding infectious particles. Future experimental studies on CoV survival in dry bat guano under different abiotic conditions (temperature, humidity and ultraviolet radiation) may provide useful answers on viral infectivity duration in the environment.

Alpha- and beta-CoVs have also been reported in many other mammalian hosts [38–40]. Investigations on bat viruses and how they interact with their hosts in wild environments have considerably improved our knowledge of disease emergence but are still not sufficient for anticipating future outbreaks [51–53]. The development of ecological studies is still needed to determine the drivers and patterns in viral shedding and cross-species transmission [54] and to better assess the conditions, places and timing of emergence risk [55,56]. Environmental alterations such as biodiversity loss and land-use change are considered as key drivers of virus emergence [57,58]. Factors associated to these environmental changes (food scarcity, stress and pollution) may directly impact viral shedding dynamics at the individual and population levels [3,59,60]. Habitat fragmentation and human encroachment into wild areas enhance contact with infected wild animals, therefore facilitating spillover opportunities [57,58]. For a better anticipation of the emergence in other hosts, including humans, long-term eco-epidemiological studies are needed to precisely assess CoV transmission dynamics in wild reservoirs [57,61–63]. The recent SARS-CoV-2 emergence highlights the need for a better assessment of CoV diversity and spillover risk, at both local and regional scales.

Ethics. This study does not present research with ethical consideration and fully complies with the Royal Society publishing ethics policy.

Data accessibility. The datasets supporting this article have been uploaded as part of the electronic supplementary material. The data are provided in the electronic supplementary material [64].

Authors' contributions. L.J.: conceptualization, data curation, investigation, methodology, validation, writing—original draft and writing—review and editing; A.O.G.H.: investigation, writing—original draft and writing—review and editing; E.L.: investigation and writing—review and editing; O.T.: investigation and writing—review and editing; M.K.: investigation and writing—review and editing; G.L.M.: investigation and writing—review and editing; M.D.: investigation and writing—review and editing; P.M.: conceptualization, supervision, validation and writing—review and editing; C.L.: conceptualization, data curation, funding acquisition, investigation, methodology, project administration, resources, supervision, validation, writing—original draft and writing—review and editing. All authors gave final approval for publication and agreed to be held accountable for the work performed therein.

Competing interests. We declare we have no competing interests.

Funding. L.J. was supported by a Région Réunion, European Regional Development Funds (FEDER 2014–2020) PhD fellowship, A.O.G.H. by a Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation PhD fellowship and C.L. by a Chaire Mixte Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)—Université de La Réunion. This work was funded by the VIROPTERE programme (INTERREG V Océan Indien). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

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

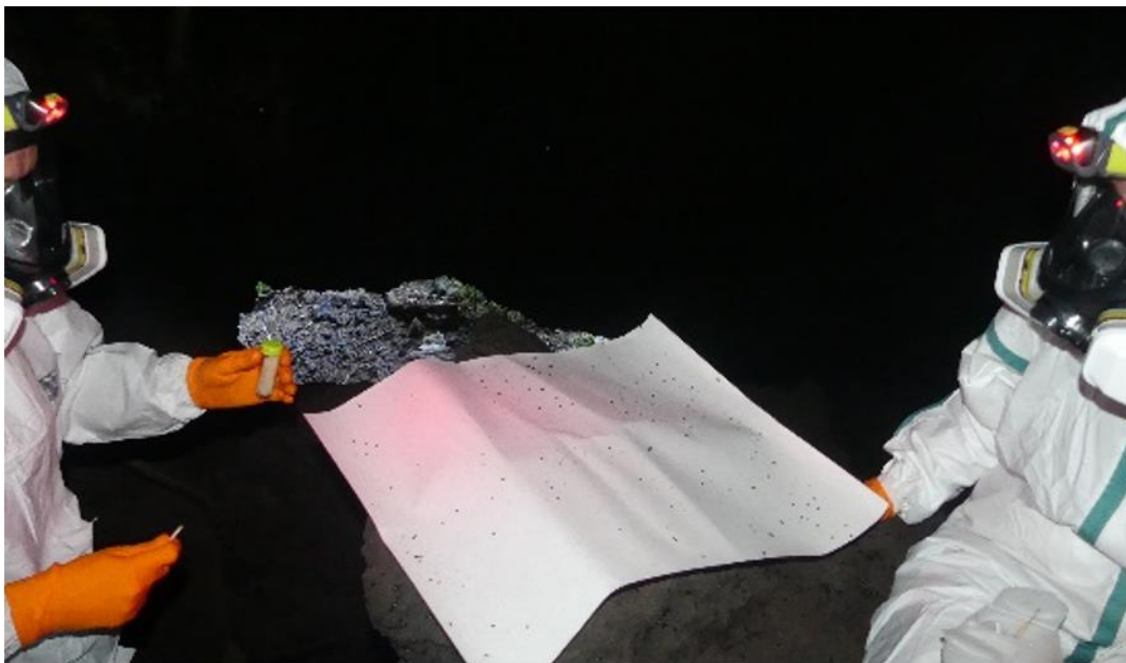
References

- 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, Bartel R, Han BA. 2011 Animal migration and infectious disease risk. *Science* **331**, 296–302. (doi:10.1126/science.1194694)
- 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)
- Peel AJ *et al.* 2014 The effect of seasonal birth pulses on pathogen persistence in wild mammal populations. *Proc. R. Soc. B* **281**, 20132962. (doi:10.1098/rspb.2013.2962)
- Plowright RK *et al.* 2015 Ecological dynamics of emerging bat virus spillover. *Proc. R. Soc. B* **282**, 20142124. (doi:10.1098/rspb.2014.2124)
- Marzal A *et al.* 2016 A longitudinal study of age-related changes in *Haemaphysalis* infection in a passerine bird. *Oikos* **125**, 1092–1099. (doi:10.1111/oik.02778)
- Amman BR *et al.* 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)
- Edson D *et al.* 2019 Time of year, age class and body condition predict Hendra virus infection in Australian black flying foxes (*Pteropus alecto*). *Epidemiol. Infect.* **147**, e240. (doi:10.1017/S0950268819001237)
- Field H *et al.* 2015 Spatiotemporal aspects of Hendra virus infection in pteropid bats (flying-foxes) in eastern Australia. *PLoS ONE* **10**, e0144055. (doi:10.1371/journal.pone.0144055)
- Hayman DTS *et al.* 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)
- 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)
- Mendenhall IH, Skiles MM, Neves ES, Borthwick SA, Low DHW, Liang B, Lee BPY-H, Su YCF, Smith GJD. 2017 Influence of age and body condition on astrovirus infection of bats in Singapore: an evolutionary and epidemiological analysis. *One Heal.* **4**, 27–33. (doi:10.1016/j.onehlt.2017.10.001)
- 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)
- Hayman DTS. 2015 Biannual birth pulses allow filoviruses to persist in bat populations. *Proc. R. Soc. B* **282**, 20142591. (doi:10.1098/rspb.2014.2591)
- Peel AJ, Baker KS, Hayman DTS, Broder CC, Cunningham AA, Fooks AR, Garnier R, Wood JLN, 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)
- Tuttle MD, Stevenson D. 1982 Time and synchrony of parturition. In *Ecology of bats* (ed. TH Kunz), pp. 107–111. New York, NY: Plenum Press.
- Drexler JF, Corman VM, Wegner T, Tateno AF, Zerbini 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)
- Wacharapluesadee S *et al.* 2018 Longitudinal study of age-specific pattern of coronavirus infection in Lyle's flying fox (*Pteropus lylei*) in Thailand. *Virology* **15**, 38. (doi:10.1186/s12985-018-0950-6)
- 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)
- Epstein JH *et al.* 2020 Nipah virus dynamics in bats and implications for spillover to humans. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **117**, 29 190–29 201. (doi:10.1073/pnas.2000429117)
- Anthony SJ *et al.* 2017 Global patterns in coronavirus diversity. *Virus Evol.* **3**, vex012. (doi:10.1093/ve/vex012)
- Annan A *et al.* 2013 Human betacoronavirus 2c EMC/2012-related viruses in bats, Ghana and Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 456–459. (doi:10.3201/eid1903.121503)
- Gloza-Rausch F *et al.* 2008 Detection and prevalence patterns of group 1 coronaviruses in bats, northern Germany. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 626–631. (doi:10.3201/eid1404.071439)
- Joffrin L *et al.* 2020 Bat coronavirus phylogeography in the Western Indian Ocean. *Sci. Rep.* **10**, 6873. (doi:10.1038/s41598-020-63799-7)
- Goodman SM, van Vuuren BJ, Ratrimomanarivo F, Probst J-M, Bowie RCK. 2008 Specific status of populations in the Mascarene Islands referred to *Mormopterus acetabulosus* (Chiroptera: Molossidae), with description of a new species. *J. Mammal.* **89**, 1316–1327. (doi:10.1644/07-MAMM-A-232.1)
- Here L. 2009 Contribution à l'étude des chiroptères de l'île de La Réunion. Répartition et habitats prioritaires en matière de conservation. Master thesis, Université de La Réunion.
- Joffrin L, Hoarau AOG, Lagadec E, Köster M, Ramanantsalama RV, Mavingui P, Lebarbenchon C. 2021 Astrovirus in reunion free-tailed bat (*Mormopterus francoismoutoui*). *Viruses* **13**, 1524. (doi:10.3390/v13081524)
- Lebarbenchon C *et al.* 2017 Astroviruses in bats, Madagascar. *Emerg. Microbes Infect.* **6**, e58. (doi:10.1038/emi.2017.47)
- Muradrasoli S, Mohamed N, Hornyak 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)
- Technelysium Pty. Ltd. 2018 Chromas Lite software.
- QIAGEN. 2018 CLC Sequence Viewer 8.
- R Core Team. 2018 *R: a language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Giles JR, Peel AJ, Wells K, Plowright RK, McCallum H, Restif O. 2021 Optimizing noninvasive sampling of a zoonotic bat virus. *Ecol. Evol.* **11**, 12 307–12 321. (doi:10.1002/ece3.7830)
- 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)
- Baker KS *et al.* 2014 Viral antibody dynamics in a chiropteran host. *J. Anim. Ecol.* **83**, 415–428. (doi:10.1111/1365-2656.12153)
- Epstein JH *et al.* 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)
37. Streicker DG *et al.* 2016 Host-pathogen evolutionary signatures reveal dynamics and future invasions of vampire bat rabies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **113**, 10 926–10 931. (doi:10.1073/pnas.1606587113)
 38. Lacroix A *et al.* 2020 Wide diversity of coronaviruses in frugivorous and insectivorous bat species: a pilot study in Guinea, West Africa. *Viruses* **12**, 855. (doi:10.3390/v12080855)
 39. Baldwin HJ. 2015. Epidemiology and ecology of virus and host: bats and coronaviruses in Ghana, West Africa. PhD thesis, Macquarie University, Sydney, Australia.
 40. Wilkinson DA, Joffrin L, Lebarbenchon C, Mavingui P. 2020 Analysis of partial sequences of the RNA-dependent RNA polymerase gene as a tool for genus and subgenus classification of coronaviruses. *J. Gen. Virol.* **101**, 1261–1269. (doi:10.1099/jgv.0.001494)
 41. Wacharapluesadee S *et al.* 2013 Group C betacoronavirus in bat guano fertilizer, Thailand. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 1349–1351. (doi:10.3201/eid1908.130119)
 42. Gundy PM, Gerba CP, Pepper IL. 2009 Survival of coronaviruses in water and wastewater. *Food Environ. Virol.* **1**, 10. (doi:10.1007/s12560-008-9001-6)
 43. Duan SM *et al.* 2003 Stability of SARS coronavirus in human specimens and environment and its sensitivity to heating and UV irradiation. *Biomed. Environ. Sci.* **16**, 246–255.
 44. 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.
 45. Casanova L, Rutala WA, Weber DJ, Sobsey MD. 2009 Survival of surrogate coronaviruses in water. *Water Res.* **43**, 1893–1898. (doi:10.1016/j.watres.2009.02.002)
 46. Casanova LM, Jeon S, Rutala WA, Weber DJ, Sobsey MD. 2010 Effects of air temperature and relative humidity on coronavirus survival on surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 2712–2717. (doi:10.1128/AEM.02291-09)
 47. Wang XW *et al.* 2005 Study on the resistance of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. *J. Virol. Methods* **126**, 171–177. (doi:10.1016/j.jviromet.2005.02.005)
 48. Lai MYY, Cheng PKC, Lim WWL. 2005 Survival of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Clin. Infect. Dis.* **41**, e67–e71. (doi:10.1086/433186)
 49. Sun Z *et al.* 2020 Survival of SARS-COV-2 under liquid medium, dry filter paper and acidic conditions. *Cell Disc.* **6**, 57. (doi:10.1038/s41421-020-00191-9)
 50. 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)
 51. Phelps KL, Hamel L, Alhmod N, Ali S, Bilgin R, Sidamondize K, Urushadze L, Karesh W, Olival K. 2019 Bat research networks and viral surveillance: gaps and opportunities in western Asia. *Viruses* **11**, v11030240. (doi:10.3390/v11030240)
 52. 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)
 53. Becker DJ, Crowley DE, Washburne AD, Plowright RK. 2019 Temporal and spatial limitations in global surveillance for bat filoviruses and henipaviruses. *Biol. Lett.* **15**, 20190423. (doi:10.1098/rsbl.2019.0423)
 54. 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)
 55. Karesh WB *et al.* 2012 Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. *Lancet* **380**, 1936–1945. (doi:10.1016/S0140-6736(12)61678-X)
 56. Becker DJ, Washburne AD, Faust CL, Mordecai EA, Plowright RK. 2019 The problem of scale in the prediction and management of pathogen spillover. *Phil. Trans. R. Soc. B* **374**, 20190224. (doi:10.1098/rstb.2019.0224)
 57. Allen T, Murray KA, Zambrana-Torrel C, Morse SS, Rondinini C, Di Marco M, 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)
 58. Gibb R, Redding DW, Chin KQ, Donnelly CA, Blackburn TM, Newbold T, Jones KE. 2020 Zoonotic host diversity increases in human-dominated ecosystems. *Nature* **584**, 398–402. (doi:10.1038/s41586-020-2562-8)
 59. Plowright RK, Field HE, Smith C, Divljan A, Palmer C, Tabor G, Daszak P, Foley JE. 2008 Reproduction and nutritional stress are risk factors for Hendra virus infection in little red flying foxes (*Pteropus scapulatus*). *Proc. R. Soc. B* **275**, 861–869. (doi:10.1098/rspb.2007.1260)
 60. Kessler MK *et al.* 2018 Changing resource landscapes and spillover of henipaviruses. *Ann. NY Acad. Sci.* **1429**, 78–99. (doi:10.1111/nyas.13910)
 61. 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)
 62. Albery GF, Eskew EA, Ross N, Olival KJ. 2020 Predicting the global mammalian viral sharing network using phylogeography. *Nat. Commun.* **11**, 2260. (doi:10.1038/s41467-020-16153-4)
 63. 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)
 64. Joffrin L, Hoarau AOG, Lagadec E, Torrontegi O, Köster M, Le Minter G, Dietrich M, Mavingui P, Lebarbenchon C. 2022 Seasonality of coronavirus shedding in tropical bats. Figshare.

Annexe 3. Protocoles d'échantillonnage dans les deux colonies de maternité du Petit Molosse. En haut : échantillonnage sur feuilles de Benchguard © en dessous de la colonie de Trois-Bassins dans la grotte. En bas : Echantillonnage de la colonie de Sainte-Marie. (A) Transformateur électrique. (B) Installation du dispositif de collecte. (C) Collecte des échantillons.

Colonie de maternité de Trois - Bassins



Colonie de maternité de Sainte - Marie



Annexe 4. Hoarau A.O.G., Joffrin L., Dietrich M., Mavingui P., and Lebarbenchon C. Viral infection dynamics and diversity in two Reunion free-tailed bat colonies. Session poster à la conférence intertaniaionale “*Island Biology 2019*”.

Viral infection dynamics and diversity in two Reunion free-tailed bat colonies

Axel O. G. Hoarau¹, Léa Joffrin¹, Muriel Dietrich¹, Patrick Mavingui¹, and Camille Lebarbenchon¹

¹ Université de La Réunion, UMR Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT) INSERM 1187, CNRS 9192, IRD 249 - Sainte-Clotilde, La Réunion



1- BACKGROUND

Bats are natural hosts of many infectious agents. During the past decades, bat-borne viruses have been involved in spillovers to other mammal species, including humans. However, current knowledge on disease epidemiology and ecology is still limited in bat populations.

2- OBJECTIVES

We investigated viral infection dynamics and diversity in the Reunion free-tailed bat (*Mormopterus francoismoutoui*; Family: Molossidae) in two types of habitats, on Reunion Island. We focused on two zoonotic viruses commonly reported in bat populations: Coronavirus (CoV) and Astrovirus (AstV).

4- COV INFECTION DYNAMICS AND DIVERSITY

- 17.3% ($\pm 3\%$) positive samples for CoV (141/814 tested)
- Significant effect of time on prevalence ($P < 0.001$) (Figure 2)
- 3 infection peaks

→ Role of population structure (e.g. age, sexe) and susceptible hosts?

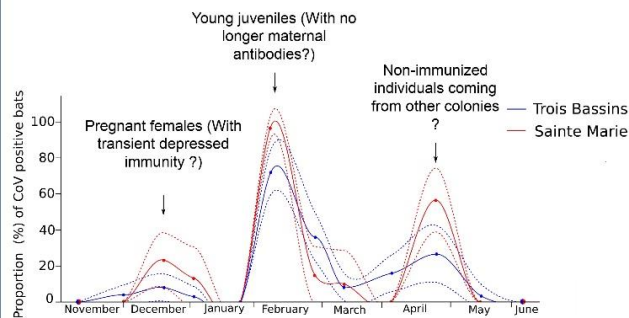


Figure 2: Proportion of CoV positive bats over the breeding season, in Trois Bassins (Blue) and Sainte Marie (Red). The dashed lines represent 95% confidence interval. Dots correspond to sample collection dates. Susceptible hosts which could be potentially implied in the infection peaks are indicated.

- All positive samples: genus α -CoV
- No genetic diversity (100% identical, 179bp)

5- ASTV INFECTION DYNAMICS

- 2.8% ($\pm 1\%$) positive samples for AstV (23/814 tested)
- No effect of time on prevalence ($P = 0.17$) (Figure 3)

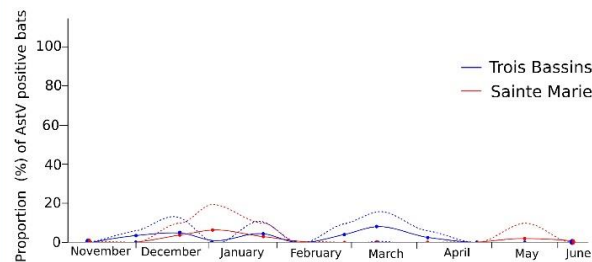


Figure 3: Proportion of AstV positive bats over the breeding season, in Trois Bassins (Blue) and Sainte Marie (Red). The dashed lines represent 95% confidence interval. Dots correspond to sample collection dates.

3- MATERIAL AND METHODS

→ Fresh droppings were collected in two maternity colonies (Figure 1)

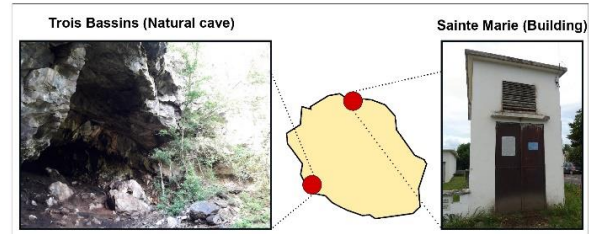


Figure 1: Reunion free-tailed bat colonies. Photographs of the two colonies and their location.

- RNA was extracted and cDNA was synthesized
- CoV and AstV were detected with PCRs targeting RdRp* gene

6- ASTV DIVERSITY

- Detection of viruses genetically related to AstVs usually found in Mammals and Birds (Figure 4)
 - Hosts-shifts because of shared habitats?
- No sequence from Reunion Island in the group including most bat AstVs

→ Limited genetic data available for AstV in Molossidae?

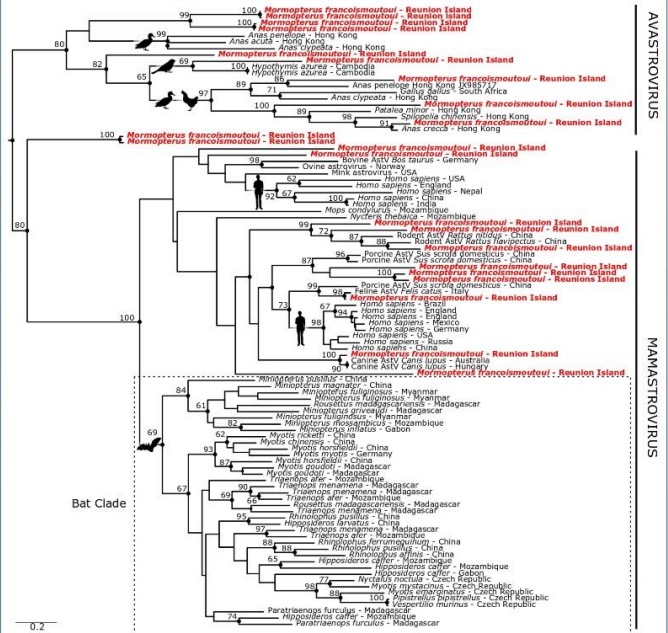


Figure 4: Maximum likelihood consensus phylogram derived from 91 AstV RdRp partial nucleotide sequences (394bp). Taxa names colored in red correspond to sequences obtained from Reunion free-tailed bats in this study. Bootstrap values higher than 60% are reported. Dashed square highlights the bat clade.

CONCLUSIONS

Our study highlights major differences between CoV and AstV infection dynamics and diversity, and a similar pattern between colonies in two distinct habitats (natural vs artificial). Future work will assess the presence of Paramyxovirus in these two colonies to further investigate coinfections and virus interactions in Reunion free-tailed bats.

Acknowledgments: We thank Gildas Le Minter for his assistance in sample collection. Camille Lebarbenchon is supported by a "Chaire mixte: Université de La Réunion - INSERM"; and Axel O. G. Hoarau by a "Contrat doctoral" PhD fellowship from Université de La Réunion.

Corresponding author: axel.o.g.hoarau@gmail.com



Annexe 5. Hoarau A.O.G., Koster M., Le Minter G., Dietrich M., Mavingui P., and Lebarbenchon C. Viral coinfection dynamics in Reunion free-tailed bats (*Mormopterus francoismoutou*). Session poster à la conference internationale “18th Ecology and Evolution of Infectious Diseases” (EEID 2021).

Viral coinfection dynamics in Reunion Free-tailed bats (*Mormopterus francoismoutoui*)

Hoarau AOG, Koster M, Le Minter G, Dietrich M, Mavingui P, Lebarbenchon C

University of Reunion, UMR Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, INSERM 1187, CNRS 9192, IRD 249, Saint Denis, Reunion Island



BACKGROUND

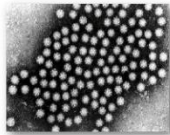


- Coinfection is common in living organisms and affects infection dynamics
- Nevertheless it is understudied in wildlife

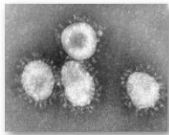


OBJECTIVE

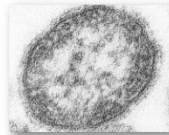
Longitudinal study to assess coinfection dynamics and interaction in a maternity colony



Astrovirus (AstV)



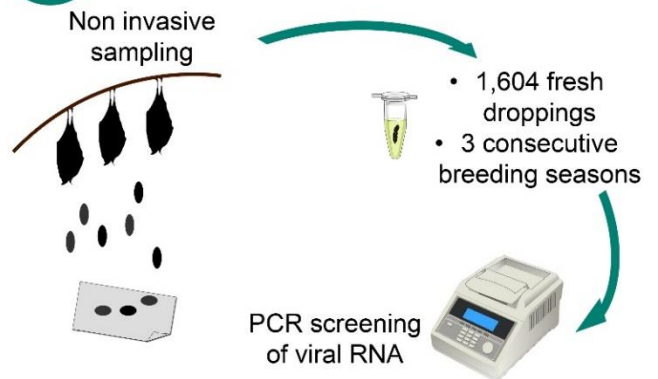
Coronavirus (CoV)



Paramyxovirus (PMV)

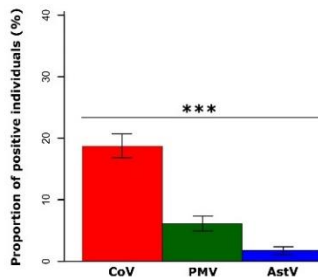


METHODS



RESULTS

A VIRAL DETECTION

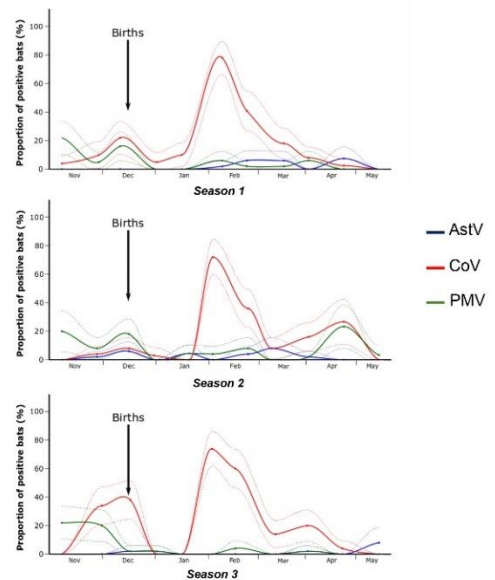


Significant difference between viruses

C COINFECTION

- Only 1.3% ($\pm 0.6\%$) samples positive for two viruses (21/1,604)
- CoV-PMV coinfection more frequently detected ($p < 0.001$)
- No association detected between the viruses

B INFECTION DYNAMICS



Significant effect of time on CoV and PMV prevalence within season ($p < 0.001$)



CONCLUSION

- Coinfection between AstV-CoV-PMV is limited in Reunion Free-tailed bats
- Independent infection dynamics in the maternity colony

Acknowledgments: Axel O. G. Hoarau is supported by a "Contrat doctoral" PhD fellowship from Université de La Réunion. This work was funded by the VIROPTERE program (INTERREG V Océan Indien).


Corresponding author: axel.o.g.hoarau@gmail.com
Twitter: @Ax_hoarau



Annexe 6. Joffrin L., Hoarau A.O.G., Lagadec E., Köster M., Ramanantsalama R.V., Mavingui P., and Lebarbenchon C. 2021. Astrovirus in Reunion free-tailed bat (*Mormopterus francoismoutoui*). *Viruses*. 13 (8), 1524.

Brief Report

Astrovirus in Reunion Free-Tailed Bat (*Mormopterus francoismoutoui*)

Léa Joffrin , Axel O. G. Hoarau, Erwan Lagadec, Marie Köster, Riana V. Ramanantsalama, Patrick Mavingui and Camille Lebarbenchon *

INSERM 1187, CNRS 9192, IRD 249, 2 rue Maxime Rivière, UMR Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT), Université de La Réunion, 97490 Saint Denis de La Réunion, France; lea.joffrin@gmail.com (L.J.); axel.hoarau@univ-reunion.fr (A.O.G.H.); erwan.lagadec69@yahoo.fr (E.L.); marie.koster@univ-reunion.fr (M.K.); riana.ramanantsalama@univ-reunion.fr (R.V.R.); patrick.mavingui@univ-reunion.fr (P.M.)

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

Abstract: Astroviruses (AstVs) are RNA viruses infecting a large diversity of avian and mammalian species, including bats, livestock, and humans. We investigated AstV infection in a free-tailed bat species, *Mormopterus francoismoutoui*, endemic to Reunion Island. A total of 380 guano samples were collected in a maternity colony during 38 different sampling sessions, from 21 June 2016 to 4 September 2018. Each sample was tested for the presence of the AstV RNA-dependent RNA-polymerase (RdRp) gene using a pan-AstV semi-nested polymerase chain reaction assay. In total, 27 guano samples (7.1%) tested positive, with high genetic diversity of the partial RdRp gene sequences among positive samples. Phylogenetic analysis further revealed that the detected viruses were genetically related to AstVs reported in rats, reptiles, dogs, and pigs, but did not cluster with AstVs commonly found in bats. Although more investigations need to be conducted to assess the prevalence of infected bats in the studied population, our findings show that Reunion free-tailed bats are exposed to AstVs, and suggest that cross-species transmission may occur with other hosts sharing the same habitat.

Keywords: Astroviridae; Molossidae; Reunion Island; Indian Ocean



check for updates

Citation: Joffrin, L.; Hoarau, A.O.G.; Lagadec, E.; Köster, M.; Ramanantsalama, R.V.; Mavingui, P.; Lebarbenchon, C. Astrovirus in Reunion Free-Tailed Bat (*Mormopterus francoismoutoui*). *Viruses* **2021**, *13*, 1524. <https://doi.org/10.3390/v13081524>

Academic Editors: Kateri Bertran, Martí Cortey and Miria F. Criado

Received: 4 June 2021

Accepted: 27 July 2021

Published: 2 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Astroviruses (AstVs; Family *Astroviridae*) are positive-sense single-stranded RNA viruses and have been detected in a large diversity of mammalian and avian species [1]. In humans, eight serotypes have been described worldwide, accounting for 2–9% of acute non-bacterial gastro-enteritis cases in children [2]. AstVs are also responsible for diseases in livestock, poultry, and domestic pets [1]. In wild animals, they have been mostly described in bats [3] and in aquatic birds [4], although detection in other hosts has been reported, such as in marine mammals [5] and in non-human primates [6]. In addition to this large host diversity, the evolutionary history of AstVs is characterized by frequent cross-species transmission events [7], supporting limited host specificity and a risk of spillover and emergence in humans [8].

AstVs have been reported in African insectivorous bats, in particular in species of the *Miniopteridae* and *Rhinonycteridae* families [9–12]. Detection rates vary greatly depending on the study design and the tested species [3], and the prevalence of bat shedding AstVs within populations is also highly variable. For instance, we estimated the prevalence of shedding bats ranging from 20% to 81% for *Triaenops afer* in Mozambique, depending on the time of sample collection [9]. Such a strong seasonality has been reported in both tropical and temperate regions and could be associated to bat population dynamics, in particular in maternity colonies (e.g., an increase in the population size and density during the formation of the colony; [13]). Body condition and co-infection with other viruses have also been identified to be positively correlated with AstV infection in bats [14,15].

The islands of the Western Indian Ocean host eleven of the twenty bat families described worldwide [16], with a highly contrasted diversity pattern between islands. Madagascar shelters 46 bat species, of which nearly 80% are endemic [17,18]. In contrast, the small oceanic islands surrounding Madagascar are inhabited by a limited number of bat species. For instance, only three species occur on Reunion Island, and only one of them, the Reunion free-tailed bat (RFTB; *Mormopterus francoismoutoui*; Molossidae), is endemic to the island.

RFTB is the most abundant bat species on Reunion Island. This small insectivorous species roosts in large colonies in natural caves and synanthropic habitats such as bridges and houses [19]. Based on guano sampling in an RFTB maternity colony, we investigated the temporal variation in AstV shedding for more than 2 years (28 consecutive months), with a particular emphasis on the parturition period. Partial sequencing of the AstV RNA-dependent RNA-polymerase (RdRp) gene and phylogenetic analyses were performed to assess the diversity and the origin of the detected viruses.

2. Material and Methods

The study was conducted in the main RFTB colony known to date on Reunion island, within a natural cave of 30 m³ on the West coast of the island (21,111° S, 55,259° E). The colony is monospecific and mostly composed of adult females during the early stages of the breeding season (October to December); and of neonates and juveniles, after the parturition period (from mid-December onward; Dietrich et al., 2015). Between 40,000 and 50,000 flying adult bats have been estimated before parturition; however, after the breeding season, the cave remains totally empty from bats (May to September) [20].

A non-invasive sampling was set up to limit colony disturbance. During each sampling session, we collected guano samples in the narrowest part of the cave entrance, in ten different sampling points separated by 50 cm along a 4.5 m transect (Supplementary Figures S1 and S2). Sterile open-ended 2 mL syringes were used to collect a core sample, in order to obtain c. 130 mg of guano. Each guano sample was immediately mixed with 1.5 mL of Virus Transport Media (VTM; e.g., [21]). Samples were maintained in a cooler with ice packs in the field and stored in a −80 °C freezer within two hours.

In total, 380 samples were collected during 38 different sampling sessions between 21 June 2016 and 4 September 2018. During each sampling session, the colony was visually monitored in order to classify the relative population size (no bat, less than half of the cave covered with bats, and more than half of the cave covered), and to assess the population age, structure, and timing of parturition based on the presence of adults, neonates, and juveniles.

Guano samples were mixed and centrifuged at 1500 × g for 15 min. RNA extraction was performed on 140 µL of supernatant, with the QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA). Reverse-transcription was done on 10 µL of RNA using the ProtoScript II Reverse Transcriptase and Random Primer 6 (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) [21]. cDNAs were tested for the presence of the AstV RdRp gene using a pan-AstV semi-nested polymerase chain reaction (PCR) assay [22]. PCR products of the expected size were submitted for direct Sanger sequencing (Genoscreen, Lille, France). Chi-square tests were conducted to investigate the effects of the sampling date and the sampling location in the transect, on the probability of successful detection of the AstV RdRp gene. Statistical analyses were conducted with R 3.4.4 [23].

A phylogenetic analysis was performed on the RdRp gene sequences obtained in this study (GenBank accession numbers MK966904 to MK966918, and MZ274075 to MZ274086) and 84 reference RdRp sequences of AstVs detected in a large diversity of bat species, in particular from Africa (Madagascar, Mozambique, and Gabon), as well as in other vertebrate hosts (e.g., avian, human, and livestock). Sequences were aligned with the CLC Sequence Viewer 8.0 (CLC Bio, Aarhus, Denmark). Maximum-likelihood analysis was conducted using PhyML 3.1 [24], with an evolutionary model selected by Model Generator 0.85 (GTR + I + Γ I = 0.13, α = 0.83; [25], and 1000 bootstraps.

3. Results and Discussion

In total, 27 guano samples (7.1%) tested positive for the presence of AstV, without differences between the sampling location along the transect ($\chi^2 = 11.8$; $df = 9$; $p = 0.23$). Although no variation was observed between the two sampling seasons ($\chi^2 = 0.17$; $df = 1$; $p = 0.68$), significant differences in the number of positive samples between sampling dates were detected ($\chi^2 = 74.8$; $df = 37$; $p < 0.001$), with AstVs mostly detected after the parturition period (late December), in February and March (Figure 1). This pattern suggests a potential effect of the population age structure [14] rather than changes in size and density associated with the formation of the colony [13]. A previous investigation on paramyxovirus and *Leptospira* spp. infection dynamics in the same bat colony revealed two peaks of infection: one during the colony formation and the other two months after the birth pulse [20]. The latter may coincide with the detection of most AstVs in February and March, and the first one with the positive samples detected in December. Although these results support the occurrence of AstV RNA in the RFTB environment, our sampling design precludes further conclusions on the prevalence of shedding bats in the population. Bat individual sampling is needed to further support AstV infection in RFTB and identify population-related factors involved in the temporal and spatial transmission dynamics.

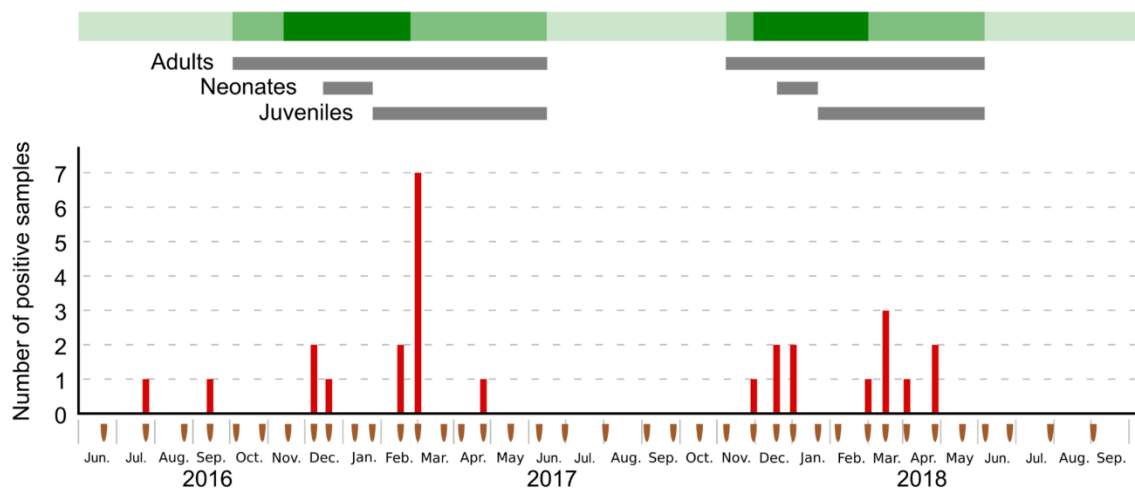


Figure 1. Number of Astrovirus positive guano samples as per sampling session (brown marks). Ten samples were collected during each sampling session. Green shading indicates the relative bat population size: light green: no bat inside the cave, mid-green: less than half of the cave occupied by bats, dark green: more than half of the cave occupied by bats. Presence of adults, neonates, and juveniles bats is represented by gray bars.

Two samples collected before the breeding season (in July and September 2016), when the cave was not occupied by bats, also tested positive for AstV, and suggest a possible environmental persistence of AstV RNA in bat guano. AstV persistence in the environment could potentially favor bat infection during cave colonization at the beginning of the breeding season, but also create an opportunity for virus spillover to other vertebrate hosts. Rats (*Rattus rattus*) have been sighted in the vicinity and within the cave during the study period, and previous studies have shown that paramyxoviruses may be transmitted between rats and RFTB in the studied cave [20]. Bat guano is also used as a fertilizer for agricultural crops, worldwide, and is regularly harvested on a small scale by local farmers for personal use [26]. At our study site, bat guano was indeed harvested in the cave entrance throughout the course of the breeding season. The detection of viral RNA does not provide evidence of the maintenance of infectious particles in bat guano and virus isolation would be required to experimentally assess the infectious ability of bat AstVs outside their hosts. However, transmission routes of bat viruses to humans remain

unclear [27], and given the high propensity of AstVs for cross-species transmission [7], our finding underlines that the risk of AstV spillover from bats to human should be fully investigated.

Analysis of the 27 RdRp partial sequences revealed a high genetic diversity (up to 49% of partial RdRp sequence differences). This finding is consistent with previous studies on bat AstVs in Madagascar [21], continental Africa [9–12], and other bat populations, worldwide. Such a high level of sequence diversity in a single bat species nevertheless contrasts with the low diversity measured for paramyxovirus and *Leptospira* in the same colony [20]). Classification of AstV based on host species origin has been largely challenged for the past years [28] because AstVs isolated from different animal species can be genetically similar [9,11,21], but also because genetically different viruses can be isolated from a single species [11,29]. To improve AstVs classification, the International Committee on Taxonomy of Virus now recommends comparing the AstV RdRp gene to capsid gene sequences [2], although sequencing of the capsid remains challenging for bat-origin AstVs.

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

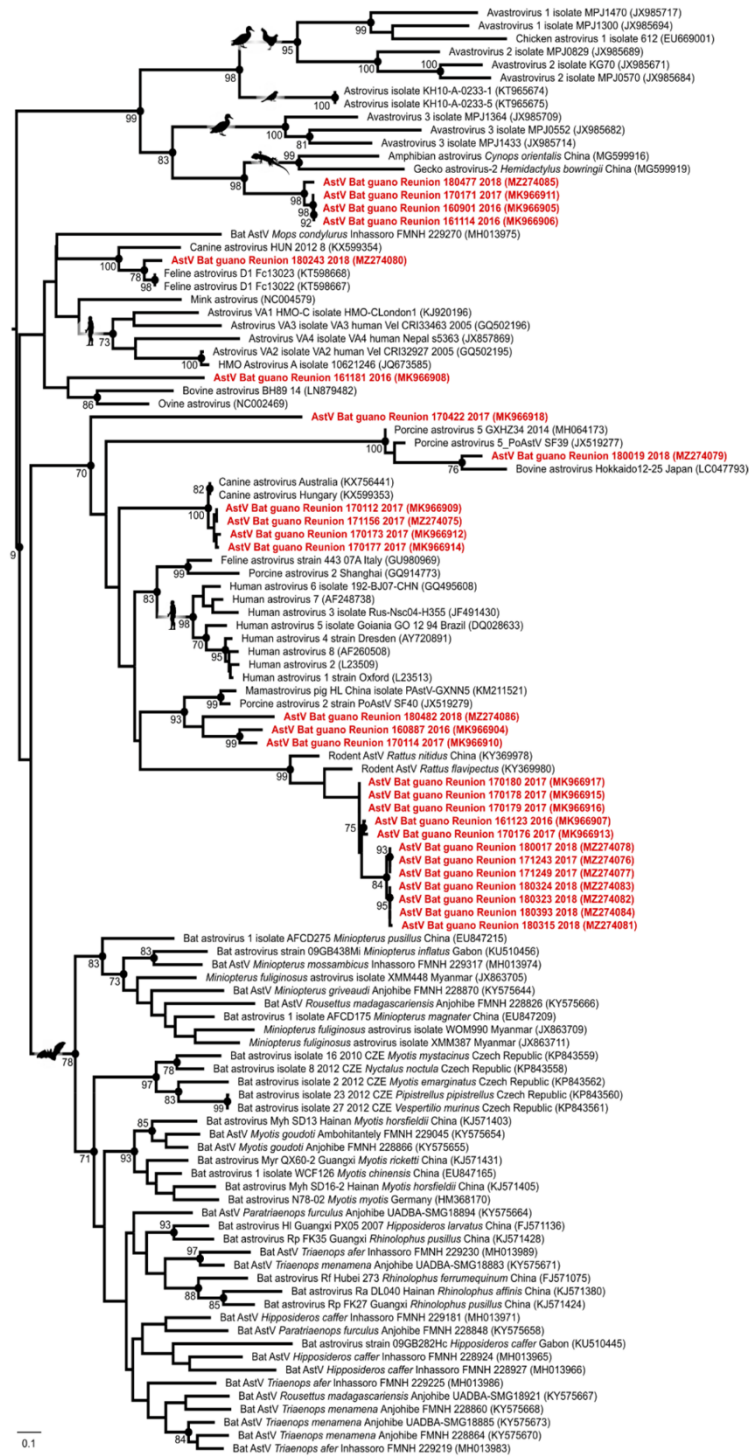


Figure 2. Maximum likelihood consensus tree derived from 111 Astrovirus (AstV) RNA-dependent polymerase partial nucleotide sequences (390 bp). Black dots indicate nodes with bootstrap values higher or equal than 70. Red: sequences generated in this study. Scale bar: mean number of nucleotide substitutions per site.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v13081524/s1>, Figure S1: Cave entrance of the studied colony, Figure S2: Sampling transect at the cave entrance.

Funding: This study was funded by the VIROPTERE program (INTERREG V Océan Indien). Léa Joffrin was supported by a “Région Réunion, European Regional Development Funds (FEDER 2014–2020)” PhD fellowship, Axel Hoarau by a “Ministère de l’Enseignement supérieur, de la Recherche et de l’Innovation” PhD fellowship, and Camille Lebarbenchon by a “Chaire Mixte Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)—Université de La Réunion”.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data are available as part of this publication, in the Supplementary Materials and sequence accession numbers cited in the manuscript.

Acknowledgments: We thank Muriel Dietrich and Nicolas Diotel for their assistance in the field.

Conflicts of Interest: The authors have no conflict of interests.

References

- 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*, 1529–1544. [\[CrossRef\]](#)
- Bosch, A.; Guix, S.; Krishna, N.K.; Méndez, E.; Monroe, S.S.; Pantin-Jackwood, M.; Schultz-Cherry, S. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*; King, A.M.Q., Lefkowitz, E., Adams, M.J., Carstens, E., Eds.; Elsevier: San Diego, CA, USA, 2011.
- Fischer, K.; dos Reis, V.P.; Balkema-buschmann, A. Bat Astroviruses: Towards understanding the transmission dynamics of a neglected virus family. *Viruses* **2017**, *9*, 34. [\[CrossRef\]](#)
- Chu, D.K.W.; Leung, C.Y.H.; Perera, H.K.K.; Ng, E.M.; Gilbert, M.; Joyner, P.H.; Poon, L.L.M. A novel group of avian astroviruses in wild aquatic birds. *J. Virol.* **2012**, *86*, 13772–13778. [\[CrossRef\]](#)
- Rivera, R.; Nollens, H.H.; Venn-Watson, S.; Gulland, F.M.D.; Wellehan, J.F.X. Characterization of phylogenetically diverse astroviruses of marine mammals. *J. Gen. Virol.* **2010**, *91*, 166–173. [\[CrossRef\]](#)
- Karlsson, E.A.; Small, C.T.; Freiden, P.; Feeroz, M.M.; Matsen, F.A.; San, S.; Schultz-Cherry, S. Non-human primates harbor diverse mammalian and avian astroviruses including those associated with human infections. *PLoS Pathog.* **2015**, *11*, e1005225. [\[CrossRef\]](#)
- Mendenhall, I.H.; Smith, G.J.D.; Dhanasekaran, V. Ecological drivers of virus evolution: Astrovirus as a case study. *J. Virol.* **2015**, *89*, 6978–6981. [\[CrossRef\]](#)
- Bosch, A.; Pinto, R.M.; Guix, S. Human Astroviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **2014**, *27*, 1048–1074. [\[CrossRef\]](#)
- Hoarau, F.; Le Minter, G.; Joffrin, L.; Schoeman, M.C.; Lagadec, E.; Ramasindrazana, B.; Lebarbenchon, C. Bat astrovirus in Mozambique. *Virol. J.* **2018**, *15*, 1–5. [\[CrossRef\]](#)
- Rougeron, V.; Suquet, E.; Maganda, G.D.; Jiolle, D.; Mombo, I.M.; Bourgarel, M.; Leroy, E.M. Characterization and phylogenetic analysis of new bat astroviruses detected in Gabon, Central Africa. *Acta Virol.* **2016**, *60*, 386–392. [\[CrossRef\]](#)
- Waruhiu, C.; Ommeh, S.; Obanda, V.; Agwanda, B.; Gakuya, F.; Ge, X.Y.; Shi, Z.L. Molecular detection of viruses in Kenyan bats and discovery of novel astroviruses, caliciviruses and rotaviruses. *Virol. Sin.* **2017**, *32*, 101–114. [\[CrossRef\]](#)
- Yinda, C.K.; Ghogomu, S.M.; Conceição-Neto, N.; Beller, L.; Deboutte, W.; Vanhulle, E.; Matthijssens, J. Cameroonian fruit bats harbor divergent viruses, including rotavirus H, bastroviruses, and picobirnaviruses using an alternative genetic code. *Virus Evol.* **2018**, *4*, 1–15. [\[CrossRef\]](#)
- Drexler, J.F.; Corman, V.M.; Wegner, T.; Tateno, A.F.; Zerbinati, R.M.; Gloza-Rausch, F.; Drosten, C. Amplification of emerging viruses in a bat colony. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 449–456. [\[CrossRef\]](#)
- Mendenhall, I.H.; Skiles, M.M.; Neves, E.S.; Borthwick, S.A.; Low, D.H.W.; Liang, B.; Smith, G.J.D. Influence of age and body condition on astrovirus infection of bats in Singapore: An evolutionary and epidemiological analysis. *One Health* **2017**, *4*, 27–33. [\[CrossRef\]](#)
- Seltmann, A.; Corman, V.; Rasche, A.; Drosten, C.; Czirjak, G.; Bernard, H.; Voigt, C. Seasonal fluctuations of astrovirus, but not coronavirus shedding in bats inhabiting human-modified tropical forests. *Ecohealth* **2017**, *14*, 272–284. [\[CrossRef\]](#)
- Goodman, S.M. *Les Chauves-Souris de Madagascar*; Association Vahatra: Antananarivo, Madagascar, 2011.
- Goodman, S.M.; Schoeman, M.C.; Rakotoarivelo, A.; Willows-Munro, S. How many species of *Hipposideros* have occurred on Madagascar since the Late Pleistocene? *Zool. J. Linn. Soc.* **2016**, *177*, 428–449. [\[CrossRef\]](#)
- Foley, N.M.; Goodman, S.M.; Whelan, C.V.; Puechmaile, S.J.; Teeling, E. Towards navigating the Minotaur’s labyrinth: Cryptic diversity and taxonomic revision within the speciose genus *Hipposideros* (Hipposideridae). *Acta Chiropterologica* **2017**, *19*, 1–18. [\[CrossRef\]](#)

19. Goodman, S.M.; Jansen van Vuuren, B.; Ratrimomanarivo, F.; Probst, J.; Bowie, R.; Group, E.G.; Re, L. Specific status of populations in the mascarene islands referred to *Mormopterus acetabulosus* (chiroptera: Molossidae), with description of a new species. *J. Mammal.* **2008**, *89*, 1316–1327. [[CrossRef](#)]
20. Dietrich, M.; Wilkinson, D.A.; Benlali, A.; Lagadec, E.; Ramasindrazana, B.; Dellagi, K.; Tortosa, P. Leptospira and paramyxovirus infection dynamics in a bat maternity enlightens pathogen maintenance in wildlife. *Environ. Microbiol.* **2015**, *17*, 4280–4289. [[CrossRef](#)]
21. Lebarbenchon, C.; Ramasindrazana, B.; Joffrin, L.; Bos, S.; Lagadec, E.; Le Minter, G.; Mavingui, P. Astroviruses in bats, Madagascar. *Emerg. Microbes Infect.* **2017**, *6*, e58. [[CrossRef](#)]
22. Chu, D.K.W.; Poon, L.L.M.; Guan, Y.; Peiris, J.S.M. Novel astroviruses in insectivorous bats. *J. Virol.* **2008**, *82*, 9107–9114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. In *R Foundation for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2018.
24. Guindon, S.; Dufayard, J.-F.; Lefort, V.; Anisimova, M.; Hordijk, W.; Gascuel, O.; Gascuel, O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* **2010**, *59*, 307–321. [[CrossRef](#)]
25. Keane, T.M.; Creevey, C.J.; Pentony, M.M.; Naughton, T.J.; McInerney, J.O. 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. [[CrossRef](#)]
26. Mildenstein, T.; de Jong, C. Natural history, ecological and socio-economic value of bats. In *Investigating the Role of Bats in Emerging Zoonoses*; Newman, S.H., Field, H., Epstein, J., de Jong, C., Eds.; FAO Animal, Food and Agriculture Organisation of the United Nations: Rome, Italy, 2011; pp. 15–28.
27. Joffrin, L.; Dietrich, M.; Mavingui, P.; Lebarbenchon, C. Bat pathogens hit the road: But which one? *PLoS Pathog.* **2018**, *14*, e1007134. [[CrossRef](#)]
28. Donato, C.; Vijaykrishna, D. The broad host range and genetic diversity of mammalian and avian astroviruses. *Viruses* **2017**, *9*, 102. [[CrossRef](#)]
29. Yi, S.; Niu, J.; Wang, H.; Dong, G.; Guo, Y.; Dong, H.; Hu, G. Molecular characterization of feline astrovirus in domestic cats from Northeast China. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0205441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]