



Master GIZMAT

« Gestion Intégrée des Zoonoses et des Maladies Animales Tropicales »

Rapport de stage

Identifier l'excrétion virale dans l'environnement en Coronavirus, Astrovirus et Hantavirus par des chauves-souris frugivores *Artibeus jamaicensis* au Mexique afin de caractériser l'intérêt des prélèvements de fèces pour la surveillance de zoonoses



Laboratoire Mixte International ELDORADO

Mérida, Mexique



Présenté par **Bastien MALINGE**

Sous la direction de **Dr. Audrey ARNAL** (Chargée de recherche, IRD, MIVEGEC)
et **Dr. Benjamin ROCHE** (Directeur de recherche, IRD, MIVEGEC)

Réalisé du **15 janvier 2024 au 14 juin 2024**

Soutenu le 27 juin 2024

RÉSUMÉ

Les chauves-souris, de par leur tolérance immunitaire unique, hébergent de nombreux virus transmissibles à l'espèce humaine (zoonotiques). Parmi eux, les Coronavirus, les Hantavirus et les Astrovirus sont des pathogènes d'importance sanitaire mondiale et peuvent constituer un risque particulier pour la santé humaine dans la péninsule du Yucatán. En effet, cette région du Mexique possède une biodiversité importante mais l'humain exerce une forte pression sur l'environnement (déforestation, cultures agricoles et élevage). L'excrétion environnementale de virus par les chauves-souris, via les fèces notamment, peut constituer un facteur de risque dans l'émergence et la transmission de virus zoonotiques à l'humain. Cette étude a pour but d'identifier l'intérêt des prélèvements de fèces fraîches dans la surveillance virale. Pour cela, l'analyse de 153 prélèvements individuels de fèces fraîches, 37 écouvillons rectaux et 89 prélèvements de sang a été réalisé chez deux colonies de l'espèce *Artibeus jamaicensis* dans la péninsule du Yucatán. Tandis que la recherche des trois virus par PCR dans la totalité de ces échantillons n'a abouti à la détection d'aucun virus, cette étude permet de discuter des facteurs écologiques et environnementaux qui peuvent influencer les prévalences et l'excrétion virale chez les chauves-souris, ainsi que d'aborder le choix et l'optimisation des méthodes de prélèvements et des protocoles de détection des virus utilisés.

Mots clés : chauve-souris ; fèces ; zoonoses ; Coronavirus ; Astrovirus ; Hantavirus ; Mexique

ABSTRACT

Bats, due to their unique immune tolerance, harbor numerous viruses transmissible to humans (zoonotic). Among them, Coronaviruses, Hantaviruses and Astroviruses are pathogens of global health importance and may pose a particular risk to human health in the Yucatán Peninsula. Indeed, this region of Mexico arbore a significant biodiversity but humans exert strong pressure on the environment (deforestation, agriculture and livestock industry). Environmental excretion of viruses by bats, particularly via feces, may constitute a risk factor in the emergence and transmission of zoonotic viruses to humans. This study aims to identify the value of fresh fecal samples in viral surveillance. For this, the analysis of 153 individual samples of fresh feces, 37 rectal swabs and 89 blood samples was carried out in two colonies of the species *Artibeus jamaicensis* in the Yucatán Peninsula. While the search for the three viruses by PCR in all of these samples did not result in the detection of any viruses, this study allows us to discuss the ecological and environmental factors that can influence the prevalence and viral excretion in bats, as well as addressing the choice and optimization of sampling methods and virus detection protocols that were used.

Key words: bat; feces; zoonosis; Coronavirus; Astrovirus; Hantavirus; Mexico

Sommaire

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| RÉSUMÉ | 2 |
| INTRODUCTION | 4 |
| Maladies émergentes zoonotiques | 4 |
| Chauves-souris et virus zoonotiques | 4 |
| Les chauves-souris comme hôte réservoir de virus | 4 |
| Écologie et dynamiques d'infection et d'excrétion des chauves-souris..... | 5 |
| Région, espèce de chauves-souris et virus étudiés | 7 |
| La péninsule du Yucatán, Mexique | 7 |
| La chauve-souris frugivore de la Jamaïque <i>Artibeus jamaicensis</i> | 8 |
| Coronavirus | 9 |
| Astrovirus | 11 |
| Hantavirus | 12 |
| Objectifs de l'étude..... | 14 |
| MATÉRIEL ET MÉTHODE | 15 |
| Colonies étudiées, capture des individus et méthodes de prélèvement | 15 |
| Sélection des sites de prélèvement | 15 |
| Prélèvements des fèces..... | 16 |
| Capture des chauves-souris | 17 |
| Prélèvements sanguins et écouvillons rectaux..... | 17 |
| Traitement des échantillons : extraction de l'ARN total, RT et PCR..... | 18 |
| RÉSULTATS | 20 |
| Chauves-souris capturées..... | 20 |
| Échantillons collectés et virus détectés | 21 |
| DISCUSSION | 22 |
| Détection d'aucun des trois virus dans les prélèvements | 22 |
| Protocoles de prélèvement et de détection des virus | 22 |
| Excrétion virale épisodique chez les chauves-souris | 24 |
| Taille de l'échantillon..... | 25 |
| Perspectives et recommandations..... | 25 |
| Comprendre les dynamiques d'infection chez les chauves-souris du Yucatán | 25 |
| Intérêt des prélèvements de fèces | 26 |
| RÉFÉRENCES | 27 |
| REMERCIEMENTS | 33 |

INTRODUCTION

Maladies émergentes zoonotiques

Parmi les épidémies majeures de ces dernières décennies se trouvent le Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV), le Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV), le virus d'Ébola, la rage humaine, le Virus de l'Immunodéficience Humaine (HIV), les gripes porcine et aviaire ou encore plus récemment la pandémie de SARS-CoV-2 (Baker et al., 2022). Ces épidémies ont toutes un point commun : elles sont toutes dues à des agents zoonotiques, c'est à dire transmis entre l'animal et l'humain. En effet, il est aujourd'hui admis que 75% des maladies émergentes et ré-émergentes sont d'origine zoonotique (Jones et al., 2008). L'augmentation progressive de la fréquence d'émergence de ces zoonoses peut être expliquée par plusieurs facteurs. L'augmentation de la population humaine, associée au phénomène de globalisation, entraîne une pression anthropique importante sur l'environnement (expansion des populations, urbanisation, déforestation, agriculture intensive...). Parmi les nombreuses conséquences de ce phénomène, une augmentation de la fréquence des contacts entre humains, faune sauvage et animaux domestiques a été constatée, ainsi qu'une diminution de la biodiversité mondiale (Jones et al., 2013). Pour un agent pathogène donné, une augmentation de la proportion d'un de ses hôtes compétents par rapport aux hôtes non compétents au sein d'un écosystème induit une amplification de la transmission de ce pathogène (Keesing and Ostfeld, 2021). Un niveau de biodiversité élevé permet ainsi d'avoir une plus forte proportion des hôtes non compétents et donc diluer la transmission de l'agent pathogène : il s'agit de l'« effet de dilution » (Keesing and Ostfeld, 2021). La pression anthropique peut aussi augmenter le stress dans les populations animales de façon chronique, ce qui induit une diminution de l'immunité et une augmentation de la prévalence de certains agents pathogènes zoonotiques (Plowright et al., 2011; Warmuth et al., 2023). Enfin, le réchauffement climatique, également causé par les activités humaines, peut augmenter la transmission de maladies infectieuses en modifiant significativement les températures et taux d'humidité de certaines régions. Ces conséquences du réchauffement climatique peuvent affecter à la fois les agents pathogènes (par exemple en augmentant la résistance dans l'environnement de certains virus), les vecteurs (en diminuant la durée de leurs cycles larvaire) et les hôtes (en diminuant leur immunité) (Zain et al., 2024). En ajoutant à tous ces facteurs l'augmentation de la population humaine mondiale et l'explosion des transports de personnes sur la planète (le nombre de passagers du transport aérien a plus que doublé entre 2000 et 2019, Baker et al., 2022), on obtient un terrain favorable à l'émergence et la diffusion de maladies infectieuses zoonotiques dans le monde, pouvant engendrer des pandémies.

Chauves-souris et virus zoonotiques

Les chauves-souris comme hôte réservoir de virus

La faune sauvage tient ainsi une place cruciale dans l'émergence et la réémergence de maladies infectieuses zoonotiques. Alors que les contacts entre humains et faune sauvage ne font qu'augmenter à cause des activités humaines, celle-ci fait office d'hôte réservoir, c'est-à-dire qu'elle peut maintenir des agents pathogènes de façon permanente et les transmettre à une population susceptible (Cui et al., 2023). Parmi cette faune sauvage, les chauves-souris, de l'ordre des

chiroptères (*Chiroptera*), sont aujourd’hui considérées comme un réservoir incontesté de virus zoonotiques (Cui et al., 2023; Letko et al., 2020). Avec plus de 1400 espèces décrites à ce jour, les chiroptères sont le deuxième ordre des mammifères le plus diversifié en termes d’espèces (derrière l’ordre des rongeurs) et sont retrouvés sur tous les continents de la planète, excepté les pôles (Hao et al., 2023). Cette diversité d’espèces est associée à une diversité importante de virus qu’elles hébergent, notamment de virus zoonotiques (Mollentze and Streicker, 2020). Elles sont par exemple réservoirs de nombreux Coronavirus (SARS-CoV, MERS-CoV...), de Filovirus (virus d’Ebola et de Margburg), de Lyssavirus (virus de la rage) ou encore de Paramyxovirus (virus Nipah et virus de Hendra) (Letko et al., 2020). À ce jour, environ 4100 espèces de virus appartenant à 23 familles virales ont été détectés et séquencés chez 196 espèces les chauves-souris (Chen et al., 2014; Liu et al., 2024), dont 45% sont zoonotiques selon la classification de l’*International Committee on Taxonomy of Viruses* de 2011 (Luis et al. 2013).

Cette diversité de virus peut être expliquée par une particularité qui distingue les chauves-souris : elles peuvent héberger la plupart des virus sans présenter de signes cliniques (Gupta et al., 2021). Une des explications de ce phénomène est liée à leur aptitude au vol. En effet, leur température corporelle et leur métabolisme (l’énergie dépensée par unité de temps) augmentent fortement lorsqu’elles sont en vol. Par rapport à l’état de repos, le métabolisme des chauves-souris est ainsi multiplié par 16, alors qu’il ne l’est que par 7 pour des rongeurs à l’effort et par 2 chez les la plupart des oiseaux (O’Shea et al., 2014). Lors du vol, la température des chauves-souris de l’espèce *Artibeus jamaicensis* peut par exemple atteindre 41°C (Morrison and McNab, 1967). Ce métabolisme particulier simulerait un « état de fièvre » qui les rendrait tolérantes aux infections virales. Les virus sélectionnés sont ainsi moins pathogènes pour leur hôte, ce qui facilite le phénomène de coévolution entre virus et chauves-souris (O’Shea et al., 2014). Enfin, le système immunitaire des chauves-souris possède de nombreuses spécificités. Celles-ci présentent notamment un équilibre unique entre la défense de l’hôte et la tolérance immunitaire, ce qui leur permet de résister aux infections virales sans contracter de signes cliniques (Irving et al., 2021). L’ensemble de ces facteurs permettrait ainsi de faciliter le port asymptomatique de virus chez les chauves-souris.

Écologie et dynamiques d’infection et d’excrétion des chauves-souris

La tolérance immunitaire des chauves-souris vis-à-vis des virus leur permet de ne pas présenter de signes cliniques, mais ne les empêche pas d’héberger et d’excréter des virus dans l’environnement. L’excrétion de virus par les chauves-souris infectées est un phénomène complexe et multifactoriel. Au sein d’une colonie infectée, il a été constaté dans différentes études que l’excrétion de virus n’était pas constante au cours du temps, et qu’elle dépendait de nombreux facteurs écologiques et environnementaux (Amman et al., 2012; Eby et al., 2023; Geldenhuys et al., 2023; Plowright et al., 2015). Les niveaux d’excrétion virale élevés de manière épisodique peuvent être expliqués par deux types de dynamique de transmission faisant intervenir des mécanismes physiologiques et épidémiologiques différents (Plowright et al., 2016). Dans le premier cas, une colonie de chauves-souris peut être infectée de façon permanente mais excréter le virus de manière épisodique, sous l’effet d’un stress (causés par des facteurs écologiques propres à l’espèce ou environnementaux). Dans le deuxième cas, une excrétion épisodique peut être observée dans une colonie de chauves-souris qui redevient indemne après chaque période infectieuse, mais qui est régulièrement réinfectée par une nouvelle souche du virus réintroduite dans la colonie (Plowright et al., 2016).

Dans le premier cas, lorsqu'une population de chauve-souris est infectée de façon permanente par un virus, l'excrétion virale épisodique peut être expliquée par une alternance entre des phases d'immunité de groupe importante, et des phases d'immunité de groupe diminuée (ce qui augmente le nombre d'individus infectieux et donc l'excrétion virale). Cette baisse de l'immunité de groupe peut être causée par des facteurs écologiques, propres à l'espèce concernée, ou par des facteurs extérieurs, c'est-à-dire environnementaux. Tout d'abord, parmi ces facteurs écologiques, celui qui semble avoir le plus d'effet sur l'excrétion est la période de sevrage (associée à l'augmentation du nombre de juvéniles). Une augmentation significative de l'excrétion virale dans l'environnement durant cette période a été démontrée par plusieurs études, et ce pour des virus, des espèces de chauves-souris et des régions du monde diverses. C'est par exemple le cas pour les CoV chez *Rousettus aegyptiacus* en Afrique du Sud (Geldenhuis et al., 2023), *Mormopterus francoismoutoui* sur l'île de la Réunion (Hoarau et al., 2023; Joffrin et al., 2022), *Pteropus lylei* au Cambodge et en Thaïlande (Cappelle et al., 2021; Wacharapluesadee et al., 2018), mais aussi pour le virus de Hendra chez *Pteropus scapulatus* en Australie (Plowright et al., 2008), le virus Nipah chez *Pteropus medius* au Bangladesh (Epstein et al., 2020) ou encore pour le virus de Marburg chez *Rousettus aegyptiacus* en Afrique subsaharienne (Amman et al., 2012). Avec une approche théorique utilisant des modèles stochastiques, Peel et al. ont démontré l'effet des naissances saisonnières synchronisées, et donc de l'augmentation du nombre d'individus juvéniles sur une courte période, sur les dynamiques d'infection et l'excrétion de pathogènes chez les mammifères sauvages (Peel et al., 2014). Ce phénomène est en partie expliqué par la diminution progressive de la quantité d'anticorps d'origine maternelle chez les individus juvéniles, peu de temps après le sevrage. L'étude de Epstein *et al.* menée en 2020 sur l'espèce *Pteropus medius* a montré qu'une diminution de la quantité d'anticorps chez les juvéniles autour de 3 à 5 mois précédait systématiquement les augmentations de prévalence du virus Nipah chez ces chauves-souris, et que ces augmentations de prévalence étaient associées à des épidémies humaines (Epstein et al., 2020). Certaines études rapportent des niveaux d'excrétion importants lors d'une autre période : la fin de la gestation et le début des naissances (Geldenhuis et al., 2023; Plowright et al., 2008). L'augmentation de l'excrétion virale à ce moment-là serait due à une diminution de l'immunité des femelles gestantes lors de la mise bas. En dehors de ces deux périodes où l'excrétion est forte, la plupart des études longitudinales mesurent des niveaux d'excrétion virale modérés, voire faibles selon la période. Certaines études rapportent des taux de détection de 0% sur plusieurs mois consécutifs, alors qu'ils peuvent atteindre 40% (Geldenhuis et al., 2023) voire 80% (Joffrin et al., 2022) lors des périodes d'excrétion forte. Ces périodes de faible excrétion correspondent souvent aux périodes de gestation des femelles (qui sont la plupart du temps synchronisées). En effet, grâce à la construction de modèles et l'utilisation de données réelles regroupées à partir de plusieurs études longitudinales, Eskew *et al.* ont démontré que les périodes de gestation chez les chauves-souris étaient significativement associées à des périodes d'excrétion virale réduite. (Eskew et al., 2024). Ainsi, deux périodes sont associées à une excrétion virale élevée, les naissances d'un côté et le sevrage de l'autre, et une période est associée à une excrétion virale faible, la gestation (voir **Figure 2 (C)**). Ensuite, des facteurs environnementaux peuvent augmenter le stress des individus (souvent stress nutritionnel) et donc l'excrétion virale (Plowright et al., 2016, 2015). Cela a par exemple été démontré pour l'excrétion du virus de Hendra en Australie par *Pteropus alecto*, qui est fortement augmentée et associée à des épidémies humaines lorsqu'une pénurie alimentaire a eu lieu à la suite du phénomène climatique *El Niño* (Eby et al., 2023). Chez l'espèce *Artibeus jamaicensis*, une étude expérimentale conduite in vivo par Falvo et al. a permis de montrer que l'excrétion virale (virus Influenza A H18N11) se faisait à des niveaux plus élevés et sur des périodes plus longues chez les individus en état de stress nutritionnel (rations alimentaires sous-

optimales en sucres) (Falvo et al., 2023). L'étude à l'échelle mondiale de Warmuth *et al.* a également montré que les chauves-souris situées à proximité des zones urbaines (et donc des perturbations anthropiques, constructions, déforestation, élevages et cultures agricoles) présentaient des prévalences en CoV plus élevées que les autres (Warmuth et al., 2023).

Dans le deuxième cas, l'excrétion épisodique des colonies de chauves-souris pourrait être due à la réinfection régulière de cette colonie par un nouveau virus, après être redevenu indemne de l'épizootie précédente (Plowright et al., 2016). Dans ce scénario, la dynamique d'infection au sein d'une colonie dépend de nombreux paramètres, tels que le caractère grégaire des chauves-souris ou non (plus il y a de mouvements entre les colonies, plus il y a transmission de virus), le nombre et la taille des colonies interconnectées, l'existence de gîtes avec plusieurs espèces de chauves-souris en cohabitation et le caractère migratoire de certaines espèces, mais aussi des caractéristiques de la souche virale qui circule (durée de la période infectieuse, durée de l'immunité, taux de mutation...) (Plowright et al., 2016, 2015).

De nombreux facteurs influencent donc la temporalité de l'excrétion virale des chauves-souris. En plus de cela, les chauves-souris peuvent excréter les virus par différentes voies. Dans la majorité des cas, les virus sont excrétés dans les fèces. C'est par exemple le cas pour les Coronavirus, les Filovirus (virus d'Ebola et de Marburg) et les Astrovirus (Amman et al., 2012; De Benedictis et al., 2011; Widagdo et al., 2017). Les voies de contamination pour l'humain peuvent alors être directes (contact avec des fèces au sein d'une colonie ou consommation d'une chauve-souris) ou indirectes (par la consommation d'aliments souillés). Certains virus, en plus d'être transmis via les fèces, sont également excrétés dans les urines, comme pour les Paramyxovirus (virus Nipah et de Hendra) ou les Hantavirus (Cappelle et al., 2020; Edson et al., 2015; Kabwe et al., 2020). La transmission à l'humain se fait alors de la même manière que pour les virus excrétés dans les fèces. Pour le virus de la rage, il a été montré que celui-ci était surtout excrété dans la salive des chauves-souris, ce qui rend leur morsure infectieuse (Aguilar-Setien et al., 2005). Ainsi, les modes d'excrétion et les méthodes disponibles pour détecter les virus chez les chauves-souris sont variées et dépendent du virus ciblé.

Région, espèce de chauves-souris et virus étudiés

La péninsule du Yucatán, Mexique

Cette étude prend place au Mexique, pays considéré comme un point chaud pour l'émergence d'agents pathogènes zoonotiques, et plus précisément dans la péninsule du Yucatán (voir **Figure 3 (A)**) (Jones et al., 2008). Cette région abrite une partie importante de la biodiversité animale du pays tout en connaissant des changements écologiques importants dus à l'augmentation des activités humaines. Les populations locales de la péninsule ont l'un des revenus moyens les plus bas du Mexique et dépendent fortement de quelques activités économiques majeures comme le tourisme, l'agriculture et l'élevage, ce qui entraîne une déforestation importante. Cela en fait un environnement particulièrement favorable à l'émergence et à la propagation d'agents pathogènes zoonotiques. En effet, une analyse de données compilées par Colunga-Salas *et al.* en 2020 a répertorié 42 espèces virales zoonotiques portées par des mammifères sauvages au Mexique, soit 25,6% (42/164) des agents viraux zoonotiques signalés dans le monde (Colunga-Salas et al., 2020). Le Mexique contient par exemple 138 des 1400 espèces de chauves-souris découvertes à ce jour, soit environ 10% de la diversité mondiale. De plus, la péninsule du Yucatán est située à seulement 2 heures de vol de

Mexico, l'une des plus grandes villes du monde et plaque tournante de nombreux vols internationaux, ce qui pourrait faciliter l'émergence de pandémies. La surveillance épidémiologique des éventuelles maladies infectieuses émergentes ou ré-émergentes est donc primordiale dans cette région.

La péninsule du Yucatán présente un climat subtropical avec de fortes précipitations saisonnières de mai à novembre (saison humide) et des précipitations sporadiques pendant le reste de l'année (saison sèche). Les fruits sont surtout abondants pendant la saison humide, de mai à novembre, tandis qu'ils se font plus rares le reste de l'année (voir **Figure 2 (A)**).

La chauve-souris frugivore de la Jamaïque *Artibeus jamaicensis*

L'espèce de chauve-souris étudiée ici est *Artibeus jamaicensis*, qui appartient à la famille des *Phyllostomidae* et au sous-ordre des *Yangochiroptera*. Elle est aussi appelée chauve-souris frugivore de la Jamaïque (*Jamaïcain fruit bat* en anglais) ou encore Fer de Lance commun (Hao et al., 2023). Il s'agit d'une espèce tropicale d'Amérique que l'on retrouve dans le sud du Mexique, en Amérique Centrale, dans le nord de l'Amérique du Sud et dans les Caraïbes (voir **Figure 1**). Son habitat comprend les forêts tropicales denses, les grottes, ainsi que les plantations et certaines constructions humaines. Cette espèce n'est pas menacée et elle est réputée comme pouvant s'adapter aux zones urbaines et pouvant tolérer la déforestation mieux que la plupart des autres espèces (Grzimek et al., 2003). Cette chauve-souris est frugivore et se nourrit majoritairement de figes, mais aussi de mangues, d'avocats et de bananes. Lors de la saison sèche, de novembre à mai au Yucatán, les fruits sont moins abondants et elle peut alors se tourner vers le pollen, le nectar, les fleurs ou encore les insectes. Elle rend ainsi plusieurs services écosystémiques, comme la dispersion des graines, la pollinisation de certaines plantes ou la lutte contre les insectes ravageurs (Kasso and Balakrishnan, 2013). Les chauves-souris de l'espèce *Artibeus jamaicensis* sont nocturnes et peuvent parcourir jusqu'à 8 km durant la nuit pour trouver de la nourriture (Grzimek et al., 2003).



Figure 1 (A) Carte de la répartition géographique de l'espèce de chauve-souris *Artibeus jamaicensis* sur le continent américain (Crédit : International Union for Conservation of Nature, 2023) et (B) Photographies de deux individus de l'espèce *Artibeus jamaicensis* lors d'une session de capture (la coloration jaune du pelage est due au pollen des fleurs dont elles se nourrissent à cette période de l'année) (crédit : Bastien Malinge)

Les mâles *Artibeus jamaicensis* sont polygames et possèdent chacun un harem de 2 à 18 femelles. La reproduction de cette espèce est bisannuelle et un seul petit naît par gestation. Un premier accouplement a lieu fin mars – début avril, juste avant le début de la saison humide, suivi d’une gestation de 4 mois et d’une mise bas fin juillet – début août, au milieu de la saison humide. Quelques jours après la mise bas, les femelles sont à nouveau fertiles et un deuxième accouplement a lieu. Cette fois-ci, l’embryon rentre en dormance jusqu’en novembre puis, après une gestation de 4 mois, le petit naît fin mars – début avril (Grzimek et al., 2003). Ainsi, les deux périodes de naissance ont lieu pendant (ou juste avant) la saison humide, lorsque les fruits sont abondants. Un nouvel accouplement a alors lieu et le cycle de reproduction recommence (voir **Figure 2 (B)**). Les nouveau-nés restent accrochés au ventre de la mère pendant 30 à 50 jours pendant la période de lactation, avant d’être sevrés et de pouvoir voler par eux-mêmes. C’est à ce moment-là que les nouveau-nés deviennent juvéniles. Les individus juvéniles atteignent leur taille adulte autour de 80 jours et deviennent sexuellement actifs entre 8 et 12 mois, ce sont alors des adultes. La durée de vie de cette espèce est de 7 à 9 ans en milieu naturel. En dehors de la structure en harems, cette espèce ne présente pas d’autre structure sociale et elle ne migre pas (Grzimek et al., 2003).

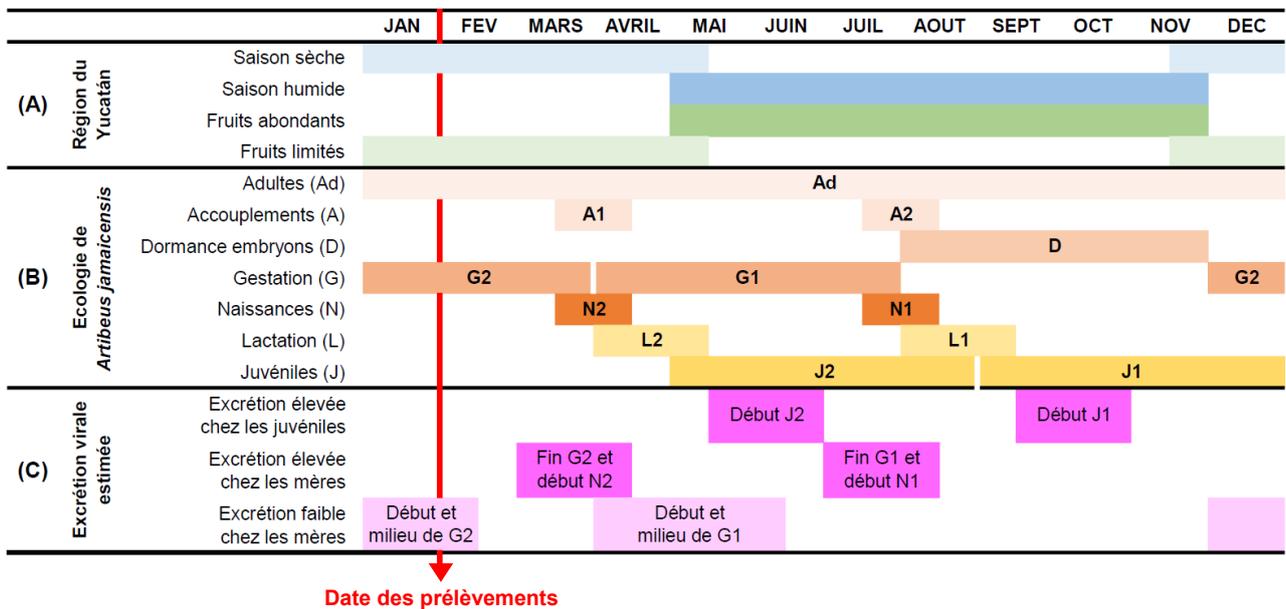


Figure 2 Frise chronologique d’une année complète présentant **(A)** Le climat et l’abondance des fruits dans la région du Yucatán **(B)** L’écologie et le cycle de reproduction de l’espèce de chauve-souris *Artibeus jamaicensis* (Grzimek et al., 2003) et **(C)** Les estimations des périodes d’excrétion virale élevée et faible chez les mères et les juvéniles (Eskew et al., 2024; Geldenhuys et al., 2023; Joffrin et al., 2022)

Parmi l’ensemble des virus zoonotiques portés par les chauves-souris, l’espèce *Artibeus jamaicensis* ne faisant pas exception, cette étude se focalise sur trois virus zoonotiques d’importance sanitaire majeur : les Coronavirus (CoV), Astrovirus (AstV) et Hantavirus (HantV).

Coronavirus

Les CoV (famille *Coronaviridae*) sont des virus enveloppés à ARN simple brin positif non fragmenté, qui peuvent infecter les animaux vertébrés et les humains (Leao et al., 2022). Ils présentent le génome le plus long parmi les virus à ARN, avec 26 à 32 kilobases (Weiss and Navas-Martin, 2005). Les CoV sont classés en quatre genres (ou groupes) : les alpha-CoV, bêta-CoV, gamma-CoV et delta-

CoV. Les alpha-CoV et bêta-CoV infectent exclusivement des mammifères, tandis que les gamma-CoV et delta-CoV infectent surtout les oiseaux (Ghosh and Malik, 2020). Les alpha-CoV et bêta-CoV, comprennent donc, entre autres, les CoV qui infectent les humains, appelés Human CoV (HCoV), et les CoV portés par les chauves-souris et les rongeurs, qui en sont les réservoirs naturels. Sept HCoV sont comptabilisés à ce jour, dont trois sont responsables d'épidémies majeures : le SARS-CoV, avec 8422 cas et un taux de létalité de 11% entre 2002 et 2003 majoritairement en Asie (Chan-Yeung and Xu, 2003), le MERS-CoV, avec 2500 cas depuis 2012 dans le Moyen-Orient et un taux de létalité de 35% (Rabaan et al., 2021) et le SARS-CoV-2, responsable de la pandémie de COVID-19 depuis 2019. Ce dernier virus a causé à ce jour plus de 700 000 000 cas (covid19.who.int), avec un taux de létalité global moyen de 1,52% et des impacts socio-économiques considérables (Nicola et al., 2020; Sagheb et al., 2024). Les quatre autres HCoV (HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 et HCoV-HKU1) ne sont pas létaux pour l'humain et sont responsables d'affections respiratoires ou digestives bénignes, à savoir des « rhumes » et des diarrhées passagères (Su et al., 2016). Ces sept HCoV ont une origine zoonotique est confirmée (Ye et al., 2020) : les virus HCoV-OC43 et HCoV-HKU1 proviennent des rongeurs (bêta-CoV) tandis que les cinq autres sont issus des chauves-souris (alpha et bêta-CoV). Des hôtes intermédiaires sont parfois impliqués dans l'émergence de ces virus, comme la civette dans le cas du SARS-CoV, le dromadaire pour le MERS-CoV ou les bovins pour le HCoV-OC43 (Ye et al. 2020). Cette transmission interspécifique ou *spillover*, qui comprend l'émergence de CoV chez l'humain, est facilitée par plusieurs mécanismes. Lorsque des séquences d'ARN homologues se retrouvent dans la même cellule, l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) peut aléatoirement changer de segment d'ARN modèle lors de l'étape de réplication : il s'agit du phénomène de recombinaison (Wells et al., 2023). Des analyses phylogénétiques ont montré que des recombinaisons avaient eu lieu chez de nombreuses souches de CoV. C'est par exemple le cas pour l'émergence du SARS-COV, qui provient des chauves-souris (Graham and Baric, 2010). La grande taille de leur génome leur confère également une plasticité importante vis-à-vis des mutations et des recombinaisons, facilitant ainsi l'émergence de nouveaux CoV (Forni et al., 2017).

Les chauves-souris constituent le réservoir primaire des CoV (Ye et al., 2020). De par leur grande diversité d'espèce, elles hébergent également une diversité importante de CoV. Ces virus sont regroupés en trois « communautés », en Asie, Afrique et Amérique latine, qui correspondent à trois zones de grande biodiversité dans le monde (Anthony et al., 2017). Sur le continent américain, entre 2007 et 2020, 25 études se sont focalisées sur les CoV de chauve-souris. Au total, 187 séquences différentes de CoV (alpha et bêta-CoV) appartenant à 43 espèces de chauves-souris ont été découvertes (Hernández-Aguilar et al., 2021). Parmi ces CoV, 33,2% ont été découverts dans la famille des *Phyllostomidae* dont 14 chez *Artibeus jamaicensis*, à savoir au Panama, en Équateur (Corman et al., 2013), au Costa Rica (Moreira-Soto et al., 2015) et enfin au Mexique (Anthony et al., 2013). Dans cette dernière étude, Anthony et al. ont capturé des chauves-souris dans trois localités du Mexique, dont une dans l'état de Campeche dans la péninsule du Yucatán. Sur l'ensemble de leurs 606 échantillons, 32 étaient positifs aux CoV, soit une prévalence globale de 5,3%. Après analyse phylogénétique, 13 clades de CoV se sont distingués. L'espèce *Artibeus jamaicensis* en portait trois, à savoir les Mex_CoV-4, 5a et 5b qui sont tous des alpha-CoV. Un bêta-CoV a également été détecté par Bentim Góes et al. en 2013, ce qui fait un total de 14 espèces de CoV détectés chez les chauves-souris au Mexique à ce jour (Bentim Góes et al., 2013).

Dans la plupart des études portant sur les CoV de chauves-souris, la méthode utilisée pour détecter les virus est la PCR sur écouvillon rectal (après extraction de l'ARN et RT). En effet, les CoV ont un tropisme positif pour le tube digestif, tandis qu'ils sont beaucoup moins retrouvés dans les voies

respiratoires (Widagdo et al., 2017). Plusieurs études ont rapporté des prévalences significativement plus élevées dans les écouvillons rectaux par rapport aux autres méthodes de prélèvement (écouvillon oropharyngé et collecte de sang) (Anthony et al., 2017; Wong et al., 2019). Par exemple, parmi les 186 séquences de CoV détectées chez les chauves-souris sur le continent américain, le type de prélèvement majoritaire est l'écouvillon rectal (43,1%), suivi des tissus d'intestins (35,1%) et d'autres organes (20,3%), les écouvillons oropharyngés (1,2%) et enfin la collecte de sang (0,3%) (Hernández-Aguilar et al., 2021). Cependant, les prélèvements de fèces fraîches dans l'environnement (c'est-à-dire directement en dessous la colonie de chauves-souris) sont moins fréquemment utilisés, et encore moins avec une comparaison d'efficacité avec une technique de référence (écouvillon rectal pour les CoV). Parmi les études qui réalisent cette comparaison, on retrouve l'étude de Geldenhuys *et al.* dans laquelle 710 écouvillons rectaux et 720 prélèvements de fèces (groupés par trois dans chaque tube) ont été collectés. Les taux de détection bruts obtenus semblent similaires, avec 13,2% pour les écouvillons rectaux et 14,7% pour les prélèvements de fèces groupés. Cependant, lorsque le groupage des trois fèces par tube est pris en compte, une prévalence corrigée de 5,2% est obtenue, ce qui témoigne d'une sensibilité plus faible avec cette méthode (Geldenhuys et al., 2023). Dans une étude de Hemnani *et al.*, la prévalence dans les fèces fraîches individuelles (42,9% avec 6 positifs sur 14) est cette fois plus élevée que celle des écouvillons rectaux (2,4% avec 1 positif sur 42) (Hemnani et al., 2023). D'autres études recherchent également des virus dans le guano (accumulation sèche d'excréments de chauves-souris) et comparent cette méthode de prélèvement avec celle des fèces. Avec 1080 fèces fraîches collectées mensuellement pendant deux ans sur l'île de la Réunion, Joffrin *et al.* ont obtenu une prévalence globale en CoV de 16,6% (179 positifs sur 1080). Cette même équipe a obtenu une prévalence similaire de 17,6% dans leurs 380 prélèvements de guano sec (67 positifs sur 1080) (Joffrin et al., 2022). Étonnamment, dans l'étude de Brnić *et al.*, des CoV ont été détectés dans le guano sec à 19,2% (5 positifs sur 26 prélèvements), mais pas dans les fèces fraîches (0 sur 11) (Brnić et al., 2023). Les résultats obtenus avec les prélèvements de fèces semblent donc être encourageant pour la détection de CoV, mais les résultats ne sont pas toujours cohérents avec ceux des méthodes de référence, montrant que études supplémentaires pour valider cette méthode sont encore nécessaires.

Astrovirus

Les AstV, de la famille des *Astroviridae*, sont des virus non enveloppés, à ARN positif simple brin, identifiés en 1975 (De Benedictis et al., 2011). Aujourd'hui détectés dans plus de 80 espèces animales, ils peuvent infecter une grande variété d'hôtes et sont répartis en deux genres : les *Mamastrovirus*, qui infectent les mammifères, et les *Avastrovirus*, qui infectent les oiseaux. Les AstV infectent aussi bien des animaux domestiques, tels que les bovins, porcins, félins ou canidés, que la faune sauvage, notamment les rongeurs et les chauves-souris (Roach and Langlois, 2021). Chez l'humain, il s'agit d'une des causes majeures de gastroentérite chez les jeunes enfants, causant principalement des diarrhées (De Benedictis et al., 2011). Avec un tropisme positif pour le tube digestif, les AstV sont excrétés majoritairement dans les fèces et pendant une longue durée, même après la disparition des signes cliniques. La transmission interindividuelle se fait donc par voie oro-fécale, que ce soit directement, par coprophagie, ou indirectement, via des eaux ou des aliments souillés (Roach and Langlois, 2021). Les phénomènes de mutation et de recombinaison permettent une évolution rapide et des sauts d'espèces fréquents (Donato and Vijaykrishna, 2017; Roach and Langlois, 2021).

De nombreuses études ont retrouvé des AstV chez les espèces de chauves-souris variées et dans de nombreuses régions du monde. Des AstV ont par exemple été retrouvés chez des chauves-souris en Chine, à Madagascar, au Mozambique, sur les îles de Mayotte et de la Réunion et au Brésil (Hoarau et al., 2021; Loh et al., 2022; Xiao et al., 2011). Dans ces études, les AstV sont détectés dans des écouvillons rectaux et occasionnellement dans les fèces fraîches. Très peu d'études ont été menées sur les AstV au Mexique mais, au vu de la répartition mondiale de ce virus et de sa diversité d'hôte, y compris chez les chauves-souris, ces virus y circulent probablement. En plus de la nécessité d'estimer les prévalences en AstV au Mexique, une validation des prélèvements de fèces fraîches pour la recherche d'AstV chez les chauves-souris doit être réalisée afin d'améliorer la détection et la surveillance de cette maladie.

Hantavirus

Les HantV, de la famille des *Hantaviridae*, sont des virus enveloppés dont le génome est constitué de trois segments d'ARN négatif simple brin (Kabwe et al., 2020). Certains virus appartenant à cette famille sont responsables de deux grands syndromes chez l'humain : le Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS) en Europe et en Asie, et le Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS) en Amérique du Nord et du Sud. Le réservoir animal des HantV est constitué des rongeurs, des chauves-souris, et d'autres petits mammifères insectivores (Guo et al., 2013). La plupart du temps, une espèce de HantV donnée est associée à une espèce de mammifère bien précise. Par exemple, le Sin Nombre Virus (SNV) est surtout présent chez la souris sylvestre *Peromyscus maniculatus* en Amérique du Nord, tandis que le Andes Virus (ANDV) est majoritairement présent chez le rat pygmée *Oligoryzomys longicaudatus* au Chili et en Argentine (Kabwe et al., 2020). Les HantV sont excrétés dans l'environnement par leur hôte via les urines et les fèces. Une infection expérimentale de rongeurs a montré que des particules virales étaient retrouvées à la fois dans les urines et les fèces à des titres comparables jusqu'à 18 jours post infection, mais aussi dans le sang (Souza et al., 2016). Il a également été constaté que la transmission zoonotique à l'humain se faisait par contact direct ou indirect via l'inhalation d'urine ou de fèces contenant le virus. La transmission entre êtres humains est rare et n'a été prouvée que pour le ANDV, au Chili (Martinez-Valdebenito et al., 2014). Plusieurs mécanismes permettent l'évolution des HantV, comme les mutations ponctuelles, les recombinaisons et les réassortiments (Razzauti et al., 2008).

Aux États-Unis d'Amérique (USA), 731 cas de HPS ont été reportés entre 1993, année de la découverte du HPS, et 2018. La létalité de ce virus était alors de 60%, avant de descendre à 36% aujourd'hui (Vigueras-Galván et al., 2019). Parmi ces cas, 40% ont été rapportés le long de la frontière USA - Mexique. D'autres cas de HPS ont été rapportés dans d'autres pays d'Amérique Centrale, comme le Panama avec 259 cas entre 1999 to 2016 (Vigueras-Galván et al., 2019). Étonnement, aucun cas humain n'a à ce jour été rapporté au Mexique, alors que des études ont montré des séroprévalences chez l'humain autour de 1% dans plusieurs états du Mexique (Vado-Solís et al., 2003). En parallèle, plusieurs études ont détecté des anticorps dirigés contre des HantV chez plusieurs espèces de rongeurs dans 18 des 32 états du Mexique, avec une prévalence globale de 10,15% (392/3862). Il a été suggéré que les cas de HPS au Mexique n'étaient pas déclarés, car ils étaient confondus avec d'autres maladies respiratoires endémiques du pays (dengue, leptospiroses et grippe, entre autres) (Vigueras-Galván et al., 2019). Des HantV circulent donc probablement au Mexique au sein de la faune sauvage et représentent un réel enjeu de santé publique.

En ce qui concerne les chauves-souris, des HantV ont été détectés chez des espèces variées et dans plusieurs régions du monde, par exemple chez les genres *Hipposideros*, *Rhinolophus* ou *Rousettus* en Asie du Sud-Est, chez les genres *Hipposideros*, *Nycteris* et *Neoromiciaen* Afrique ou encore chez l'espèce *Nyctalus noctula* en Europe (Arai and Yanagihara, 2020) Sur le continent américain, la première confirmation d'un HantV hébergé par une chauve-souris a été obtenue par De Araujo *et al.* en 2012, lorsqu'ils ont détecté des HantV dans les tissus pulmonaires et rénaux de deux espèces de chauves-souris endémiques du Brésil : *Anoura caudifer* et *Diphylla ecaudata*, le vampire à pattes velues (de Araujo *et al.*, 2012). La première espèce n'est retrouvée qu'au Brésil et dans d'autres pays d'Amérique du Sud, mais la distribution géographique de la seconde s'étend jusqu'au sud du Mexique dans la péninsule du Yucatán. En 2015, Sabino-Santos *et al.* ont mis en évidence la circulation d'HantV chez les chauves-souris avec une étude de séroprévalence (9 séropositifs sur 53, soit 17%) (Sabino-Santos *et al.*, 2015). Cette même équipe a ensuite recherché des HantV par PCR sur les 9 individus séropositifs. Des HantV ont été détectés dans le sang de trois chauves-souris appartenant aux espèces *Carollia perspicillata* et *Desmodus rotundus*. Cette dernière espèce de chauve-souris, le vampire commun, est aussi présente dans la péninsule du Yucatán (Sabino-Santos Jr *et al.*, 2018). Les deux séquences nucléotidiques obtenues correspondent respectivement à 99,55% et 93.72% au virus de Araraquara (qui fait partie des ANDV), un des HantV les plus virulent chez l'humain (Sabino-Santos Jr *et al.*, 2018). Au Mexique, des HantV ont été détectés dans le sud-est du pays en 2015 dans le sang et l'écouvillon rectal d'une *Carollia sowelli* et dans l'écouvillon oral d'une *Trachops cirrhosus* (Rico Chávez *et al.*, 2015). Ainsi, les études cherchant à détecter des HantV chez les chauves-souris utilisent différents types d'échantillons (tissus d'organes, écouvillons rectaux et oraux, sang) et chacune semble montrer une certaine efficacité. La recherche d'HantV dans les fèces fraîches de chauve-souris est cependant moins répandue, alors que cette méthode est couramment utilisée chez les rongeurs avec de bons résultats. Une étude de l'efficacité de cette méthode de prélèvement pour la détection des HantV est là aussi nécessaire pour améliorer la surveillance épidémiologique de cette famille virale.

Objectifs de l'étude

Cette étude se focalise sur l'excrétion fécale de trois virus zoonotiques (CoV, AstV et HantV) par l'espèce de chauve-souris *Artibeus jamaicensis* dans la péninsule du Yucatán, au Mexique. La collecte de fèces fraîches est une méthode de prélèvement non invasive qui permet d'obtenir des informations sur la circulation de virus et sur les souches présentes dans une colonie. Cette technique possède les avantages d'être non traumatisante pour les chauves-souris, plus pratique et plus rapide que les méthodes nécessitant la capture des individus. Elle présente également des inconvénients, le principal étant que les fèces ne peuvent pas être associés à un individu particulier, et donc non associé à des données morphologiques, de sexe, d'âge, de statut de reproduction ou même d'espèce. Cette méthode de prélèvement constitue ainsi un compromis avantageux pour obtenir une estimation rapide des prévalences au sein d'une population étudiée, caractériser les souches virales qui y circulent ou pour la mise en place de surveillance virale facilitée chez les chauves-souris.

Comme présenté précédemment pour chacun des trois virus étudiés, plusieurs études utilisent déjà les prélèvements de fèces fraîches pour la recherche de virus. Parmi ces études, lorsque les taux de détection obtenus sont comparés aux résultats des méthodes de référence, des résultats prometteurs semblent émerger. Certaines études obtiennent tout de même des taux de détection moins bons avec les fèces fraîches, tandis que d'autres obtiennent de meilleurs résultats. Cependant, la majorité des études qui recherchent des virus dans les fèces fraîches ne comparent pas l'efficacité de cette technique avec les méthodes de référence. Ainsi, des études supplémentaires sont nécessaires pour valider cette méthode de prélèvement et pour caractériser plus en détail son intérêt en termes de surveillance des virus zoonotiques chez les chauves-souris.

L'objectif général de cette étude est donc de caractériser l'intérêt des prélèvements de fèces fraîches en termes de surveillance de maladies virales zoonotiques chez l'espèce de chauves-souris *Artibeus jamaicensis* au Mexique. Plus précisément, cette étude permet de (1) comparer les prévalences de virus détectés avec différentes méthodes de prélèvement (fèces fraîches, écouvillons rectaux et prises de sang), (2) de déterminer les facteurs écologiques et environnementaux qui pourraient influencer l'excrétion virale chez cette espèce et (3) d'étudier une éventuelle variation des prévalences virales sur une durée de temps courte (une à deux semaines) au sein de deux colonies distinctes.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Colonies étudiées, capture des individus et méthodes de prélèvement

Sélection des sites de prélèvement

Le choix des sites de prélèvement s'est porté sur des lieux situés à proximité des zones urbaines, dans la péninsule du Yucatán, au Mexique. Pour qu'un site soit sélectionné, plusieurs conditions doivent être respectées : la colonie de chauves-souris doit être constituée d'au moins une trentaine d'individus (pour pouvoir réaliser les tests statistiques nécessaires), elle doit être située dans un lieu accessible sans trop de difficulté (pour pouvoir y acheminer le matériel de prélèvement) et un espace praticable devait être situé au-dessous même des individus de la colonie (pour pouvoir réaliser les prélèvements de fèces fraîches). Une dizaine de sites potentiels ont été visités, autour des villes de Mérida et de Tizimin, mais seulement deux sites ont été retenus. Ces deux sites sont des bâtiments abandonnés situés dans deux villages à proximité de la ville de Mérida, respectivement Techoh et Xcucul Sur (voir **Figure 3**). Dans les deux cas, le bâtiment abandonné était situé dans le village, avec des passages humains réguliers à proximité de celui-ci.

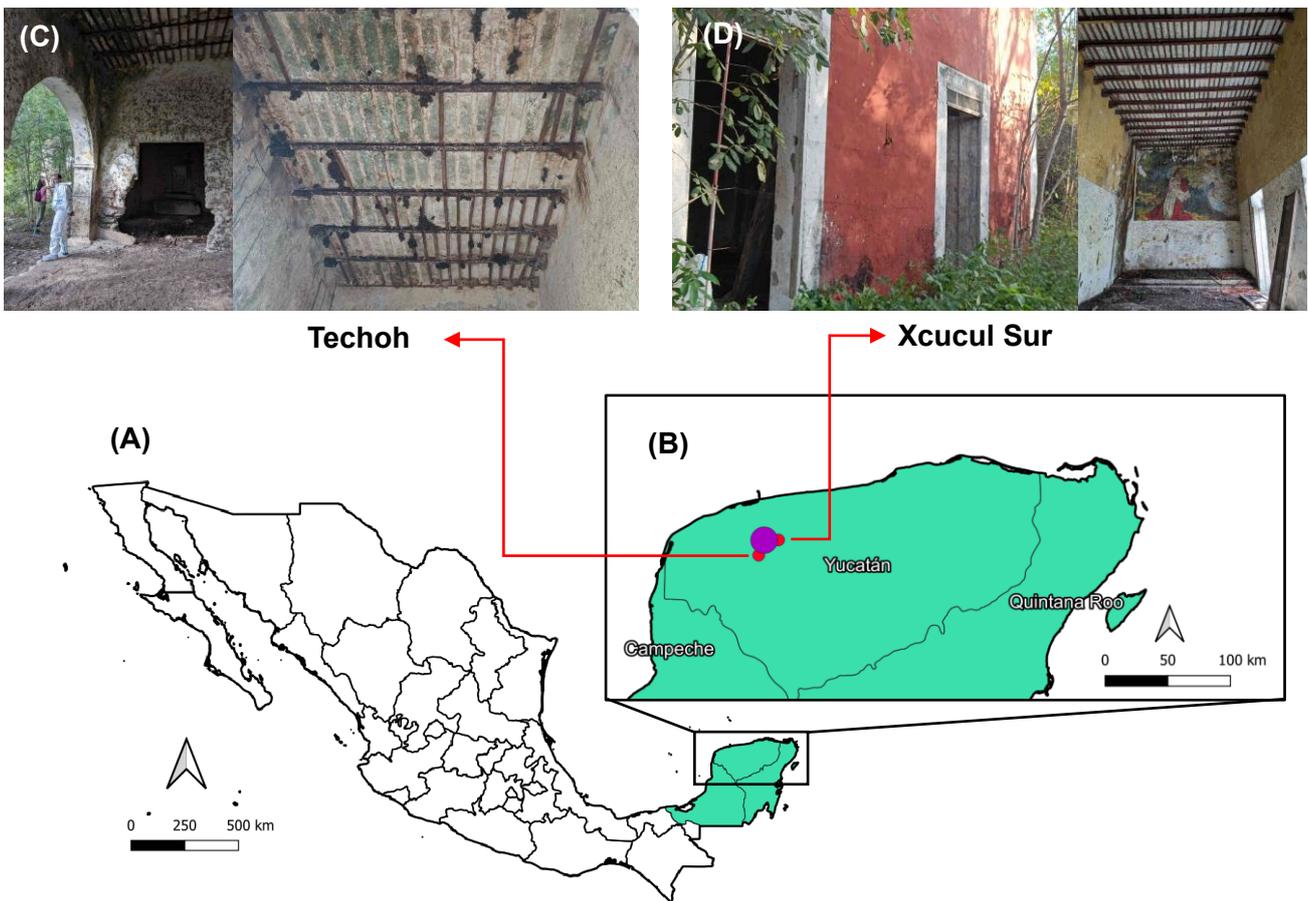


Figure 3 (A) Carte du **Mexique** avec (B) un zoom sur région de la **péninsule du Yucatán (en vert)**, les **deux sites d'étude (points rouges)** et la ville de **Mérida (point violet)** (logiciel QGIS)

(C) Photographies du site de prélèvement de **Techoh**

(D) Photographies du site de prélèvement de **Xcucul Sur** (crédit : Bastien Malinge)

Afin d'étudier une éventuelle variation des prévalences virales au cours du temps, deux sessions de prélèvement ont été réalisées dans chacun des sites, espacées d'une semaine pour Techoh et de deux semaines pour Xcucul Sur. Le **Tableau 1** présente une description plus détaillée de chacun des deux sites, des colonies de chauves-souris qui s'y trouvent, ainsi que des différentes sessions de prélèvement réalisées.

| | | Techoh | | Xcucul Sur | |
|---------------------------------------|-----------|-----------------------------|------------|-----------------------------|------------|
| | | Session 1 | Session 2 | Session 1 | Session 2 |
| Coordonnées | Latitude | 20,9739046662667 | | 20,856278238451683 | |
| | Longitude | -89,5204170735031 | | -89,6717197049936 | |
| Population humaine (en 2020) | | 386 habitants | | 495 habitants | |
| Position par rapport à Mérida | | 5 km à l'est | | 4 km au sud | |
| Type de bâtiment | | Hacienda abandonnée | | Maison abandonnée | |
| Nombre de filets de capture installés | | 2 filets | | 1 filet | |
| Espèce de chauve-souris | | <i>Artibeus jamaicensis</i> | | <i>Artibeus jamaicensis</i> | |
| Date de la session | | 31/01/2024 | 06/02/2024 | 24/01/2024 | 08/02/2024 |
| Nombre d'individus dans la colonie | | 311 | 303 | 131 | 68 |

Tableau 1 Caractéristiques des deux sites de collecte, Techoh et Xcucul Sur, des colonies de chauves-souris qui s'y trouvent et des quatre sessions de prélèvement réalisées

Prélèvements des fèces

Sur chaque site, les fèces ont été prélevées avec le même protocole standardisé. Pour cela, plusieurs feuilles de papier absorbant de 60 cm x 49 cm (*BenchGuard*, Thermo Scientific, Sterilin, ref. BG60100) ont été déposées sur le sol de manière à couvrir au maximum la surface occupée par la colonie de chauves-souris (voir **Figure 4**). Cette étape a été réalisée avec un équipement de protection individuel (EPI) complet, à savoir le port d'une combinaison intégrale isolante, d'un masque FFP3, de lunettes de protection et de gants en nitrile.



Figure 4 Présentation de la méthode de collecte des fèces fraîches (A) Dépôt des feuilles de papier absorbant sur le sol en milieu d'après-midi (B) dans le but de recouvrir un maximum la surface au sol en dessous de la colonie (C) Exemple d'une feuille de papier absorbant avec quatre fèces et (D) photographie rapprochée d'une fèces (crédit : Bastien Malinge)

Les feuilles de papier absorbant ont été vérifiées toutes les 15 minutes, sur une période d'environ 4 heures couvrant la fin d'après-midi et le début de la nuit. Chaque fèces fraîche a été prélevée à l'aide d'un écouvillon stérile et déposé individuellement dans un tube de 2 mL contenant 500 µL d'une

solution de stabilisation de l'ARN (*RNAlater*, Invitrogen, Thermo Fisher Scientifique, ref. AM7021). L'extrémité de l'écouvillon (la partie avec le coton) a été déposée avec la fèces dans les tubes (la tige était coupée), en prenant garde de bien immerger la fèces dans le liquide de conservation. Chaque écouvillon a été légèrement mélangé dans le *RNAlater*, avant que le tube ne soit placé dans une glacière de terrain contenant des blocs de froid, puis dans un congélateur à -20°C dans les 8 heures suivant le prélèvement.

Capture des chauves-souris

Les sessions de capture des individus, les mesures corporelles et les prélèvements de matériel biologique se sont déroulés selon les bonnes pratiques de manipulation, sous la supervision d'un vétérinaire et suivant un protocole standardisé sur l'ensemble des sites (protocoles validés par le comité éthique de la Faculté de Médecine Vétérinaire et de Zootechnie de l'Université Nationale Autonome du Mexique). À environ 16h, un ou plusieurs filets de capture de 6 m x 3 m ont été déployés en face de chaque entrée des gîtes des colonies. Les filets ont été vérifiés toutes les 15 minutes tout au long de la période de capture, afin de minimiser le stress des individus autant que possible. Dès qu'une chauve-souris était prise dans un filet, elle était immédiatement retirée du filet à l'aide de gants de protection en cuir et placée individuellement dans un sac en coton de 20 cm x 20 cm.

L'espèce, le sexe, l'âge, le statut reproducteur et la condition corporelle étaient déterminés pour chaque individu par le manipulateur. L'espèce était confirmée grâce à un guide d'identification de terrain (Medellín et al., 2008). Les chauves-souris mâles étaient identifiées par la présence d'un pénis, et les femelles d'une vulve. Pour la détermination de l'âge, les chauves-souris étaient classées en trois catégories : nouveau-nés, juvéniles et adultes. Les nouveau-nés sont de petite taille et sont retrouvés accrochés au ventre de la mère pendant 30 à 50 jours. Ils ne sont pas encore capables de voler et se nourrissent encore du lait maternel. Un individu est considéré comme juvénile lorsqu'il ne présente pas de caractères sexuels matures (pas de testicules extériorisés chez le mâle et pas de mamelles chez la femelle). Les chauves-souris restent juvéniles de 5 semaines à 10 mois environ et ne sont pas matures sexuellement (elles ne peuvent pas se reproduire). Tous les individus qui n'étaient ni des nouveau-nés ni des juvéniles étaient automatiquement classés comme étant des adultes. Un adulte peut être sexuellement actif ou inactif. Un mâle adulte sexuellement inactif présente des testicules extériorisés mais de petite taille (< 1 cm), tandis que les mâles sexuellement actifs présentent des testicules de taille plus importante (> 1 cm). Une femelle est considérée comme sexuellement active lorsqu'elle est en chaleur (la vulve est dilatée), en lactation (du lait s'écoule des mamelles après une pression légère) ou gestante (un fœtus est identifiable par palpation abdominale). Une femelle adulte qui n'est ni en chaleur ni en lactation et ni en gestation est sexuellement inactive. La condition corporelle des individus était évaluée par palpation des muscles pectoraux (une note entre 1 et 5 était attribuée). Pour chaque individu, une série de mesures corporelles a également été réalisée à l'aide d'une règle millimétrée : longueur totale du corps et de la tête, longueur de l'avant-bras, longueur de la queue, de la patte postérieure droite et du pavillon de l'oreille droite (voir **Figure 5**).

Prélèvements sanguins et écouvillons rectaux

Le prélèvement de sang était réalisé en premier, en suivant la méthode de ponction de la veine brachiale (Eshar and Weinberg, 2010). Le site de ponction était désinfecté avec une solution d'éthanol à 70%, la veine était ensuite ponctionnée avec une aiguille de 27G et la goutte de sang qui se formait

à la surface de la peau était alors prélevée à l'aide d'une micropipette à embout stérile (voir **Figure 5**). Le sang prélevé était alors déposé dans des tubes de 2 mL contenant 200 μ L de *RNAlater*. Le volume de sang prélevé était compris entre 20 et 200 μ L selon les individus, mais ne dépassait jamais 10% du volume sanguin total, soit 0,6% de la masse totale.

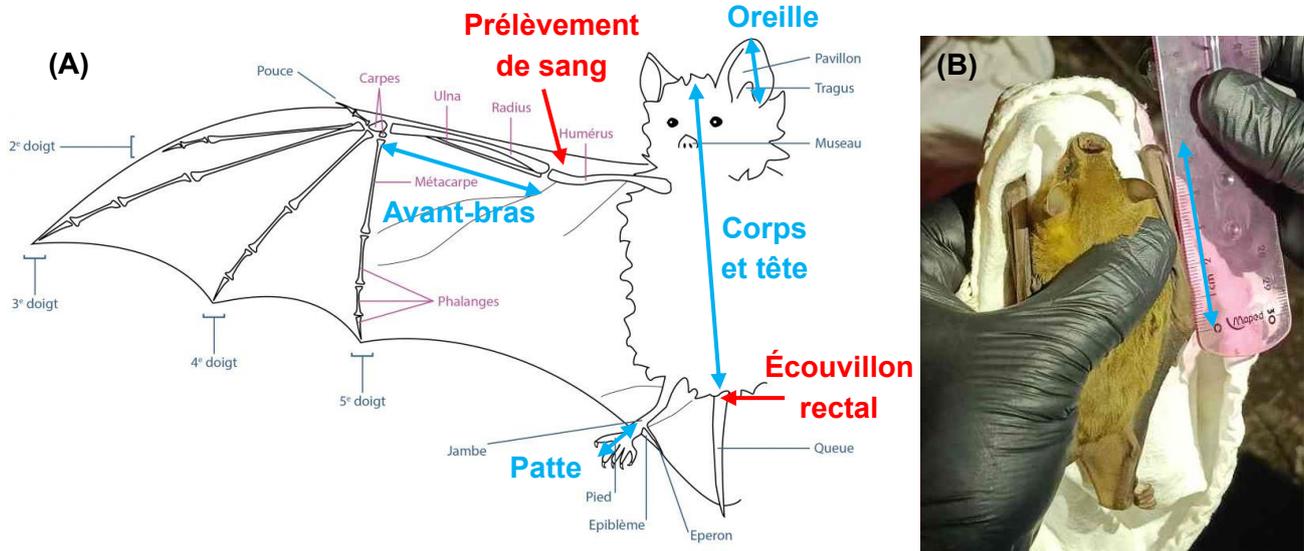


Figure 5 Présentation des **mesures corporelles réalisées (en bleu)** et des **prélèvements réalisés (en rouge)** pour chacun des individus capturés **(A)** Schéma de l'anatomie externe d'une chauve-souris (crédit : Clémence Curlier) **(B)** Photo d'une *Artibeus jamaicensis* durant la mesure de l'avant-bras avec une règle graduée (crédit : Bastien Malinge)

L'écouvillonnage rectal était réalisé avec un écouvillon stérile de 2 mm de diamètre. Une attention particulière a été portée à l'observation d'une légère coloration de l'écouvillon après le prélèvement rectal indiquant la présence de matériel biologique. L'écouvillon était ensuite placé dans un tube de 2 mL contenant 500 μ L de *RNAlater* (la tige était coupée).

La masse corporelle de chaque chauve-souris a été déterminée à l'aide d'un dynamomètre, en calculant la différence entre la masse de la chauve-souris dans son sac en coton et la masse du sac vide. Après vérification de l'arrêt du saignement, chaque chauve-souris a été marquée au feutre dans le pavillon de l'oreille droite afin d'éviter la recapture d'individus, puis relâchée en vérifiant sa capacité à voler. Tous les tubes de prélèvements biologiques ont été placés dans une glacière contenant des blocs de froid, puis placés dans un congélateur à -20°C dans les 8 heures suivant le prélèvement.

Traitement des échantillons : extraction de l'ARN total, RT et PCR

L'extraction de l'ARN total des prélèvements de fèces et des écouvillons rectaux a été réalisée avec le kit d'extraction QIAGEN RNeasy PowerFecal Pro Kit (ref. 78404). L'extraction de l'ARN total des prélèvements de sang a été réalisée avec le kit d'extraction QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit (ref. 52904). Les ARN extraits ont été conservés à -80°C . L'ADN complémentaire (ADNc) a ensuite été obtenu par transcription inverse (reverse transcription, RT) à partir de 5 μ L d'ARN. La transcriptase inverse M-MLV (Invitrogen, Thermo Scientific, ref. 2028513) a été utilisée et le protocole du fournisseur a été suivi.

Une réaction en chaîne par une polymérase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) a été réalisée pour chacun des virus recherchés (CoV, AstV et HantV) et pour la quasi-totalité des échantillons collectés. Pour la détection de CoV, une PCR nichée ciblant une partie de la séquence codant pour la *RNA-dependent RNA polymerase* (RdRp) a été utilisée en adaptant le protocole de Chu et al. (Chu et al., 2011). Dans la première PCR, l'ADNc est amplifié avec le couple d'amorces suivant : amorce *forward* 5'-GGKTGGGAYTAYCCKAARTG-3' et amorce *reverse* 5'-TGYTGTSWRCARAAAYTCRTG-3'. Le protocole comprend une première incubation de 2 min à 92°C, puis 40 cycles de 30 s à 94°C, 30 s à 50°C et 80 s à 72°C, suivis de 5 min d'incubation à 72°C. Le produit de PCR obtenu a ensuite été utilisé pour être amplifié dans une deuxième PCR, avec deux autres amorces nichées entre les deux amorces précédentes : amorce *forward* 5'-GGTTGGGACTATCCTAAGTGTGA-3' et amorce *reverse* 5'-CCATCATCAGATAGAATCATCAT-3'. Les conditions d'amplification étaient les mêmes, sauf pour le programme d'amplification qui comprenait 40 cycles de 30 s à 94°C, 30 s à 52°C et 60 s à 72°C. La taille du produit d'amplification final est de 360 paires de bases (pb). Des témoins négatifs (eau) et positifs (ADNc d'un échantillon de HCoV-229E) ont été utilisés pour contrôler les PCR.

De la même manière, la recherche d'AstV s'est faite par PCR semi-nichée, en adaptant le protocole présenté par Chu et al. (Chu et al., 2008). La première PCR a utilisé deux amorces *forward*, 5'-GARTTYGATTGGRCKCGKTAYGA-3' et 5'-GARTTYGATTGGRCKAGGTAYGA-3', et une amorce *reverse*, 5'-GGYTTKACCCACATNCCRAA-3'. Après une incubation de 3 min à 94°C, 45 cycles d'amplification ont été réalisés avec 15 s à 94°C, 30 s à 50°C et 30 s à 68°C, suivis de 10 minutes à 68°C. La deuxième PCR était semi-nichée et utilisait deux nouvelles amorces *forward*, 5'-CGKTAYGATGGKACKATHCC-3' et 5'-AGGTAYGATGGKACKATHCC-3', et la même amorce *reverse* que dans la première réaction. Les conditions d'amplification étaient une incubation de 2 min à 94°C, puis 45 cycles de 15 s à 94°C, 30 s à 50°C et 30 s à 72°C, suivis de 10 minutes à 72°C. La taille du produit d'amplification final était de 422 pb. Des témoins négatifs (eau) et positifs (ADNc d'un échantillon d'AstV de rongeur d'Afrique) ont été utilisés pour contrôler les PCR.

Enfin, la recherche des HantV s'est faite grâce à une PCR nichée en adaptant le protocole de Raboni et al. (Raboni et al., 2005). La séquence amplifiée est une partie de la région S de la séquence qui code pour la protéine N (nucléocapside). Il s'agit d'une PCR semi-nichée. La première PCR consiste en une incubation de 2 min à 94°C, puis de 40 cycles de 30 s à 95°C, 30 s à 50°C et 2 min à 72°C, suivis de 10 min à 72°C. Les amorces utilisées sont l'amorce *forward* 5'-AGCACAYTVCAIIBAGRCGG-3' et l'amorce *reverse* 5'-ATVTTYCTIGCYTTDAYYTGDC-3', pour un fragment amplifié de 532 pb. Pour la deuxième PCR, les mêmes paramètres d'amplification ont été utilisés, sauf la température d'hybridation qui est de 53°C et le nombre de cycles qui est abaissé à 35. L'amorce *forward* utilisée est 5'-CCWVHKGAYCCAACWGG-3' et l'amorce *reverse* est la même que pour la première PCR, avec un produit d'amplification de 417 pb. Des témoins négatifs (eau) et positifs (séquence synthétisée par Eurofins Genomics, en se basant sur l'alignement de séquences de différents HantV présents en Amérique du Sud et au Mexique) ont été utilisés pour contrôler les PCR.

La lecture de l'ensemble de ces PCR s'est faite par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2%. Les produits d'amplification des échantillons qui semblaient positifs ont été séquencés par la méthode Sanger afin de confirmer le résultat (Sanger sequencing, TubSeq supreme, Eurofins Genomics, Allemagne).

RÉSULTATS

Chauves-souris capturées

Sur l'ensemble des quatre sessions de prélèvement réparties dans les deux sites étudiés (Techoh et Xcucul Sur), un total de 89 chauves-souris a été capturé (voir **Tableau 2**). Sur le site de Techoh, 15 et 13 individus ont été capturés pendant les sessions 1 et 2 respectivement, tandis que 30 puis 31 individus ont été capturés sur le site de Xcucul Sur. Toutes les chauves-souris capturées font partie de l'espèce *Artibeus jamaicensis*. Parmi les individus adultes capturés, des longueurs moyennes mesurées (ainsi que les intervalles de confiances à 95%, entre crochets) sont de 77,4 mm [76,4 – 78,4] pour le corps et la tête, 58,4 mm [57,9 – 58,9] pour les avant-bras et 41 g [39,9 – 42,1] pour la masse moyenne. Ces mesures correspondent aux données morphométriques rapportées chez cette espèce : 70 – 85 mm pour le corps et la tête, 55 – 67 mm pour l'avant-bras et 29 – 51 g pour la masse (Grzimek et al., 2003).

| Sexe Age <i>Statut sexuel</i> | Techoh | | Xcucul Sur | | Total |
|-------------------------------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|
| | Session 1 | Session 2 | Session 1 | Session 2 | |
| Femelles | 7 | 8 | 17 | 17 | 49 |
| Adultes | 6 | 5 | 16 | 17 | 44 |
| <i>Actives</i> <i>Gestantes</i> | 3 | 3 | 3 | 9 | 18 |
| <i>Non gestantes</i> | 0 | 1 | 3 | 3 | 7 |
| <i>Inactives</i> | 3 | 1 | 10 | 5 | 19 |
| Juveniles | 1 | 3 | 1 | 0 | 5 |
| Mâles | 8 | 5 | 13 | 14 | 40 |
| Adultes | 8 | 5 | 13 | 14 | 40 |
| <i>Actifs</i> | 8 | 5 | 11 | 10 | 34 |
| <i>Inactifs</i> | 0 | 0 | 2 | 4 | 6 |
| Juveniles | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Total | 15 | 13 | 30 | 31 | 89 |

Tableau 2 Nombre de chauves-souris capturées lors des quatre sessions (parmi les deux sites Techoh et Xcucul Sur) en fonction de leur **sexe (mâle ou femelle, en gras)**, de leur âge (adulte ou juvénile, pour chacun des sexes) et de leur *statut d'activité sexuelle (actif ou inactif, uniquement parmi les adultes et avec une distinction entre les femelles gestantes et non gestantes pour les femelles sexuellement actives, en italique)*

Parmi ces 89 individus, 55% (49) étaient des femelles et 45% (40) des mâles. Une proportion globale de juvéniles de 5,6% (5 individus sur 89) a été obtenue. Ces 5 juvéniles sont toutes des femelles. Parmi les 25 femelles adultes et sexuellement actives capturées, 72% (18) étaient gestantes. La totalité des 40 mâles capturés était des adultes et, parmi eux, 85% (34) étaient sexuellement actifs. Aucun nouveau-né n'a été capturé.

Échantillons collectés et virus détectés

Les quatre sessions de prélèvement ont permis, toutes méthodes de prélèvement confondues, de collecter un total de 336 échantillons, dont 279 ont été analysés par PCR pour la recherche de CoV, AstV et HantV (voir **Tableau 3**). Parmi eux, 158 fèces fraîches ont été collectées et 153 ont été analysées. Un prélèvement de sang et un écouvillon rectal ont été réalisés sur l'ensemble des 89 individus capturés. Parmi ces échantillons, 89 prélèvements de sang et 37 écouvillons rectaux ont été analysés. Après la réalisation des PCR, l'ensemble des échantillons analysés, que ce soit pour la recherche de CoV, AstV ou HantV, sont négatifs. Aucun virus n'a été détecté dans les échantillons analysés à ce jour.

| | | Techoh | | Xcucul Sur | | Total |
|---------------------------------------|-----------------------|-----------|-----------|------------|-----------|------------|
| | | Session 1 | Session 2 | Session 1 | Session 2 | |
| Prélèvements de fèces fraîches | Echantillonnés | 25 | 55 | 51 | 27 | 158 |
| | Testés | 25 | 55 | 48 | 25 | 153 |
| | Positifs | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Écouvillons rectaux | Echantillonnés | 15 | 13 | 30 | 31 | 89 |
| | Testés | 15 | 1 | 21 | 0 | 37 |
| | Positifs | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Prélèvements de sang | Echantillonnés | 15 | 13 | 30 | 31 | 89 |
| | Testés | 15 | 13 | 30 | 31 | 89 |
| | Positifs | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Total | Testés | 55 | 69 | 99 | 56 | 279 |

Tableau 3 Nombre de prélèvements échantillonnés, testés par PCR et positifs pour au moins un des trois virus (CoV, AstV et HantV), classés par session de prélèvement, site et type de prélèvement réalisé

DISCUSSION

Détection d'aucun des trois virus dans les prélèvements

Sur les 153 prélèvements de fèces fraîches, 37 écouvillons rectaux et 89 prélèvements de sang testés par PCR, aucun échantillon n'est positif pour aucun des virus étudiés, CoV, AstV ou HantV. Pour expliquer ce résultat, trois hypothèses sont envisageables. La première serait de considérer qu'un ou plusieurs des protocoles de prélèvement et de détection des virus utilisés sont sous optimisés, ou qu'une mauvaise manipulation a été réalisée dans l'une de ces étapes. La deuxième serait de considérer que, comme l'infection et l'excrétion virale environnementale des chauves-souris sont variables au cours du temps, nos prélèvements ont pu être réalisés pendant une période avec des niveaux d'infection très faibles. Enfin, la troisième serait de considérer que la taille de notre échantillon n'était pas suffisante pour détecter les éventuels individus infectés.

Protocoles de prélèvement et de détection des virus

Dans cette première hypothèse, on considère qu'un ou plusieurs des protocoles de prélèvement et de détection des virus sont sous optimisés, ou qu'une mauvaise manipulation a été réalisée dans l'une de ces étapes. En effet, la détection de molécules d'ARN viral dans un échantillon biologique est le résultat de l'utilisation de plusieurs méthodes de conservation et de protocoles de laboratoires. Elle dépend notamment de la nature et de la méthode du prélèvement, du milieu et des conditions de conservation de l'échantillon, de la méthode d'extraction de l'ARN, des éventuels protocoles de validation de l'extraction et des protocoles d'amplification des séquences nucléotidiques virales (Bergner et al., 2019).

Tout d'abord, l'ARN contenu dans les virus à ARN (dont font partie les CoV, AstV et HantV) est très sensible à la dégradation, qui dépend de la température et des conditions de conservation (Bergner et al., 2019). La solution de *RNAlater* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientifique) est un support de conservation de l'ARN populaire lors de collectes d'échantillons sur le terrain. À partir d'écouvillons rectaux et oropharyngés collectés chez *Desmodus rotundus*, Bergner et al. ont testé l'effet de différents supports de conservation, de procédures d'extraction d'acide nucléique et des étapes d'enrichissement sur la détection de virus. Leurs résultats montrent que le *RNAlater* conserve mieux l'ARN viral que les Milieux de Transports Viraux (VTM) traditionnels (Bergner et al., 2019). Ils recommandent donc de privilégier son utilisation. Selon les indications du fabricant, le *RNAlater* permet effectivement de conserver l'ARN viral pendant un jour à 37°C, une semaine à 25°C, un mois à 4°C et indéfiniment à -20°C. Avec le protocole utilisé dans notre étude, un maximum de 8h s'est écoulé entre le dépôt des échantillons dans le *RNAlater* sur le terrain et leur congélation à -20°C au laboratoire. Cependant, nos tubes de prélèvement de 2 mL étaient seulement remplis de *RNAlater* à hauteur de 200 µL (pour les prélèvements de sang) et 500 µL (pour les écouvillons rectaux et les fèces fraîches). Malgré toutes nos précautions, comme les tubes étaient remplis à seulement un quart (500 µL sur 2 mL), les embouts des écouvillons (rectaux et de fèces) qui y étaient déposés ont pu se retrouver en dehors du liquide de conservation. Cela pourrait se produire lors du transport entre les sites de prélèvements et les congélateurs du laboratoire, même s'ils étaient maintenus verticalement. De plus, un transport par avion des échantillons a été réalisé entre les villes de Mérida et de Mexico, durant lequel ceux-ci ont tous été décongelés puis recongelés à l'arrivée (environ 8h entre les deux congélations). Avec les mouvements causés par le transport en avion, les écouvillons et le *RNAlater* ont pu se déplacer à l'intérieur du tube et, lorsqu'ils se sont tous les deux recongelés, ne plus être en

contact. Cela a été observé pour certains tubes au moment de démarrer l'étape d'extraction (des écouvillons n'étaient plus immergés dans le liquide). Cela pourrait avoir altéré la conservation de nos échantillons et donc de l'ARN viral qui s'y trouvait. Aussi, au moment du dépôt des écouvillons dans le liquide sur le terrain, l'agitation du tube ou le mélange des fèces dans le liquide n'étaient pas ou peu réalisés. Les fèces n'étaient pas parfaitement mélangés avec le liquide, comme il est recommandé par le fabricant du *RNAlater*. Ce simple dépôt des fèces dans les tubes, sans agitation ni mélange, pourrait expliquer une moins bonne pénétration du *RNAlater* dans les cellules et donc une moins bonne conservation de l'ARN viral.

L'extraction de l'ARN des échantillons a ensuite été réalisée. Une des étapes des protocoles d'extraction utilisés (QIAGEN RNeasy PowerFecal Pro Kit et QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit) fait intervenir une solution de retrait des inhibiteurs de PCR. En effet, la nature même de nos échantillons (fèces et sang) peut affecter la détection des virus qui s'y trouvent. La présence d'inhibiteurs des réactions d'amplification dans les fèces de chauves-souris a été suggérée par certaines études (Arnaout et al., 2023). La présence de ce genre d'inhibiteurs dans différents types d'échantillons biologiques est bien connue et peut diminuer les performances des réactions d'amplification pour la recherche d'agents pathogènes variés (Wilson, 1997). Les fèces contiennent par exemple des polysaccharides, des composés de l'hème et des sels biliaires, qui sont des inhibiteurs de PCR (Wilson, 1997). L'intervention d'une solution de retrait des inhibiteurs lors de l'extraction de l'ARN permet donc de réduire la quantité de ces molécules inhibitrices de PCR. Une autre étape de l'extraction fait intervenir de la DNase, une enzyme qui lyse les molécules d'ADN, dans le but de les éliminer et ainsi d'augmenter le rendement de l'extraction. Avant les étapes de RT et de PCR, certaines études vérifient l'efficacité de l'extraction de chacun des échantillons en recherchant par PCR de l'ARN correspondant au gène de la β -actine, gène exprimé dans l'ensemble des cellules de l'organisme (Arnaout et al., 2023). Cette étape, qui permet de s'assurer du succès de l'extraction de l'ARN et de l'absence d'inhibiteurs, n'a pas été réalisée dans notre étude.

Enfin, les étapes de transcription de l'ARN en ADN par RT et d'amplification des séquences nucléotidiques par PCR ont été réalisées. Les protocoles que nous avons utilisés étaient adaptés et optimisés à partir de ceux de Chu *et al.* pour les CoV et les AstV et de Raboni *et al.* pour les HantV (Chu et al., 2011, 2008; Raboni et al., 2005). Pour chacune des trois PCR, les durées et températures d'incubation ont été optimisées pour avoir une meilleure amplification, et des témoins positifs et négatifs ont été utilisés pour valider l'efficacité de nos PCR et exclure les contaminations. Pour la recherche de CoV, une revue de littérature réalisée par Drzewnioková *et al.* a montré que la majorité des protocoles de PCR utilisés avaient une sensibilité moyenne voir faible pour détecter les CoV. Le protocole de Chu *et al.* est utilisé dans 8% de ces études. Ils proposent également un nouveau protocole qui montre une meilleure sensibilité, surtout pour les alpha et bêta-CoV (Drzewnioková et al., 2021), mais que nous n'avons pas utilisé. Enfin, le séquençage Sanger des séquences amplifiées par PCR permet d'une part de confirmer les échantillons positifs, et d'autre part de pouvoir réaliser des études phylogénétiques. Pour la PCR des CoV, les amorces utilisées ciblent un fragment de 360 pb appartenant à la séquence codant pour la RdRp. Il a été montré que cette séquence était suffisante pour classer les CoV entre eux (Wilkinson et al., 2020). Le séquençage complet du génome n'est donc pas nécessaire pour les CoV.

Excrétion virale épisodique chez les chauves-souris

Dans la deuxième hypothèse pouvant expliquer l'absence de virus détecté, on considère que, comme l'infection et l'excrétion virale environnementale des chauves-souris sont variables au cours du temps, les prélèvements ont pu être réalisés pendant une période aux niveaux d'infection des populations très faibles. En effet, le nombre de chauves-souris infectées et donc l'intensité de l'excrétion virale d'une colonie fluctue au cours du temps. Celle-ci est épisodique et dépend de nombreux facteurs, écologiques et environnementaux (Plowright et al., 2016, 2015). Tout d'abord, les sessions de prélèvement de notre étude ont été conduites fin janvier - début février, ce qui correspondrait à une période de gestation des chauves-souris étudiées. En effet, les femelles de l'espèce *Artibeus jamaicensis* entrent en gestation de manière synchronisée début décembre pour une mise bas fin mars, ce qui positionne nos sessions de prélèvements exactement au milieu de cette période (voir **Figure 2**). Nous avons effectivement constaté que 72% des femelles adultes sexuellement actives capturées étaient gestantes (18 sur 25, voir **Tableau 2**). Or, grâce à des modèles Bayésiens et des données regroupées à partir de plusieurs études longitudinales, Eskew *et al.* ont démontré que les périodes de gestation chez les chauves-souris étaient significativement associées à des périodes d'excrétion virale réduite. Ils recommandent donc de ne pas cibler les périodes de gestation pour la recherche de virus, afin de ne pas biaiser les études de prévalence et de recherche de virus (Eskew et al., 2024). Des taux de détection de 0% ont en effet été mesurés à plusieurs reprises dans certaines études longitudinales sur les chauves-souris (Geldenhuys et al., 2023; Joffrin et al., 2022). Ainsi, les prévalences nulles que nous avons mesuré pourraient être expliquées par un niveau d'immunité global élevé dans les colonies, associé à la période de gestation.

A l'inverse, l'observation d'individus juvéniles était rare, avec seulement 5,6% de juvéniles identifiés parmi les chauves-souris capturées (5 sur 89, voir **Tableau 2**). Or, il se trouve que la période des juvéniles (juste après le sevrage) est le facteur augmentant le niveau d'excrétion virale d'une colonie le plus rapporté par les études portant sur les chauves-souris à travers le monde. Ce constat a été fait pour plusieurs virus (surtout les CoV, mais aussi les virus de Marburg, Nipah et de Hendra, entre autres), dans de nombreuses régions du monde et pour des espèces de chauves-souris variées (Amman et al., 2012; Cappelle et al., 2021; Epstein et al., 2020; Geldenhuys et al., 2023; Hoarau et al., 2023; Joffrin et al., 2022; Plowright et al., 2008; Wacharapluesadee et al., 2018). Avec une approche théorique utilisant des modèles stochastiques, Peel *et al.* ont formalisé l'effet des naissances saisonnières synchronisées, et donc de l'augmentation du nombre d'individus juvéniles, sur les dynamiques de transmission et d'excrétion des pathogènes par les chauves-souris (Peel et al., 2014). Ce phénomène est en partie expliqué par la diminution progressive de la quantité d'anticorps d'origine maternelle chez les individus juvéniles, peu de temps après le sevrage. L'étude de Epstein *et al.* a montré qu'une diminution de la quantité d'anticorps chez les juvéniles autour de 3 à 5 mois précédait systématiquement les augmentations de prévalence du virus Nipah chez les chauves-souris, et qu'elles étaient associées à des épidémies humaines (Epstein et al., 2020). Comme nos sessions de prélèvement n'ont pas eu lieu pendant une période de sevrage avec beaucoup d'individus juvéniles (seulement 5,6% des individus capturés), nos chances de détecter des virus n'étaient probablement pas maximales. De plus, dans des travaux parallèles encore non publiés, des CoV ont été détectés dans des écouvillons rectaux d'*Artibeus jamaicensis* prélevés en octobre 2021 et juin 2022, dans la péninsule du Yucatán. Ces deux dates semblent quant à elles correspondre aux deux périodes où l'on retrouve de nombreux individus juvéniles chez cette espèce (voir **Figure 2**).

Enfin, des facteurs environnementaux peuvent augmenter l'excrétion virale des populations de chauves-souris, notamment les facteurs pouvant causer du stress nutritionnel (Plowright et al., 2016, 2015). Cette observation a été faite pour des phénomènes climatiques (Eby et al., 2023) et pour les perturbations causées par les activités humaines (Warmuth et al., 2023). Une étude expérimentale a même montré que l'excrétion virale était plus intense et plus durable dans le temps pour les individus *Artibeus jamaicensis* infectés par un virus (Falvo et al., 2023). Dans notre cas, les prélèvements ont été réalisés fin janvier - début février, ce qui correspond à la saison sèche et donc une période où les fruits se font plus rares (voir **Figure 2 (A)**). Même si les fruits sont moins abondants, leur quantité disponible n'est pas nulle et, de toute façon, cette espèce n'est pas exclusivement frugivore et peut se nourrir de fleurs et de pollen, comme en témoigne le pelage jaune des individus capturés (voir **Figure 1 (B)**). En ce qui concerne les perturbations d'origine humaine, même si les colonies étudiées sont situées au sein même de deux villages, ceux-ci sont de petits villages ruraux (386 habitants pour Techoh et 495 pour Xcucul Sur) dans lesquels peu d'activité agricole et de déforestation ne sont rapportées. À notre connaissance, aucun événement majeur pouvant perturber les chauves-souris n'a eu lieu récemment. De plus, *Artibeus jamaicensis* est une espèce réputée comme pouvant s'adapter facilement aux environnements urbains (Grzimek et al., 2003). Ainsi, il est peu probable qu'une perturbation climatique ou anthropique ait induit une augmentation de l'excrétion virale dans nos colonies étudiées, ce qui serait compatible avec nos taux de détection nuls mesurés.

Taille de l'échantillon

Dans la troisième hypothèse qui pourrait expliquer nos résultats, il est envisagé que la taille de notre échantillon ne soit pas suffisante pour détecter les individus infectés. En effet, dans la colonie de Techoh, constituée d'environ 300 chauves-souris, seulement 15 et 13 individus ont été capturés lors des sessions 1 et 2 respectivement, tandis que dans la colonie de Xcucul Sur, d'environ 100 chauves-souris, 30 et 31 individus ont été capturés (voir **Tableau 2**). Parmi ces 89 individus capturés au total, seulement 89 prélèvements de sang et 37 écouillons rectaux ont été analysés. Le nombre de fèces fraîches analysées est quant à lui de 153 (voir **Tableau 3**). Si l'on prend comme exemple les CoV, qui ne sont pas retrouvés dans le sang, et que l'on considère que les fèces et les écouillons rectaux ($153 + 37 = 190$) aient été parfaitement prélevés et analysés avec une sensibilité et une spécificité de 100%, alors la probabilité de n'avoir que des résultats négatifs est de $0,95^{190} = 0,0058\%$ (avec une prévalence virale réelle supposée de 5%, soit une probabilité d'avoir un individu négatif de 95%). Ce cas-là est donc peu probable. En revanche, si l'on considère cette fois que les prélèvements de fèces n'aient pas été bien réalisés et qu'ils sont inutilisables, la probabilité que l'analyse des 37 écouillons rectaux ne donne aucun positif est de $0,95^{37} = 15,0\%$. Dans ce cas-là, le risque d'obtenir des résultats entièrement négatifs à cause du hasard n'est clairement pas négligeable. Ainsi, le nombre d'échantillons collectés dans cette étude n'était peut-être pas suffisant pour détecter les faibles prévalences virales de ces deux colonies.

Perspectives et recommandations

Comprendre les dynamiques d'infection chez les chauves-souris du Yucatán

Même si aucun virus n'a été détecté dans cette étude, une poursuite des efforts de recherche portant sur les dynamiques de transmission virale chez les chauves-souris est nécessaire. Des sessions de prélèvement semblables à celles réalisées ici devraient être mises en place régulièrement pour

obtenir un suivi longitudinal des prévalences et de l'excrétion environnementale. Un suivi longue durée permettrait d'étudier les variations de prévalence au cours du temps et, en les couplant aux paramètres écologiques de l'espèce, à la saison et aux perturbations humaines, d'identifier des facteurs pouvant augmenter ou diminuer les niveaux d'excrétion virale dans l'environnement. Cela permettrait de valider l'effet aggravant de la période de sevrage sur l'excrétion virale, et l'effet atténuant de la période de gestation sur celle-ci, pour l'espèce *Artibeus jamaicensis* dans la péninsule du Yucatán. Les périodes de forte excrétion virale dans l'environnement sont des périodes à risque pour les événements de *spillover*, c'est-à-dire de transmission d'un virus à d'autres espèces, qu'elles soient animales ou humaines. Identifier clairement ces périodes permettrait de mettre en place des mesures de prévention et de contrôle des maladies zoonotiques dans la péninsule du Yucatán.

Un élargissement de l'étude des zoonoses virales pourrait ensuite être envisagé. En augmentant le nombre de colonies et la zone géographique étudiées, la transmission de virus entre différentes colonies pourrait être décrite, tout comme son impact sur les dynamiques de transmission des virus. La région du Yucatán présente de très nombreuses colonies de chauves-souris, souvent situées à moins de 1 km les unes des autres, y compris à l'intérieur et à proximité de la ville de Mérida. Un séquençage de l'ensemble des virus détectés permettrait d'établir un lien phylogénétique entre les virus détectés, à la fois au sein d'une colonie, entre colonies et avec les autres virus détectés sur la planète. Le séquençage permettrait aussi de caractériser les souches qui circulent et d'évaluer leur potentiel zoonotique. Un élargissement des espèces animales étudiées pourrait aussi être réalisé, car de nombreux animaux sont exposés aux virus excrétés par les chauves-souris dans l'environnement. Ces animaux exposés peuvent aussi bien être domestiques, avec le chien et le chat, que sauvages, avec les rongeurs et certains marsupiaux. Ces espèces pourraient éventuellement constituer un pont entre les chauves-souris et l'humain, ce qui motiverait une étude approfondie des interfaces entre faune sauvage, faune domestique et humains.

Intérêt des prélèvements de fèces

Pour revenir à notre question initiale, l'efficacité et l'intérêt des prélèvements environnementaux de fèces fraîches de chauves-souris nécessitent d'être évalués. Cette technique de prélèvement, déjà utilisée par plusieurs études dans le monde, possède en effet de nombreux avantages. Il s'agit d'une méthode de prélèvement rapide et facile à mettre en place, qui permet d'identifier les virus qui circulent dans une colonie tout en évaluant les prévalences virales associées. Le fait que cette technique soit non invasive et qu'elle ne nécessite pas la capture des individus permet d'améliorer le bien-être animal tout en minimisant les perturbations causées par les équipes de recherche sur les colonies. Cependant, c'est pour ces mêmes raisons que des paramètres comme l'espèce, l'âge et le sexe ne peuvent pas être associés à un prélèvement de fèces donné, ni évalués à l'échelle de la colonie.

L'intensité de l'excrétion de virus dans l'environnement par des chauves-souris infectées, directement quantifiable par les prélèvements de fèces, est un facteur de risque déterminant pour le *spillover*. La zone de contact entre les chauves-souris et d'autres animaux, surtout les rongeurs, constitue une interface cruciale dans laquelle la transmission d'un virus entre deux espèces peut aboutir à l'émergence ou la réémergence d'une maladie infectieuse, potentiellement pandémique. La technique du prélèvement de fèces au niveau de cette interface est donc un excellent indicateur du risque de *spillover* et qui mériterait d'être validée et utilisée plus fréquemment pour quantifier ce risque à large échelle.

RÉFÉRENCES

- Aguilar-Setien, A., Loza-Rubio, E., Salas-Rojas, M., Brisseau, N., Cliquet, F., Pastoret, P.P., Rojas-Dotor, S., Tesoro, E., Kretschmer, R., 2005. Salivary excretion of rabies virus by healthy vampire bats. *Epidemiol. Infect.* 133, 517–522.
- 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., Cannon, D.L., Khristova, M.L., Atimnedi, P., Paddock, C.D., Crockett, R.J.K., Flietstra, T.D., Warfield, K.L., Unfer, R., Katongole-Mbidde, E., Downing, R., Tappero, J.W., Zaki, S.R., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Nichol, S.T., Towner, J.S., 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. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002877>
- 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., Karesh, W., Lipkin, W.I., Morse, S.S., PREDICT Consortium, Mazet, J.A.K., Goldstein, T., 2017. Global patterns in coronavirus diversity. *Virus Evol.* 3, vex012. <https://doi.org/10.1093/ve/vex012>
- Anthony, S.J., Ojeda-Flores, R., Rico-Chávez, O., Navarrete-Macias, I., Zambrana-Torrel, C.M., Rostal, M.K., Epstein, J.H., Tipps, T., Liang, E., Sanchez-Leon, M., Sotomayor-Bonilla, J., Aguirre, A.A., Ávila-Flores, R., Medellín, R.A., Goldstein, T., Suzán, G., Daszak, P., Lipkin, W.I., 2013. Coronaviruses in bats from Mexico. *J. Gen. Virol.* 94, 1028–1038. <https://doi.org/10.1099/vir.0.049759-0>
- Arai, S., Yanagihara, R., 2020. Genetic Diversity and Geographic Distribution of Bat-borne Hantaviruses. *Curr. Issues Mol. Biol.* 39, 1–28. <https://doi.org/10.21775/cimb.039.001>
- Arnaut, Y., Picard-Meyer, E., Robardet, E., Cappelle, J., Cliquet, F., Touzalin, F., Jimenez, G., Djelouadji, Z., 2023. Assessment of virus and *Leptospira* carriage in bats in France. *PloS One* 18, e0292840. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0292840>
- 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., Wesolowski, A., Metcalf, C.J.E., 2022. Infectious disease in an era of global change. *Nat. Rev. Microbiol.* 20, 193–205. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00639-z>
- Bentim Góes, L.G., Ruvalcaba, S.G., Campos, A.A., Queiroz, L.H., de Carvalho, C., Jerez, J.A., Durigon, E.L., Dávalos, L.I.I., Dominguez, S.R., 2013. Novel bat coronaviruses, Brazil and Mexico. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1711–1713. <https://doi.org/10.3201/eid1910.130525>
- Bergner, L.M., Orton, R.J., da Silva Filipe, A., Shaw, A.E., Becker, D.J., Tello, C., Biek, R., Streicker, D.G., 2019. Using noninvasive metagenomics to characterize viral communities from wildlife. *Mol. Ecol. Resour.* 19, 128–143. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12946>
- Brnić, D., Lojkić, I., Krešić, N., Zrnčić, V., Ružanović, L., Mikuletić, T., Bosilj, M., Steyer, A., Keros, T., Habrun, B., Jemeršić, L., 2023. Circulation of SARS-CoV-Related Coronaviruses and Alphacoronaviruses in Bats from Croatia. *Microorganisms* 11, 959. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040959>
- Cappelle, J., Furey, N., Hoem, T., Ou, T.P., Lim, T., Hul, V., Heng, O., Chevalier, V., Dussart, P., Duong, V., 2021. Longitudinal monitoring in Cambodia suggests higher circulation of alpha and betacoronaviruses in juvenile and immature bats of three species. *Sci. Rep.* 11, 24145. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03169-z>
- Cappelle, J., Hoem, T., Hul, V., Furey, N., Nguon, K., Prigent, S., Dupon, L., Ken, S., Neung, C., Hok, V., Pring, L., Lim, T., Bumrungsri, S., Duboz, R., Buchy, P., Ly, S., Duong, V., Tarantola, A., Binot, A., Dussart, P., 2020. Nipah virus circulation at human-bat interfaces, Cambodia. *Bull. World Health Organ.* 98, 539–547. <https://doi.org/10.2471/BLT.20.254227>
- Chan-Yeung, M., Xu, R.-H., 2003. SARS: epidemiology. *Respirol. Carlton Vic* 8 Suppl, S9-14. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1843.2003.00518.x>
- Chen, L., Liu, B., Yang, J., Jin, Q., 2014. DBatVir: the database of bat-associated viruses. *Database* 2014, bau021. <https://doi.org/10.1093/database/bau021>
- Chu, D.K.W., Leung, C.Y.H., Gilbert, M., Joyner, P.H., Ng, E.M., Tse, T.M., Guan, Y., Peiris, J.S.M., Poon, L.L.M., 2011. Avian coronavirus in wild aquatic birds. *J. Virol.* 85, 12815–12820. <https://doi.org/10.1128/JVI.05838-11>

- Chu, D.K.W., Poon, L.L.M., Guan, Y., Peiris, J.S.M., 2008. Novel Astroviruses in Insectivorous Bats. *J. Virol.* 82, 9107–9114. <https://doi.org/10.1128/JVI.00857-08>
- Colunga-Salas, P., Sánchez-Montes, S., Grostieta, E., Verde-Arregoitia, L.D., Cabrera-Garrido, M.Y., Becker, I., León-Paniagua, L., 2020. What do studies in wild mammals tell us about human emerging viral diseases in Mexico? *Transbound. Emerg. Dis.* 67, 33–45. <https://doi.org/10.1111/tbed.13336>
- Corman, V.M., Rasche, A., Diallo, T.D., Cottontail, V.M., Stöcker, A., Souza, B.F. de C.D., Corrêa, J.I., Carneiro, A.J.B., Franke, C.R., Nagy, M., Metz, M., Knörnschild, M., Kalko, E.K.V., Ghanem, S.J., Morales, K.D.S., Salsamendi, E., Spínola, M., Herrler, G., Voigt, C.C., Tschapka, M., Drosten, C., Drexler, J.F., 2013. Highly diversified coronaviruses in neotropical bats. *J. Gen. Virol.* 94, 1984–1994. <https://doi.org/10.1099/vir.0.054841-0>
- Cui, X., Fan, K., Liang, X., Gong, W., Chen, W., He, B., Chen, X., Wang, H., Wang, X., Zhang, P., Lu, Xingbang, Chen, R., Lin, K., Liu, J., Zhai, J., Liu, D.X., Shan, F., Li, Y., Chen, R.A., Meng, H., Li, X., Mi, S., Jiang, J., Zhou, N., Chen, Z., Zou, J.-J., Ge, D., Yang, Q., He, K., Chen, T., Wu, Y.-J., Lu, H., Irwin, D.M., Shen, X., Hu, Y., Lu, Xiaoman, Ding, C., Guan, Y., Tu, C., Shen, Y., 2023. Virus diversity, wildlife-domestic animal circulation and potential zoonotic viruses of small mammals, pangolins and zoo animals. *Nat. Commun.* 14, 2488. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38202-4>
- de Araujo, J., Thomazelli, L.M., Henriques, D.A., Lautenschlager, D., Ometto, T., Dutra, L.M., Aires, C.C., Favorito, S., Durigon, E.L., 2012. Detection of hantavirus in bats from remaining rain forest in São Paulo, Brazil. *BMC Res. Notes* 5, 690. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-690>
- De Benedictis, P., Schultz-Cherry, S., Burnham, A., Cattoli, G., 2011. Astrovirus infections in humans and animals – Molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infect. Genet. Evol.* 11, 1529–1544. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.07.024>
- Donato, C., Vijaykrishna, D., 2017. The Broad Host Range and Genetic Diversity of Mammalian and Avian Astroviruses. *Viruses* 9, 102. <https://doi.org/10.3390/v9050102>
- Drzewnioková, P., Festa, F., Panzarin, V., Lelli, D., Moreno, A., Zecchin, B., De Benedictis, P., Leopardi, S., 2021. Best Molecular Tools to Investigate Coronavirus Diversity in Mammals: A Comparison. *Viruses* 13, 1975. <https://doi.org/10.3390/v13101975>
- Eby, P., Peel, A.J., Hoegh, A., Madden, W., Giles, J.R., Hudson, P.J., Plowright, R.K., 2023. Pathogen spillover driven by rapid changes in bat ecology. *Nature* 613, 340–344. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05506-2>
- Edson, D., Field, H., McMichael, L., Vidgen, M., Goldspink, L., Broos, A., Melville, D., Kristoffersen, J., de Jong, C., McLaughlin, A., Davis, R., Kung, N., Jordan, D., Kirkland, P., Smith, C., 2015. Routes of Hendra Virus Excretion in Naturally-Infected Flying-Foxes: Implications for Viral Transmission and Spillover Risk. *PLoS ONE* 10, e0140670. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140670>
- Epstein, J.H., Anthony, S.J., Islam, Ariful, Kilpatrick, A.M., Ali Khan, S., Balkey, M.D., Ross, N., Smith, I., Zambrana-Torrelío, C., Tao, Y., Islam, Ausrafu, Quan, P.L., Olival, K.J., Khan, M.S.U., Gurley, E.S., Hossein, M.J., Field, H.E., Fielder, M.D., Briese, T., Rahman, M., Broder, C.C., Cramer, G., Wang, L.-F., Luby, S.P., Lipkin, W.I., Daszak, P., 2020. Nipah virus dynamics in bats and implications for spillover to humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 29190–29201. <https://doi.org/10.1073/pnas.2000429117>
- Eshar, D., Weinberg, M., 2010. Venipuncture in bats. *Lab Anim.* 39, 175–176. <https://doi.org/10.1038/labani0610-175>
- Eskew, E.A., Olival, K.J., Mazet, J.A.K., Daszak, P., PREDICT Consortium, 2024. A global-scale dataset of bat viral detection suggests that pregnancy reduces viral shedding. *BioRxiv Prepr. Serv. Biol.* 2024.02.25.581969. <https://doi.org/10.1101/2024.02.25.581969>
- Falvo, C., Crowley, D., Benson, E., Hall, M.N., Schwarz, B., Bohrsen, E., Ruiz-Aravena, M., Hebner, M., Ma, W., Schountz, T., Rynda-Apple, A., Plowright, R.K., 2023. Diet-induced changes in metabolism influence immune response and viral shedding dynamics in Jamaican fruit bats. *BioRxiv Prepr. Serv. Biol.* 2023.12.01.569121. <https://doi.org/10.1101/2023.12.01.569121>
- Forni, D., Cagliani, R., Clerici, M., Sironi, M., 2017. Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. *Trends Microbiol.* 25, 35–48. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.001>

- Geldenhuis, M., Ross, N., Dietrich, M., de Vries, J.L., Mortlock, M., Epstein, J.H., Weyer, J., Pawęska, J.T., Markotter, W., 2023. Viral maintenance and excretion dynamics of coronaviruses within an Egyptian rousette fruit bat maternal colony: considerations for spillover. *Sci. Rep.* 13, 15829. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-42938-w>
- Ghosh, S., Malik, Y.S., 2020. Drawing Comparisons between SARS-CoV-2 and the Animal Coronaviruses. *Microorganisms* 8, 1840. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111840>
- Graham, R.L., 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>
- Grzimek, B., Schlager, N., Olendorf, D., 2003. *Grzimek's animal life encyclopedia*, 2nd ed. ed. Gale, Detroit.
- Guo, W.-P., Lin, X.-D., Wang, W., Tian, J.-H., Cong, M.-L., Zhang, H.-L., Wang, M.-R., Zhou, R.-H., Wang, J.-B., Li, M.-H., Xu, J., Holmes, E.C., Zhang, Y.-Z., 2013. Phylogeny and Origins of Hantaviruses Harbored by Bats, Insectivores, and Rodents. *PLOS Pathog.* 9, e1003159. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003159>
- Gupta, P., Singh, M.P., Goyal, K., Tripti, P., Ansari, M.I., Obli Rajendran, V., Dhama, K., Malik, Y.S., 2021. Bats and viruses: a death-defying friendship. *Virusdisease* 32, 467–479. <https://doi.org/10.1007/s13337-021-00716-0>
- Habeebur-Rahman, S.P., Noni, V., Khan, F.A.A., Tan, C.-S., 2023. Detection of novel coronaviruses from dusky fruit bat (*Penthetor lucasi*) in Sarawak, Malaysian Borneo. *Vet. Med. Sci.* 9, 2634–2641. <https://doi.org/10.1002/vms3.1251>
- Hao, X., Lu, Q., Zhao, H., 2023. A molecular phylogeny for all 21 families within Chiroptera (bats). *Integr. Zool.* n/a. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12772>
- Hemnani, M., da Silva, P.G., Thompson, G., Poeta, P., Rebelo, H., Mesquita, J.R., 2023. First Report of Alphacoronavirus Circulating in Cavernicolous Bats from Portugal. *Viruses* 15, 1521. <https://doi.org/10.3390/v15071521>
- Hernández-Aguilar, I., Lorenzo, C., Santos-Moreno, A., Naranjo, E.J., Navarrete-Gutiérrez, D., 2021. Coronaviruses in Bats: A Review for the Americas. *Viruses* 13, 1226. <https://doi.org/10.3390/v13071226>
- Hoarau, A.O.G., Goodman, S.M., Al Halabi, D., Ramasindrazana, B., Lagadec, E., Le Minter, G., Köster, M., Dos Santos, A., Schoeman, M.C., Gudo, E.S., Mavingui, P., Lebarbenchon, C., 2021. Investigation of astrovirus, coronavirus and paramyxovirus co-infections in bats in the western Indian Ocean. *Virol. J.* 18, 205. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01673-2>
- Hoarau, A.O.G., Köster, M., Dietrich, M., Le Minter, G., Joffrin, L., Ramanantsalama, R.V., Mavingui, P., Lebarbenchon, C., 2023. Synchronicity of viral shedding in molossid bat maternity colonies. *Epidemiol. Infect.* 151, e47. <https://doi.org/10.1017/S0950268823000171>
- Irving, A.T., Ahn, M., Goh, G., Anderson, D.E., Wang, L.-F., 2021. Lessons from the host defences of bats, a unique viral reservoir. *Nature* 589, 363–370. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03128-0>
- Joffrin, L., Hoarau, A.O.G., 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>
- Jones, B.A., Grace, D., Kock, R., Alonso, S., Rushton, J., Said, M.Y., McKeever, D., Mutua, F., Young, J., McDermott, J., Pfeiffer, D.U., 2013. Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 8399–8404. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208059110>
- Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., Daszak, P., 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990–993. <https://doi.org/10.1038/nature06536>
- Kabwe, E., Davidyuk, Y., Shamsutdinov, A., Garanina, E., Martynova, E., Kitaeva, K., Malisheni, M., Isaeva, G., Savitskaya, T., Urbanowicz, R.A., Morzunov, S., Katongo, C., Rizvanov, A., Khaiboullina, S., 2020. Orthohantaviruses, Emerging Zoonotic Pathogens. *Pathog. Basel Switz.* 9, 775. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090775>
- Kasso, M., Balakrishnan, M., 2013. Ecological and Economic Importance of Bats (Order Chiroptera). *Int. Sch. Res. Not.* 2013, e187415. <https://doi.org/10.1155/2013/187415>

- Keesing, F., Ostfeld, R.S., 2021. Dilution effects in disease ecology. *Ecol. Lett.* 24, 2490–2505. <https://doi.org/10.1111/ele.13875>
- Leao, J.C., Gusmao, T.P. de L., Zarzar, A.M., Leao Filho, J.C., Barkokebas Santos de Faria, A., Morais Silva, I.H., Gueiros, L.A.M., Robinson, N.A., Porter, S., Carvalho, A. de A.T., 2022. Coronaviridae-Old friends, new enemy! *Oral Dis.* 28 Suppl 1, 858–866. <https://doi.org/10.1111/odi.13447>
- Letko, M., Seifert, S.N., Olival, K.J., Plowright, R.K., Munster, V.J., 2020. Bat-borne virus diversity, spillover and emergence. *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 461–471. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0394-z>
- Liu, Z., Liu, Q., Wang, H., Yao, X., 2024. Severe zoonotic viruses carried by different species of bats and their regional distribution. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30, 206–210. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2023.09.025>
- Loh, E.H., Nava, A., Murray, K.A., Olival, K.J., Guimarães, M., Shimabukuro, J., Zambrana-Torrel, C., Fonseca, F.R., de Oliveira, D.B.L., Campos, A.C. de A., Durigon, E.L., Ferreira, F., Struebig, M.J., Daszak, P., 2022. Prevalence of bat viruses associated with land-use change in the Atlantic Forest, Brazil. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12, 921950. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.921950>
- 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., Fooks, A.R., Rupprecht, C.E., Wood, J.L.N., Webb, C.T., 2013. A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 280, 20122753. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2753>
- Martinez-Valdebenito, C., Calvo, M., Vial, C., Mansilla, R., Marco, C., Palma, R.E., Vial, P.A., Valdivieso, F., Mertz, G., Ferrés, M., 2014. Person-to-person household and nosocomial transmission of andes hantavirus, Southern Chile, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1629–1636. <https://doi.org/10.3201/eid2010.140353>
- Medellín, R., Arita, H., Sanchez, O., 2008. Identificación de los murciélagos de México. Clave de campo. Segunda Edición. Instituto de Ecología. Univ. Nac. Autónoma México.
- Mollentze, N., 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>
- Moreira-Soto, A., Taylor-Castillo, L., Vargas-Vargas, N., Rodríguez-Herrera, B., Jiménez, C., Corrales-Aguilar, E., 2015. Neotropical Bats from Costa Rica harbour Diverse Coronaviruses. *Zoonoses Public Health* 62, 501–505. <https://doi.org/10.1111/zph.12181>
- Morrison, P., McNab, B.K., 1967. Temperature regulation in some Brazilian phyllostomid bats. *Comp. Biochem. Physiol.* 21, 207–221. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(67\)90130-2](https://doi.org/10.1016/0010-406X(67)90130-2)
- Nicola, M., Alsafi, Z., Sohrabi, C., Kerwan, A., Al-Jabir, A., Iosifidis, C., Agha, M., Agha, R., 2020. The socio-economic implications of the coronavirus pandemic (COVID-19): A review. *Int. J. Surg. Lond. Engl.* 78, 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2020.04.018>
- 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., Wood, J.L.N., 2014. Bat flight and zoonotic viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 741–745. <https://doi.org/10.3201/eid2005.130539>
- 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., Restif, O., 2014. The effect of seasonal birth pulses on pathogen persistence in wild mammal populations. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281, 20132962. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2962>
- 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., Tabor, G.M., Skerratt, L.F., Anderson, D.L., Cramer, G., Quammen, D., Jordan, D., Freeman, P., Wang, L.-F., Epstein, J.H., Marsh, G.A., Kung, N.Y., McCallum, H., 2015. Ecological dynamics of emerging bat virus spillover. *Proc. Biol. Sci.* 282, 20142124. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2124>
- Plowright, R.K., Field, H.E., Smith, C., Divljan, A., Palmer, C., Tabor, G., Daszak, P., 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 Biol. Sci.* 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., Daszak, P., 2011. Urban habituation, ecological connectivity and epidemic dampening: the emergence of Hendra virus from flying foxes (*Pteropus* spp.). *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 278, 3703–3712. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0522>
- Plowright, R.K., Peel, A.J., Streicker, D.G., Gilbert, A.T., McCallum, H., Wood, J., Baker, M.L., Restif, O., 2016. Transmission or Within-Host Dynamics Driving Pulses of Zoonotic Viruses in Reservoir–Host Populations. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004796. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004796>
- Rabaan, A.A., Al-Ahmed, S.H., Sah, R., Alqumber, M.A., Haque, S., Patel, S.K., Pathak, M., Tiwari, R., Yattoo, M.I., Haq, A.U., Bilal, M., Dhama, K., Rodriguez-Morales, A.J., 2021. MERS-CoV: epidemiology, molecular dynamics, therapeutics, and future challenges. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 20, 8. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00414-7>
- Raboni, S.M., Zeferino, A., Skraba, I., Rubio, G., Dos Santos, C.N.D., De Borba, L., Goldenberg, S., 2005. Clinical survey of hantavirus in southern Brazil and the development of specific molecular diagnosis tools. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72, 800–804. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2005.72.800>
- Razzauti, M., Plyusnina, A., Henttonen, H., Plyusnin, A., 2008. Accumulation of point mutations and reassortment of genomic RNA segments are involved in the microevolution of Puumala hantavirus in a bank vole (*Myodes glareolus*) population. *J. Gen. Virol.* 89, 1649–1660. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/001248-0>
- Rico Chávez, O., Ojeda Flores, R., Sotomayor Bonilla, J., Zambrana-Torrel, C., Loza Rubio, E., Alonso Aguirre, A., Suzán, G., 2015. Viral diversity of bat communities in human-dominated landscapes in Mexico. *Vet. México OA* 2, 01–23.
- Roach, S.N., Langlois, R.A., 2021. Intra- and Cross-Species Transmission of Astroviruses. *Viruses* 13, 1127. <https://doi.org/10.3390/v13061127>
- Sabino-Santos, G., Maia, F.G.M., Vieira, T.M., de Lara Muylaert, R., Lima, S.M., Gonçalves, C.B., Barroso, P.D., Melo, M.N., Jonsson, C.B., Goodin, D., Salazar-Bravo, J., Figueiredo, L.T.M., 2015. Evidence of Hantavirus Infection among Bats in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 93, 404–406. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0032>
- Sabino-Santos Jr, G., Maia, F.G.M., Martins, R.B., Gagliardi, T.B., Souza, W.M. de, Muylaert, R.L., Luna, L.K. de S., Melo, D.M., Cardoso, R. de S., Barbosa, N. da S., Pontelli, M.C., Mamani-Zapana, P.R., Vieira, T.M., Melo, N.M., Jonsson, C.B., Goodin, D., Salazar-Bravo, J., daSilva, L.L.P., Arruda, E., Figueiredo, L.T.M., 2018. Natural infection of Neotropical bats with hantavirus in Brazil. *Sci. Rep.* 8, 9018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27442-w>
- Sagheb, S., Gholamrezanezhad, A., Pavlovic, E., Karami, M., Fakhrzadegan, M., 2024. Country-based modelling of COVID-19 case fatality rate: A multiple regression analysis. *World J. Virol.* 13, 87881. <https://doi.org/10.5501/wjv.v13.i1.87881>
- Souza, W.M. de, Machado, A.M., Figueiredo, L.T.M., 2016. Experimental infection of Rio Mamore hantavirus in Sigmodontinae rodents. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 111, 399–402. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160021>
- Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A.C.K., Zhou, J., Liu, W., Bi, Y., Gao, G.F., 2016. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.* 24, 490–502. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.003>
- Vado-Solís, I., Pérez-Osorio, C., Lara-Lara, J., Ruiz-Piña, H.A., Cárdenas-Marrufo, M., Milazzo, M.L., Fulhorst, C.F., Zavala-Velázquez, J., 2003. Serum evidence of Hantavirus infection in people from Yucatan Mexico. *Rev. Bioméd.* 14, 221–225.
- Viguera-Galván, A.L., López-Pérez, A.M., García-Peña, G.E., Rico-Chávez, O., Sarmiento-Silva, R.E., Suzán, G., 2019. Current Situation and Perspectives on Hantaviruses in Mexico. *Viruses* 11, 642. <https://doi.org/10.3390/v11070642>
- Wacharapluesadee, S., Duengkae, P., Chaives, A., Kaewpom, T., Rodpan, A., Yingsakmongkon, S., Petcharat, S., Phengsakul, P., Maneorn, P., Hemachudha, T., 2018. Longitudinal study of age-specific pattern of coronavirus infection in Lyle's flying fox (*Pteropus lylei*) in Thailand. *Virol. J.* 15, 38. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-0950-6>
- Warmuth, V.M., Metzler, D., Zamora-Gutierrez, V., 2023. Human disturbance increases coronavirus prevalence in bats. *Sci. Adv.* 9, eadd0688. <https://doi.org/10.1126/sciadv.add0688>

- Weiss, S.R., Navas-Martin, S., 2005. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 69, 635–664. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.4.635-664.2005>
- Wells, H.L., Bonavita, C.M., Navarrete-Macias, I., Vilchez, B., Rasmussen, A.L., Anthony, S.J., 2023. The coronavirus recombination pathway. *Cell Host Microbe* 31, 874–889. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.05.003>
- Widagdo, W., Begeman, L., Schipper, D., Run, P.R. van, Cunningham, A.A., Kley, N., Reusken, C.B., Haagmans, B.L., van den Brand, J.M.A., 2017. Tissue Distribution of the MERS-Coronavirus Receptor in Bats. *Sci. Rep.* 7, 1193. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01290-6>
- Wilkinson, D.A., 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. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001494>
- Wilson, I.G., 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3741–3751.
- Wong, A.C.P., Li, X., Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., 2019. Global Epidemiology of Bat Coronaviruses. *Viruses* 11, 174. <https://doi.org/10.3390/v11020174>
- Xiao, J., Li, J., Hu, G., Chen, Zhong, Wu, Y., Chen, Y., Chen, Zhiyong, Liao, Y., Zhou, Jie, Ke, X., Ma, L., Liu, S., Zhou, Junhua, Dai, Y., Chen, H., Yu, S., Chen, Q., 2011. Isolation and phylogenetic characterization of bat astroviruses in southern China. *Arch. Virol.* 156, 1415–1423. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1011-2>
- Ye, Z.-W., Yuan, S., Yuen, K.-S., Fung, S.-Y., Chan, C.-P., Jin, D.-Y., 2020. Zoonotic origins of human coronaviruses. *Int. J. Biol. Sci.* 16, 1686–1697. <https://doi.org/10.7150/ijbs.45472>
- Zain, A., Sadarangani, S.P., Shek, L.P.-C., Vasoo, S., 2024. Climate change and its impact on infectious diseases in Asia. *Singapore Med. J.* 65, 211–219. <https://doi.org/10.4103/singaporemedj.SMJ-2023-180>

REMERCIEMENTS

Je tiens avant tout à remercier chaleureusement Audrey ARNAL, ma maître de stage, pour tout ce qu'elle m'a apporté lors de cette expérience. De la construction du projet à la réalisation de chacune de ses étapes, elle a été présente pour m'accompagner et m'apporter son aide précieuse. Merci également pour la découverte du Mexique, pays magnifique et méconnu, qu'elle a réussi à me faire apprécier au travers de nos nombreuses sorties. ¡Gracias Audrey!

Un grand merci à Benjamin ROCHE, également mon maître de stage, de m'avoir permis de réaliser ce premier pas dans le monde de la recherche. Ce projet m'a apporté énormément d'un point de vue personnel et professionnel.

Un immense merci à Céline ARNATHAU également. C'est grâce à elle que le travail de laboratoire s'est aussi bien déroulé. Merci d'avoir pris de temps de me former et de me montrer tous les protocoles de laboratoire. J'espère que la thèse se poursuivra sans encombre et que vous finirez par trouver des virus !

Tous mes remerciements aux membres du laboratoire ELDORADO à Mérida qui ont apporté leur aide pour le travail de terrain : Ana Laura, Gerardo, Fernanda, Laura, Mariana... Merci infiniment pour l'aide fournie lors des sessions de capture, qui se sont toujours très bien déroulées et dans la bonne humeur !

Merci également à tous les autres membres d'ELDORADO que j'ai pu côtoyer, pour tous les moments passés ensemble : Elizabeth, Julia, Omar, Maria José, Alhelí, Alejandra et tous les autres. Que ce soit au laboratoire ou en dehors, j'ai passé d'excellents moments avec chacun d'entre vous. Merci pour votre accueil chaleureux et bienveillant !

Et enfin de grands remerciements à Rosa Elena et Montserrat, qui ont toutes les deux été d'une aide cruciale pour la réalisation des manipulations de laboratoire à Mexico et qui étaient toujours disponibles et à l'écoute de nos sollicitations. Merci beaucoup !