

DONNÉES RÉCENTES SUR LES HANTAVIRUS ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

RECENT DATA ON HANTAVIRUSES AND PERSPECTIVES FOR RESEARCH

Par Noël TORDO⁽¹⁾, Guillaume CASTEL⁽²⁾, Claudia FILIPPONE⁽³⁾, Philippe MARIANNEAU⁽⁴⁾
(Communication présentée le 3 octobre 2013)

RÉSUMÉ

Les virus du genre *Hantavirus* sont les seuls représentants de la famille des *Bunyaviridae* qui ne sont pas transmis par des vecteurs arthropodes mais par des petits mammifères. Les hantavirus transmis par les rongeurs (Ordre *Rodentia*) ont été les premiers découverts en raison de leur pouvoir pathogène chez l'homme. Les premières études phylogénétiques ont suggéré une coévolution entre chaque hantavirus et son espèce de rongeur réservoir. Toutefois, l'exploration d'autres réservoirs animaux a montré que des hantavirus circulent aussi chez les insectivores (Ordre *Soricomorpha*) et les chauves-souris (Ordre *Chiroptera*), sans qu'aucune transmission pathogène à l'homme n'ait pu être mise en évidence jusqu'à aujourd'hui. Des observations naturelles de cocirculation d'un même hantavirus au sein de plusieurs espèces de rongeurs sympatriques, ainsi que de nouvelles données phylogénétiques qui soulignent des changements d'hôte (*host-switching*) entre hantavirus très proches, remettent actuellement en cause la cospéciation stricte. De même, l'observation plus fine de cas cliniques suggère de modérer le dogme d'une maladie distincte chez l'homme, les hantavirus de l'Ancien Monde (Europe-Asie) provoquant une fièvre hémorragique à syndrome rénal (FHSR) et ceux du Nouveau Monde (Amériques) conduisant à une hantavirose à syndrome cardio-pulmonaire (HSCP). Ces points sont discutés car ils ouvrent d'importantes perspectives en matière de recherche transdisciplinaire, depuis l'immunologie comparée chez les mammifères jusqu'à la modélisation de la dynamique des réservoirs dans leur milieu naturel, en passant par la sociologie des populations à risque. Les données récentes sur la circulation et le pouvoir pathogène des hantavirus en Europe et dans le monde sont aussi présentées, ainsi que les nouveaux outils d'investigation sérologique et génétique permettant la découverte *a priori* de nouveaux virus « dormants » dans des réservoirs et l'évaluation de leur potentiel d'émergence chez l'homme.

Mots-clés : Hantavirus, *Rodentia*, *Soricomorpha*, *Chiroptera*, rongeurs, soricomorphes, chauves-souris, virus *Puumala*, virus *Dobrava*, virus *Tula*, virus *Seoul*, Fièvre Hémorragique à Syndrome Rénal (FHSR), Hantavirose à Syndrome Cardio Pulmonaire (HSCP), puces de reséquençage.

(1) Institut Pasteur, Unité Stratégies Antivirales, Centre Collaborateur de l'OMS de Référence et de Recherche pour les Arbovirus et les Fièvres Hémorragiques Virales, 25 rue du Docteur Roux, F-75724 Paris.

(2) Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Biologie pour la Gestion des Populations (UMR1062) Campus International de Baillarguet - CS 30016, Montferrier-sur-Lez, F-34988.

(3) Institut Pasteur, Unité Epidémiologie et Physiopathologie des Virus Oncogènes, 25 rue du Docteur Roux, F-75724 Paris.

(4) Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail, Laboratoire de Lyon, Unité de Virologie, 31 Avenue Tony Garnier, F-69007-Lyon.

SUMMARY

The members of the genus *Hantavirus* are the only representatives of the family *Bunyaviridae* not transmitted by arthropod vectors but by small mammals. *Hantaviruses* transmitted by rodents (Order *Rodentia*) have been discovered at first because of their pathogenicity for humans. The first phylogenetic studies suggested a co-evolution between each hantavirus and its rodent reservoir species. However, further exploration of more animal reservoirs has evidenced that hantaviruses also circulate among insectivores (Order *Soricomorpha*) and bats (Order *Chiroptera*), without associated human pathology or even transmission demonstrated up to now. Documented co-circulation of the same hantavirus among sympatric rodent species and new phylogenetic data outlining host-switching events between closely related hantaviruses are currently weakening the concept of strict co-speciation. In addition, the closer analysis of clinical cases invites to moderate the dogma of a clearly distinct pathology in humans between Old World (Europe-Asia) hantaviruses that would provoke Haemorrhagic Fevers with Renal Syndrome (HFRS) and New World (Americas) hantaviruses that would result in a Cardio-Pulmonary Syndrome (HCPS). These topics are discussed because they open interesting perspectives for trans-disciplinary research, from compared immunology between mammals up to modelling of reservoir dynamics in natural environment and sociology of human populations at risk. The most recent data concerning the circulation and pathogenicity of hantaviruses in Europe and in the world are also presented as well as the new technologies for the serological and genetic investigations to discover without a priori new viruses « sleeping » in animal reservoirs and to evaluate their potential for future emergence(s) in man.

Key words : *Hantavirus*, *Rodentia*, *Soricomorpha*, *Chiroptera*, *rodents*, *soricomorphs*, *bats*, *virus Puumala*, *virus Dobrava*, *virus Tula*, *virus Seoul*, *Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS)*, *Hantavirus with Cardio-Pulmonary Syndrome (HSCP)*, *resequencing microarray*.

INTRODUCTION

Les virus classés dans le genre *Hantavirus* sont les seuls représentants de la famille des *Bunyaviridae* qui ne sont pas transmis par des vecteurs arthropodes mais par des petits mammifères, rongeurs, insectivores et chauves-souris. Il s'agit de petits virus sphériques enveloppés de 80 à 120 nm de diamètre, dont le génome comprend trois segments d'ARN codant la nucléocapside (segment S), les glycoprotéines d'enveloppe (segment M) et la polymérase (segment L). Dans le cytoplasme de la cellule, l'ARN génomique est toujours associé à la nucléoprotéine N sous forme d'une ribonucléocapside. Cette association intime ARN-N n'est pas favorable aux événements de recombinaison et les hantavirus évoluent plutôt par mutation ponctuelle, par courte insertion/délétion, ainsi que par réassortiment entre fragments génomiques.

Alors qu'une série de communications récentes à l'Académie Vétérinaire de France (21 février 2013) a permis de faire le point sur la situation des hantavirus et hantaviroses en France (Sauvage, 2013 ; Reynes, 2013 ; Rohfritsch *et al.* 2013), la présente revue se limitera à rappeler les grandes lignes, mais focalisera son propos sur les évolutions récentes en France, en Europe et dans le monde, qui invitent à une plus grande vigilance dans la surveillance des réservoirs animaux par des techniques de pointe.

HISTORIQUE DE LA DÉCOUVERTE DES HANTAVIRUS: DU VIRUS HANTAAAN AU GENRE HANTAVIRUS

Les hantavirus tirent leur nom de la rivière Hantaan, séparant la Corée du Nord et la Corée du Sud, où les premiers cas d'une fièvre hémorragique à syndrome rénal (FHSR), parfois létale, ont été diagnostiqués chez des soldats américains durant la guerre de Corée (1951-54). Il a fallu attendre 20 ans pour que l'agent responsable, le virus *Hantaan*, soit isolé d'un rongeur selvatique (*Apodemus agrarius*). Le virus *Hantaan* continue de causer chaque année plusieurs milliers de cas de FHSR en Eurasie. Consécutivement, le virus *Seoul* a été découvert suite à des infections plus modérées d'animaliers manipulant des rats de laboratoire (*Rattus spp*), peu avant que de nouveaux hantavirus soient trouvés en Europe tels les virus *Puumala*, *Dobrava* et *Tula* (pour revue Jonsson *et al.* 2010). La mise en évidence du virus *Puumala* et de son vecteur, le campagnol roussâtre (*Myodes glareolus*), a permis en particulier d'établir l'étiologie d'une forme modérée de FHSR, ou « *nephropathia epidemica* », reconnue en Europe depuis les années 1930 (Clement, 2003).

Pendant longtemps, l'existence d'hantavirus sur le continent Américain a été limitée à l'isolement anecdotique du virus *Prospect Hill* chez *Microtus pennsylvanicus* sans cas humain associé. Jusqu'à l'émergence aux USA d'un hantavirus responsable d'un nouveau syndrome cardio-pulmonaire (HSCP) à forte létalité (50%) chez des indiens Navajo à la frontière des états du Colorado, de l'Utah, de l'Arizona et du Nouveau-Mexique.

Cette émergence inattendue a d'abord été l'occasion d'une sémantique diplomatique afin d'éviter de stigmatiser les populations et les lieux d'apparition, ce qui a valu au virus d'être baptisé de noms successifs pour finir par la dénomination très neutre de virus *Sin Nombre* ! De manière plus constructive, cette émergence a été à l'origine d'un nouvel attrait pour la recherche des hantavirus sur le continent américain et de leur réservoir rongeur. Depuis lors, de nombreux autres virus responsables d'HSCP ont été isolés et/ou détectés, notamment en Amérique du Sud où des cas humains sont régulièrement signalés (pour revue Macneil *et al.* 2011).

L'Afrique a dû attendre encore plus longtemps que les Amériques pour devenir un centre d'intérêt pour l'investigation d'hantavirus. Il faut reconnaître que les découvertes se font plus fréquemment lors de recherches d'agents étiologiques à l'origine de problèmes de santé publique et que, de ce point de vue, le continent africain est encore trop fréquemment négligé. En revanche, le développement d'outils moléculaires et sérologiques sophistiqués permettant d'explorer à haut débit et à large spectre la complexité microbiologique, au sein des réservoirs animaux, a trouvé dans la biodiversité africaine un terrain de jeu idéal pour évaluer son potentiel. Dès 2006, un nouvel hantavirus, le virus *Sangassou* a été détecté, puis isolé chez le rongeur *Hylomyscus simus* en Guinée (Klempa *et al.* 2006, Klempa *et al.* 2012), précédant plusieurs autres comme le virus *Tigray* chez la souris *S. albipes* en Éthiopie (Meheretu *et al.* 2012). Le continent africain a également joué un rôle important dans la mise en évidence de nouveaux réservoirs d'hantavirus, autres que les rongeurs. Alors que le virus *Thottapalayam* isolé chez une musaraigne insectivore (*Suncus murinus*) du sud de l'Inde dès 1964 (Carey *et al.* 1971) est resté non classé pendant des décennies, le virus *Tanganya*, isolé chez les musaraignes *Crocidura theresae* capturées en Guinée, a inauguré l'explosion de la découverte des nouveaux hantavirus chez les soricomorphes (Klempa *et al.* 2007). D'autres hantavirus génétiquement distincts ont été ensuite détectés en Afrique de l'Ouest, tels le virus *Azagny* chez la musaraigne *Crocidura obscurior*, en Côte d'Ivoire (Kang *et al.* 2011a) ou le virus *Bow* chez la musaraigne *Crocidura douceti*, en Guinée (Gu *et al.* 2013a). Enfin, c'est en Afrique qu'on a découvert récemment les deux premiers hantavirus de chauves-souris, le virus *Mouyassuye* (*Neoromicia nanus*) en Côte d'Ivoire (Sumibcay *et al.* 2012) et le virus *Magboi* (*Nycteris hispida*) en Sierra Leone (Weiss *et al.* 2012). Depuis lors, grâce à l'amélioration permanente des outils de détection, de nombreux hantavirus hébergés chez les soricomorphes et les chauves-souris ont été détectés partout dans le monde (Guo *et al.* 2013 ; Arai *et al.* 2013) (figure 1).

TRANSMISSION ET PATHOGENÈSE

D'une façon générale, les hantavirus sont transmis à l'homme par les rongeurs qui constituent un excellent réservoir puisqu'ils s'infectent probablement par contact avec leurs congénères dès leur jeune âge. L'infection du rongeur est chronique,

mais la transmission verticale du virus n'est cependant pas démontrée. Bien qu'il n'y ait pas de signes cliniques apparents, des études récentes approfondies semblent déceler des effets plus subtils sur l'agressivité, la perte de poids ou la longévité (Bagamian *et al.* 2012). Chez les rongeurs retrouvés infectés dans la nature, on détecte la présence du virus dans de nombreux tissus dont les poumons, le foie, la rate et les reins. C'est par les sécrétions naturelles des rongeurs (salives, fèces, urines, ...) dans le milieu ambiant que l'homme se contamine, soit par aérosols (poussières souillées), soit par contact direct (figure 2).

Chez l'homme, la gravité de la maladie dépend beaucoup du virus considéré. Le virus *Puumala* (ou virus de la néphropathie épidémique) qui circule largement en Europe de l'Est et du Nord jusqu'au Nord-est de la France, peut provoquer une insuffisance rénale aiguë fébrile. Après une incubation d'une semaine à un mois et demi, les symptômes les plus fréquemment observés sont la fièvre, des douleurs abdominales, un dysfonctionnement rénal

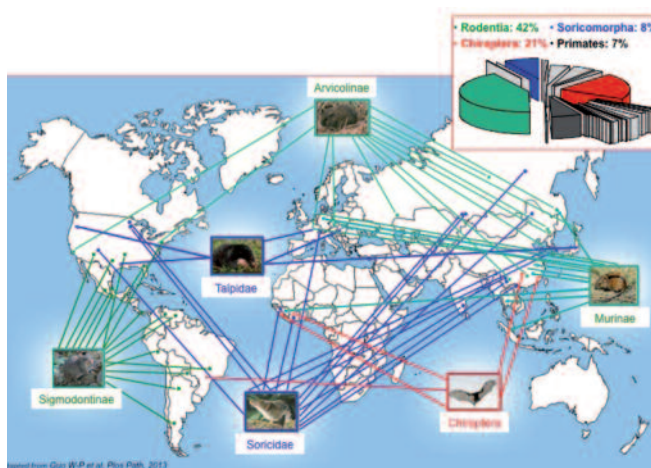


Figure 1 : Diversité des hantavirus et de leurs réservoirs. Les hantavirus sont adaptés à des espèces de mammifères appartenant aux ordres Rodentia (en vert : genres Murinae, Arvicolinae, Sigmodontinae) Soricomorpha (en bleu : familles Soricidae, Talpidae) et Chiroptera (en rouge). Ces trois ordres représentent à eux seuls plus de 60% des espèces de mammifères connues.

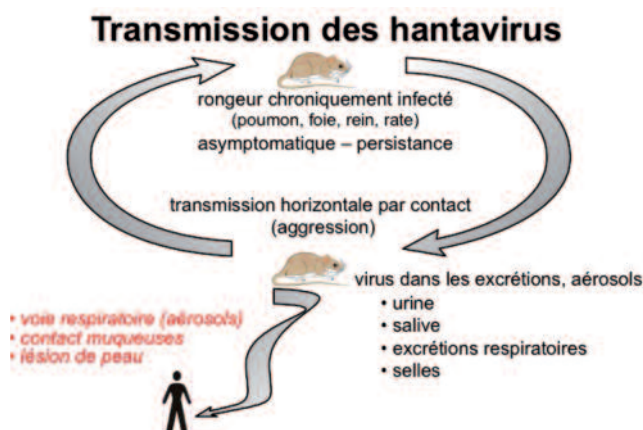


Figure 2 : Transmission des hantavirus entre rongeurs et du rongeur à l'homme.

et parfois une myopie. Les anomalies biologiques caractéristiques sont une thrombopénie périphérique (98% des cas), une protéinurie (70% des cas), alors que l'insuffisance rénale aiguë ne touche que la moitié des cas et seulement 10% doivent recourir à une hémodialyse. Les manifestations hémorragiques sont rares en dehors d'une hématurie et les cas mortels demeurent tout à fait exceptionnels. Après traitement symptomatique, la convalescence s'étale de trois semaines à trois mois avec disparition des signes clinico-biologiques et les séquelles (hypertension artérielle, protéinurie résiduelle, insuffisance rénale chronique) sont très rares. En revanche, les infections par le virus *Hantaan* sont mortelles dans environ 5% des cas et celles par le virus *Dobrava* dans 10% des cas. Les hantavirus du Nouveau Monde peuvent être associés à des taux de mortalité encore plus élevés qui atteignent 50% dans le cas du virus *Sin Nombre* ou du virus *Andes*. Ces deux derniers sont d'ailleurs classés dans le groupe des agents viraux hautement pathogènes de classe 4 et doivent être manipulés dans des laboratoires de niveau de sécurité équivalent. Le virus *Sin Nombre* semble avoir été responsable de l'épisode d'HSCP en août 2012 dans le parc national Yosemite aux USA. Le virus *Andes* est le seul hantavirus connu ayant montré un potentiel de transmissibilité inter-humaine. On sait encore peu de choses sur le pouvoir pathogène potentiel des nouveaux hantavirus récemment détectés en Afrique, mais on ne peut exclure qu'ils soient à l'origine de problèmes de santé publique (Klempa *et al.* 2010 ; Klempa *et al.* 2013a). Ce point doit être éclairci par des enquêtes séro-épidémiologiques utilisant des outils spécifiques.

par le virus *Hantaan* et des formes rénales sont associées aux infections par les virus *Bayou* et *Black Creek canal* qui sont classés dans le sérotype *Sin Nombre*. Malgré cette diversité des formes cliniques, toutes les infections par hantavirus ont en commun la propriété de provoquer une atteinte de l'endothélium capillaire donnant lieu à des fuites plasmatiques à l'origine d'hémorragies et de syndrome de choc dans les cas de FHSR ou d'œdèmes et de suffocations dans les cas de HSCP (Krautkrämer *et al.* 2012).

Un autre dogme tenace a été celui de la coévolution entre chaque hantavirus et son espèce de rongeur réservoir sur la base de la cohérence observée entre les arbres phylogénétiques respectifs. Ce dogme est lui aussi remis en question suite à plusieurs observations de changements d'hôte (*host-switching*) dans la nature, ce qui suppose un franchissement efficace de la barrière d'espèce (Ramsden *et al.* 2009 ; Kang *et al.* 2011b). D'autre part, il a été montré que certains hantavirus, tels que les virus *Dobrava-Belgrade* et *Tula*, peuvent co-circuler dans plusieurs espèces de rongeurs sympatriques. Enfin, le renforcement de la surveillance des réservoirs animaux et notamment l'exploration de leur microbiome en tant que source potentielle d'émergences futures a permis d'identifier les soricomorphes et les chauves-souris comme porteurs d'hantavirus (Guo *et al.* 2013). Dans l'ordre *Soricomorpha*, il s'agit en particulier des musaraignes (famille *Soricidae*) et des taupes (famille *Talpidae*). Ces « nouveaux » hantavirus sont présents partout dans le monde (*figure 3*). En Europe, il s'agit des virus *Laihia*, *Asikkala*, *Seewis*, *Boginia* et *Nova* qui sont retrouvés respectivement chez *Neomys fodiens*, *Sorex minutus*, *Sorex araneus*, *Neomys fodiens* et *Talpa europea* (pour revue Klempa *et al.* 2013b ; Gu *et al.* 2013b ; Gu *et al.* 2013c). Il est curieux de noter que ces nouveaux membres du genre *Hantavirus* apparais-

LES DOGMES À L'ÉPREUVE DU RÉEL

Pendant longtemps, les hantavirus ont été l'objet de positions dogmatiques qui sont remises en cause par les recherches les plus récentes. Ainsi chez l'homme, les syndromes rénaux semblaient très spécifiques des infections par les hantavirus de l'Ancien Monde (Europe, Asie) d'où l'appellation de « fièvres hémorragiques à syndrome rénal » (FHSR). En revanche durant les infections par les hantavirus du Nouveau Monde (Amérique), les symptômes cardio-pulmonaires étaient plus fréquemment rencontrés, d'où le terme de « hantaviroses à syndrome cardio-pulmonaire » (HSCP). Même si cette distinction entre FHSR et HSCP reste globalement vraie, elle semble désormais dépassée puisque des manifestations pulmonaires ont été décrites chez les malades infectés

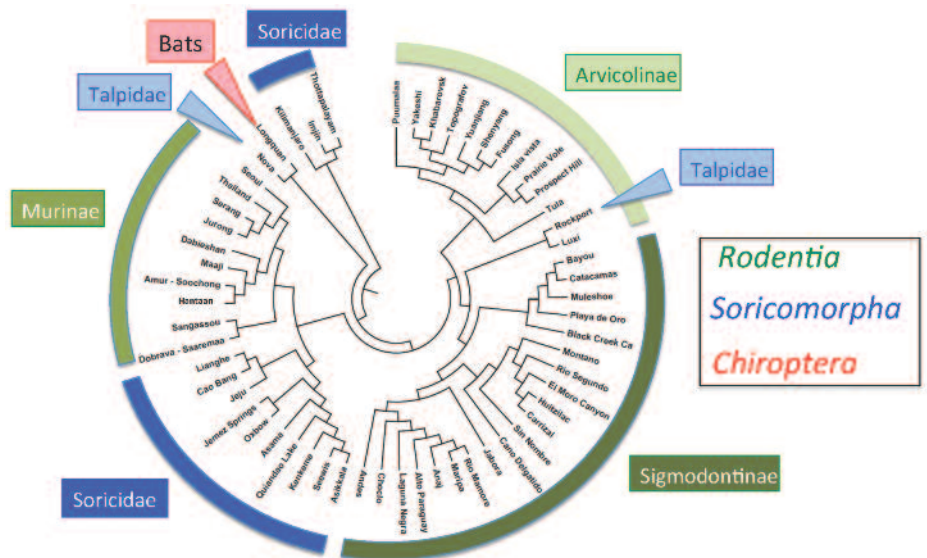


Figure 3 : Arbre Phylogénétique d'une sélection de hantavirus.
L'arbre a été construit à partir des séquences de segments S (codant la nucléoprotéine) disponibles dans les banques de données. La méthode de maximum de vraisemblance (« Maximum Likelihood ») a été utilisée avec un modèle de substitution GTR+G+I grâce au logiciel Mega v5.1. L'arbre est présenté sous forme de cladogramme circulaire. Les couleurs soulignent les réservoirs d'origine des hantavirus, comparés selon la logique des couleurs de la figure 1 : ordres Rodentia (en vert : genres Murinae, Arvicolinae, Sigmodontinae) Soricomorpha (en bleu : familles Soricidae, Talpidae) et Chiroptera (en rouge).

sent plus variables et plus ancestraux que les hantavirus de rongeurs. N'ayant pas de pouvoir pathogène encore démontré chez l'homme, il a simplement fallu attendre qu'une surveillance sans *a priori* vienne révéler leur existence.

DONNÉES RÉCENTES SUR LA CIRCULATION DES HANTAVIRUS CHEZ LES RONGEURS EN EUROPE

Le virus Puumala

En France, l'infection par le virus *Puumala* est endémique dans tout le quart Nord-est avec la circulation de variants géographiques distincts parfois proches de ceux circulant dans les pays européens frontaliers. On constate des cycles épidémiques environ tous les trois ans probablement dus aux pics de croissance du campagnol, bien qu'à l'échelle du site de capture, il n'y ait pas de corrélation évidente entre la densité des campagnols et la prévalence du virus *Puumala*. D'autre part, si la circulation du virus *Puumala* est confirmée dans la zone endémique, on peut rencontrer des niveaux de prévalence équivalents dans la zone péri-endémique, y compris dans des régions où aucun cas humain n'a jamais été rapporté (pour plus de détails, se reporter aux revues récentes du Bulletin de l'Académie Vétérinaire ; Sauvage, 2013 ; Reynes, 2013 ; Rohfritsch *et al.* 2013).

Le virus Dobrava-Belgrade

Les virus de l'espèce *Dobrava-Belgrade* doivent leur nom à leur identification initiale dans les Balkans, mais ils circulent en réalité dans une grande partie de l'Europe incluant l'Estonie, la Russie, la Hongrie, la République Tchèque et l'Allemagne. Ce complexe regroupe des virus différents responsables de FHSR modérées à sévères et leur classification taxonomique continue de faire l'objet d'ajustements. Le virus *Dobrava* initial a été isolé il y a plus de 25 ans à partir d'un rongeur *Apodemus flavicollis* capturé en Slovénie. Au même moment, le virus *Belgrade* a été isolé à partir d'un patient atteint de FHSR sévère. Des études ultérieures ont démontré que les deux isolats étaient identiques, ce qui explique que l'*International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) ait alors proposé le nom de *Dobrava-Belgrade* pour cette espèce d'hantavirus. Des virus de la même espèce ont consécutivement été détectés chez des patients (Grèce, Albanie, Bosnie-Herzégovine, Russie, Allemagne, Estonie, Slovaquie), ainsi que chez des rongeurs (Iles estoniennes de Saaremaa et Vormsi, Kurkino en Russie, Slovaquie, Allemagne, Danemark, Croatie, Slovénie, Hongrie...). Des analyses phylogénétiques récentes suggèrent de distinguer quatre génotypes au sein de l'espèce *Dobrava-Belgrade* : *Dobrava*, *Kurkino*, *Sochi* et *Saaremaa*, cette dernière étant actuellement encore considérée par l'ICTV comme une espèce virale indépendante. Les virus de l'espèce *Dobrava-Belgrade* sont transmis par au moins trois espèces de rongeurs du genre *Apodemus*. Les hôtes principaux des génotypes *Dobrava* et *Sochi* sont respectivement les espèces *A. flavicollis* et *A. ponticus* alors que les génotypes *Kurkino* (Russie) et *Saaremaa* (Estonie)

sont portés par l'espèce *A. agrarius* (pour revue Klempa 2013c). Il est intéressant de noter que ces deux derniers génotypes sont généralement associés à des formes moins sévères de FHSR.

Le virus Seoul

Le virus *Seoul* est transmis par les rats (*Rattus spp.*). Il a été initialement décrit en Asie, mais compte tenu de la répartition mondiale de son réservoir dont la dispersion a été favorisée par sa proximité de l'homme, il n'est pas étonnant de constater que les approches moléculaires aient confirmé sa présence sur tous les continents. En Europe, la circulation du virus *Seoul* chez des rats a été mise en évidence par sérologie dès 1995 au Royaume-Uni (Webster & Macdonald, 1995), puis par détection moléculaire en 2004 en France et en 2009 en Belgique (Heyman *et al.* 2004 ; Heyman *et al.* 2009). Le premier cas humain européen documenté a été rapporté au Royaume-Uni en janvier 2012. Des piégeages de rats sauvages *Rattus norvegicus* autour du domicile du patient ont permis de mettre en évidence, puis d'isoler un virus *Seoul* appelé souche « Humber » du nom de la localité (Jameson *et al.* 2013a). En janvier 2013, un second épisode d'infection humaine par le virus *Seoul* a été rapporté au Pays de Galles. Un diagnostic moléculaire chez les deux rats domestiques que le patient possédait a confirmé l'infection par un virus *Seoul* nommé « Cherwell », une souche similaire, sans être identique, à la souche Humber isolée à partir de rats sauvages. Des investigations supplémentaires ont permis de montrer qu'un tiers (n=7/21) des rats de l'élevage d'où provenait les rats domestiques était infecté par le virus *Seoul*, souche « Cherwell » (Jameson *et al.* 2013b). Cette donnée souligne bien le risque réel de transmission du virus *Seoul* à l'homme à partir d'un animal de compagnie fréquemment utilisé. En octobre 2012, l'infection d'une femme enceinte a également été rapportée en France. Peu de données épidémiologiques sont disponibles sur cet épisode (mode de transmission, lieu de l'infection...) (Macé *et al.* 2013). Des investigations indépendantes sérologiques et moléculaires menées dans la région de Lyon sur des rats sauvages (*Rattus norvegicus*) ont permis de confirmer la circulation du virus *Seoul*, comme précédemment rapporté (Heyman *et al.* 2004). Le virus n'a pas encore été isolé mais la séquence complète est en cours de publication. Enfin, une publication récente rapporte pour la première fois l'infection de rats domestiques par le virus *Seoul* en Suède (Lundkvist *et al.* 2013).

Le virus Tula

Cet hantavirus initialement isolé chez le rongeur *Microtus arvalis* soulève encore de nombreuses questions. D'une part, il est très largement répandu en Europe Centrale. D'autre part, son inféodation stricte à *Microtus arvalis* est discutable puisqu'il a été depuis lors détecté dans de nombreuses autres espèces du genre *Microtus* : *M. levis*, *M. agrestis*, *M. subterraneus*, et *M. gregalis*, (Schlegel *et al.* 2012). Enfin, ses capacités à infecter l'homme et à y exprimer un pouvoir pathogène restent sujettes à débat. Des enquêtes séro-épidémiologiques chez des forestiers d'une région allemande où circule le virus *Tula* ont montré une forte séroprévalence, ce qui suggère une transmission plus importante qu'initialement décrite (Mertens *et al.* 2011).

LES NOUVEAUX OUTILS DE DÉTECTION SÉROLOGIQUE ET MOLÉCULAIRE DES HANTAVIRUS

La découverte des hantavirus s'est essentiellement faite en raison de leur pouvoir pathogène chez l'homme. Toutefois, la puissance des nouveaux outils multiplex de diagnostic sérologique ou génétique, ainsi que l'émergence du concept « *one health* », ont amené un regain d'intérêt pour la surveillance des réservoirs et la découverte de nouveaux virus « dormants », présentant un potentiel d'émergence chez l'homme.

Méthodes sérologiques

Il existe de nombreuses trousse commerciales et des réactifs de laboratoire pour la détection sérologique des infections à hantavirus (Lederer *et al.* 2013). Ils permettent de détecter les IgM ou IgG spécifiques par la méthode immunoenzymatique ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ou par immunodétection et utilisent soit des antigènes recombinants, soit des extraits de cellules infectées. Ils ciblent surtout les antigènes internes (nucléoprotéine) des hantavirus transmis par les rongeurs, seuls pathogènes humains reconnus aujourd'hui. Bien qu'il existe une réactivité croisée entre les différentes espèces de hantavirus, ces réactifs ne semblent pas très adaptés pour la détection des hantavirus antigéniquement éloignés comme ceux des soricomorphes ou des chauves-souris. Dans leur cas, le développement d'outils spécifiques de sérologie est une nécessité.

Il est intéressant de noter que chez l'homme, la détection de traces d'ARN d'hantavirus est possible dans des sérums précoces (IgM+) mais devient difficile dans les sérums tardifs (IgG+). En revanche, chez les rongeurs, la présence d'un sérum IgG+ est une indication favorable à la détection de l'ARN de l'hantavirus infectant. La raison de cette différence demeure obscure (IgG de rongeur non neutralisantes, différence entre infection aiguë et infection chronique...). Cependant, cette observation permet de commencer par cribler les rongeurs par les méthodes sérologiques et de ne tenter la détection d'ARN viral, voire l'isolement du virus que sur les animaux sero-positifs, une approche plutôt économique.

Méthodes génétiques

Si des méthodes de détection spécifique par RT-PCR (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*), éventuellement « nichée », existent pour différents hantavirus, la recherche de nouvelles espèces a conduit à développer des amorces « génériques » dégénérées permettant d'ouvrir le spectre des outils de détection. Un très grand nombre d'amorces a ainsi été publié recherchant spécifiquement les hantavirus transmis par les rongeurs des différents genres *Sigmodontinae*, *Arvicolinae*, ou *Murinae*. En ciblant des gènes plus conservés comme celui codant la polymérase, il est même possible d'élargir encore le spectre de détection à l'ensemble des hantavirus de rongeurs (ordre *Rodentia*) ou de soricomorphes (ordre *Soricomorpha*). Au-delà, les développements récents du séquençage à haut débit permettent d'espérer une image complète du microbiome présent dans un échantillon humain ou un réservoir

animal. À cette échelle, la difficulté se déplace au niveau de l'analyse bioinformatique pour l'identification des séquences d'intérêt. La complexité de l'analyse et le coût font que ces méthodes ne peuvent pas encore être utilisées en routine à l'échelle de l'échantillon. À mi-chemin de cette complexité, les puces à ADN peuvent représenter des alternatives intéressantes.

Le principe général des puces à ADN repose sur l'hybridation entre l'ADN provenant d'un échantillon biologique et un ensemble de sondes ADN spécifiques immobilisées sur un support solide. Dans le cas de virus à ARN (comme les hantavirus), il est nécessaire d'effectuer préalablement une transcription inverse des ARNs purifiés à partir du prélèvement biologique en ADN complémentaire (ADNc). Après l'amplification de ces ADNc, une hybridation spécifique permet de détecter et d'identifier la séquence recherchée parmi un mélange de séquences provenant d'autres microorganismes ou de l'hôte. Il existe plusieurs types de puces à ADN ciblant en parallèle d'une dizaine à plusieurs centaines d'agents pathogènes. Les plus classiques utilisent des sondes spécifiques et identifient l'agent présent dans l'échantillon sur la base de son profil d'hybridation. D'autres sont basées sur le principe de séquençage par hybridation et sont appelées pour cela « puces de reséquençage ». C'est le cas de la plateforme PathogenID développée à l'Institut Pasteur en collaboration avec la Société Affymetrix (**figure 4**). Son principe repose sur l'utilisation de courtes sondes spécifiques de 25 nucléotides présentes à haute densité (à plus d'un million) sur le support solide. Chaque séquence de référence d'un pathogène potentiel est criblée de sondes spécifiques selon la logique suivante : la première sonde couvre la région 1-25 de la séquence de référence, la seconde sonde la région 2-26 et ainsi de suite par pas de un, jusqu'au balayage complet de la séquence de référence (environ 400 nucléotides). Afin de détecter les éventuelles mutations par rapport à cette séquence, chaque sonde est synthétisée sous quatre versions, avec sa base centrale (position 13) déclinée selon les quatre nucléotides possibles : A, T, C et G. La sonde, parmi les quatre, qui s'hybride le plus intensément à l'échantillon permet de déterminer l'identité de la base en position centrale. La succession des lectures permet ainsi non seulement de détecter, mais aussi de déduire la séquence exacte de l'échantillon, ce qui assure une résolution au nucléotide près. Même si une partie seulement des 400 nucléotides testés peut être exactement déterminée, la séquence partielle obtenue est soumise à une analyse bio-informatique ultérieure (logiciels Blast) pour approfondir l'identification par comparaison aux banques de données. Ainsi, la puce PathogenIDv.3 offre non seulement la possibilité de détecter plus de 600 virus humains, zoonotiques ou animaux, mais aussi d'en découvrir de nouveaux ou d'identifier plus finement des variants portant des mutations ponctuelles ou SNPs (pour *Single nucleotide polymorphisms*). Son évaluation antérieure sur un bunyavirus émergent distinct des hantavirus (le virus de la Fièvre Hémorragique de Crimée-Congo, un nairovirus transmis par les tiques) a démontré la possibilité de détecter des espèces virales ayant jusqu'à 15-20% de divergence par rapport à la séquence de référence (Filippone *et al.* 2013).

La puce PathogenIDv.3 porte environ 50 séquences de référence

- Filippone, C., Marianneau, P., Murri, S., Mollard, N., Zupanc, T.A., Chinikar, S., Desprès, P., Caro, V., Gessain, A., Berthet, N., Tordo N. 2012. Molecular diagnostic and genetic characterization of highly pathogenic viruses: application during Crimean Congo hemorrhagic fever virus outbreaks in Eastern Europe and Middle-East. *Clin Microbiol Infect.* 19:E118-128, doi: 10.1111/1469-0691.12075.
- Gu, S.H., Nicolas, V., Lalis, A., Sathirapongsasuti, N., Yanagihara, R. 2013a. Complete genome sequence and molecular phylogeny of a newfound hantavirus harbored by the Doucet's musk shrew (*Crocidura douceti*) in Guinea. *Infect Genet Evol.* 20C:118-123.
- Gu, S.H., Markowski, J., Kang, H.J., Hejduk, J., Sikorska, B., Liberski, P.P., Yanagihara, R. 2013b. Boginia virus, a newfound hantavirus harbored by the Eurasian water shrew (*Neomys fodiens*) in Poland. *Virol J.* 10:160.
- Gu, S.H., Dormion, J., Hugot, J.P., Yanagihara, R. 2013c. High prevalence of Nova hantavirus infection in the European mole (*Talpa europaea*) in France. *Epidemiol Infect.* 18:1-5.
- 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.
- Heyman, P., Plyusnina, A., Berny, P., Cochez, C., Artois, M., Zizi, M., Pirnay, J.P., Plyusnin, A. 2004. Seoul hantavirus in Europe: first demonstration of the virus genome in wild *Rattus norvegicus* captured in France. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23:711-717
- Heyman, P., Baert, K., Plyusnina, A., Cochez, C., Lundkvist, A., Esbroeck, M.V., Goossens, E., Vandenvelde, C., Plyusnin, A., Stuyck, J. 2009. Serological and genetic evidence for the presence of Seoul hantavirus in *Rattus norvegicus* in Flanders, Belgium. *Scand J Infect Dis.* 41:51-56.
- Jameson, L.J., Logue, C.H., Atkinson, B., Baker, N., Galbraith, S., Carroll, M., Brooks, T., Hewson, R. 2013a. The continued emergence of hantaviruses: isolation of a Seoul virus implicated in human disease, United Kingdom, October 2012. *Euro Surveill.* 18 pii: 20344.
- Jameson, L.J., Taori, S.K., Atkinson, B., Levick, P., Featherstone, C.A., van der Burgt, G., McCarthy, N., Hart, J., Osborne, J.C., Walsh, A.L., et al. 2013b. Pet rats as a source of hantavirus in England and Wales, 2013. *Euro Surveill.* 18 pii: 20415.
- Jonsson, C.B., Figueiredo, L.T., Vapalahti, O. 2010. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin Microbiol Rev.* 23: 412-441.
- Kang, H.J., Kadjo, B., Dubey, S., Jacquet, F., Yanagihara, R. 2011a. Molecular evolution of Azagny virus, a newfound hantavirus harbored by the West African pygmy shrew (*Crocidura obscurior*) in Côte d'Ivoire. *Virol J.* 8:373.
- Kang, H.J., Bennett, S.N., Hope, A.G., Cook, J.A., Yanagihara, R. 2011b. Shared ancestry between a newfound mole-borne hantavirus and hantaviruses harbored by cricetid rodents. *J Virol.* 85:7496-7503.
- Klempa, B., Fichet-Calvet, E., Lecompte, E., Auste, B., Aniskin, V., Meisel, H., Denys, C., Koivogui, L., ter Meulen, J., Krüger, D.H. 2006. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerg Infect Dis.* 12:838-840.
- Klempa, B., Fichet-Calvet, E., Lecompte, E., Auste, B., Aniskin, V., Meisel, H., Barrière, P., Koivogui, L., ter Meulen, J., Krüger, D.H. 2007. Novel hantavirus sequences in Shrew, Guinea. *Emerg Infect Dis.* 13:520-522.
- Klempa, B., Koivogui, L., Sylla, O., Koulemou, K., Auste, B., Krüger, D.H., ter Meulen, J. 2010. Serological evidence of human hantavirus infections in Guinea, West Africa. *J Infect Dis.* 201:1031-1034.
- Klempa, B., Witkowski, P.T., Popugaeva, E., Auste, B., Koivogui, L., Fichet-Calvet, E., Strecker, T., Ter Meulen, J., Krüger, D.H. 2012. Sangassou virus, the first hantavirus isolate from Africa, displays genetic and functional properties distinct from those of other murinae-associated hantaviruses. *J Virol.* 86:3819-3827.
- Klempa, B., Koulemou, K., Auste, B., Emmerich, P., Thomé-Bolduan, C., Günther, S., Koivogui, L., Krüger, D.H., Fichet-Calvet, E. 2013a. Seroepidemiological study reveals regional co-occurrence of Lassa- and Hantavirus antibodies in Upper Guinea, West Africa. *Trop Med Int Health.* 18:366-371.
- Klempa, B., Radosa, L., Kruger, D.H. 2013b. The broad spectrum of hantaviruses and their hosts in Central Europe. *Acta Virol.* 57:130-137.
- Klempa, B., Avsic-Zupanc, T., Clement, J., Dzagurova, T.K., Henttonen, H., Heyman, P., Jakab, F., Kruger, D.H., Maes, P., Papa, A. et al. 2013c. Complex evolution and epidemiology of Dobrava-Belgrade hantavirus: definition of genotypes and their characteristics. *Arch. Virol.* 158:521-529.
- Krautkrämer, E., Zeier, M., Plyusnin, A. 2013 Hantavirus infection: an emerging infectious disease causing acute renal failure. *Kidney Int.* 83:23-27.
- Lederer, S., Lattwein, E., Hanke, M., Sonnenberg, K., Stoecker, W., Lundkvist, Å., Vaheri, A., Vapalahti, O., Chan, P.K., Feldmann et al. 2013. Indirect immunofluorescence assay for the simultaneous detection of antibodies against clinically important old and new world hantaviruses. *PLoS Negl Trop Dis.* 7:e2157.
- Lundkvist, A., Verner-Carlsson, J., Plyusnina, A., Forslund, L., Feinstein, R., Plyusnin, A. 2013. Pet rat harbouring Seoul hantavirus in Sweden, June 2013. *Euro Surveill.* 18 pii: 20521.
- Macé, G., Feyeux, C., Mollard, N., Chantegret, C., Audia, S., Rebibou, J.-M., Spagnolo, G., Bour J.-B., Denoyel G. A., Sagot, P., Reynes, J.M. 2013. Severe Seoul hantavirus infection in a pregnant woman, France, October 2012. *Euro Surveill.* 18 pii: 20464.
- Macneil, A., Nichol, S.T., Spiropoulou, C.F. 2011. Hantavirus pulmonary syndrome. *Virus Res.* 162:138-147.
- Mertens, M., Hofmann, J., Petraityte-Burkeikiene, R., Ziller, M., Sasnauskas, K., Friedrich, R., Niederstrasser, O., Krüger, D.H., Groschup, M.H., Petri, E. et al. 2011. Seroprevalence study in forestry workers of a non-endemic region in eastern Germany reveals infections by Tula and Dobrava-Belgrade hantaviruses. *Med. Microbiol. Immunol.* 200:263-268.
- Meheretu, Y., Leirs, H., Welegerima, K., Breno, M., Tomas, Z., Kidane, D., Girmay, K., de Bellocq, J.G. 2012. High diversity of RNA viruses in rodents, Ethiopia. *Emerg Infect Dis.* 18:2047-2050.
- Ramsden, C., Holmes, E.C., Charleston, M.A. 2009. Hantavirus evolution in relation to its rodent and insectivore hosts: no evidence for codivergence. *Mol Biol Evol.* 26:143-153.
- Reynes, J.M. 2013. Taxonomie des Hantavirus et situation des Hantaviruses en France. *Bull Acad vét France* 166: 155-162.
- Rohfritsch, A., Guivier, E., Galan, M., Chaval, Y., Cosson, J.F., Charbonnel, N. 2013. Apport de l'immunogénétique à la compréhension des interactions entre le campagnol roussâtre *Myodes glareolus* et l'hantavirus *Puumala*. *Bull Acad vét France* 166:171-184.
- Sauvage, F. 2013. Des souris et des hommes... et des virus. *Bull Acad vét France* 166: 163-170.
- Schlegel, M., Kindler, E., Essbauer, S.S., Wolf, R., Thiel, J., Groschup, M.H., Heckel, G., Oehme, R.M., Ulrich, R.G. 2012. Tula virus infections in the Eurasian water vole in Central Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12:503-513.
- Sumibcay, L., Kadjo, B., Gu, S.H., Kang, H.J., Lim, B.K., Cook, J.A., Song, J.W., Yanagihara, R. 2012. Divergent lineage of a novel hantavirus in the banana pipistrelle (*Neoromicia nanus*) in Côte d'Ivoire. *Virol J.* 26:34.
- Webster, J.P. & Macdonald, D. W. 1995. Parasites of wild brown rats (*Rattus norvegicus*) on UK farms, *Parasitology* 111:247-255.
- Weiss, S., Witkowski, P.T., Auste, B., Nowak, K., Weber, N., Fahr, J., Mombouli, J.V., Wolfe, N.D., Drexler, J.F., Drosten, C., Klempa, B., Leendertz, F.H., Kruger, D.H. 2012. Hantavirus in bat, Sierra Leone. *Emerg Infect Dis.* 18:159-161.