



Épidémiologie descriptive et analytique des orthohantavirus chez les rongeurs sauvages en France

Élodie Monchâtre-Leroy

► To cite this version:

Élodie Monchâtre-Leroy. Épidémiologie descriptive et analytique des orthohantavirus chez les rongeurs sauvages en France. Microbiologie et Parasitologie. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1255 . tel-02500595

HAL Id: tel-02500595

<https://theses.hal.science/tel-02500595>

Submitted on 6 Mar 2020

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

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

N°d'ordre NNT : xxx



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale ED341
Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation (E2M2)

Spécialité de doctorat :
Discipline : (Eventuellement)

Soutenue publiquement le 03/12/2019, par :
Elodie Monchâtre-Leroy

Epidémiologie descriptive et analytique des orthohantavirus chez les rongeurs sauvages en France

Devant le jury composé de :

Nom, prénom grade/qualité établissement/entreprise **Président.e (à préciser après la soutenance)**

Brouat, Carine, Chargée de recherche à l'IRD, **Rapporteure**
Le Poder, Sophie, Professeure des Ecoles nationales vétérinaires à l'ENVA, **Rapporteure**
Benoit, Etienne, Professeur des Ecoles nationales vétérinaires à Vétagrosup, **Examinateur**
Maucort-Boulch, Delphine, PH et Professeure des Universités à Lyon 1, **Examinatrice**
Hénaux, Viviane, Chargée de recherche à l'Anses, **Directrice de thèse**
Marianneau, Philippe, Chargé de recherche à l'Anses, **Co-directeur de thèse**

Table des matières

Table des matières	2
Remerciements	4
Liste des publications scientifiques internationales	5
Liste des publications scientifiques nationales.....	6
Tables des illustrations	7
Table des tableaux	8
INTRODUCTION	9
1) Les orthohantavirus	10
a. Classification et description.....	10
b. Variabilité génétique	11
c. Les réservoirs des orthohantavirus.....	11
d. Les orthohantavirus européens.....	12
2) Le virus Puumala.....	13
a. Biologie des campagnols roussâtres (<i>Myodes glareolus</i>).....	13
i. Aire de répartition / biotope	13
ii. Cycle de reproduction et variation saisonnière.....	14
iii. Variation interannuelle.....	15
b. Infection des campagnols roussâtres par PUUV.....	17
i. Modes de contamination et excrétion	17
ii. Réponse immunitaire, effets cliniques et autres effets	17
3) Importance zoonotique	18
a. Généralités et mode de contamination.....	18
b. Les infections humaines à PUUV	19
i. Tableau clinique.....	19
ii. Formes asymptomatiques	20
iii. Diagnostic	21
iv. Traitement et prévention	22
c. Facteurs de risque des hantaviroses	22
i. viraux	22
ii. Humains	23

iii. Environnement et réservoir.....	25
4) Epidémiologie des fièvres hémorragiques à syndrome rénal en France.....	27
a. Détection des cas de NE	27
b. Suivi temporel.....	28
c. Répartition géographique.....	31
5) Problématiques et axes de recherche	33
PARTIE EXPERIMENTALE	35
Chapitre 1 : contribution à l'épidémiologie descriptive des orthohantavirus des rongeurs en France, cas de l'Alsace, zone de faible endémie	36
Chapitre 2 : dix ans d'évolution génétique des variants du virus Puumala dans les forêts des Ardennes, France	66
Chapitre 3 : épidémiologie spatiale et temporelle des néphropathies épidémiques et de la séroprévalence au virus Puumala chez les rongeurs hôtes : identification des principaux facteurs de risque environnementaux en Europe par revue bibliographique	90
Chapitre 4 : facteurs de risques d'infection des populations de rongeurs de la région des Ardennes par le virus Puumala : analyse comparée de modèles basés sur l'incidence et la séroprévalence	125
DISCUSSION GENERALE	157
1) Evolution spatiale de l'épidémiologie.....	158
2) Evolution temporelle de l'épidémiologie	161
3) Conclusions et perspectives.....	165
Références bibliographiques.....	167
Annexe	175
Résumé.....	177
Abstract	179

Remerciements

Mes remerciements s'adressent à ceux qui m'ont aidé dans ce travail, et en premier lieu, Philippe Marianneau et Viviane Hénaux sans qui cette thèse n'aurait pas pu aboutir. Un grand merci aux équipes de virologie et d'épidémiologie de Lyon pour leur accueil et tout particulièrement à Séverine Murri sans qui ces travaux ne seraient pas ce qu'ils sont !

Mes sincères remerciements à Sophie Le Poder et Carine Brouat d'avoir accepté d'être rapporteur de ces travaux et d'évaluer leur pertinence scientifique. Un grand merci aussi aux examinateurs de mon jury ; Delphine Maucort-Boulch et Etienne Benoit.

Je voudrais remercier l'Anses pour m'avoir encouragée à réaliser ce travail dans le cadre de ma formation professionnelle. Je souhaiterais associer à ces remerciements toutes les personnes du laboratoire de la rage et de la faune sauvage avec qui je travaille depuis plus de 8 ans maintenant et qui pour certains, ont grandement permis la réalisation d'une partie de ces travaux par leur implication dans les captures des Ardennes et de Murbach ; Christophe Caillot, Jean-Michel Demerson, Léo Legras, Marie Moinet et évidemment Franck Boué qui m'a toujours soutenue.

Mes travaux ont bénéficié de collaborations fructueuses avec Laurent Crespín, Guillaume Castel, Jordi Serracobo, Marc Lopez Roig, Noël Tordo et Didier Calavas à qui j'adresse également mes remerciements.

Enfin, toutes mes pensées vont à ma famille. Mes parents toujours présents et qui m'accompagnent depuis toujours et à tout âge (le mien et le leur....)

Ma tribu sans qui rien ne serait possible. Mon Téo et mon Gabin qui ont accompagné mes travaux de modélisation de leur devoir de maths et que j'ai vu passer leurs examens avant ma soutenance. Et évidemment, Robin, relecteur attentif de ce manuscrit et surtout tant d'autres choses dans ma vie.

Liste des publications scientifiques internationales

* Portier J., Ryser-Degiorgis M.P., Hutchings M.R., Monchatre-Leroy E., Richomme C., Larrat S., van der Poel W.H.M., Dominguez M., Linden A., Santos P.T., Warns-Petit E., Chollet JY., Cavalerie L., Grandmontagne C., Boadella M., Bonbon E., Artois M. Multi-host disease management: the why and the how to include wildlife. *BMC Vet Res.* 2019 Aug 14;15(1):295.

* Bonnaud E.M., Troupin C., Dacheux L., Holmes E.C., Monchatre-Leroy E., Tanguy M., Bouchier C., Cliquet F., Barrat J., Bourhy H. Comparison of intra- and inter-host genetic diversity in rabies virus during experimental cross-species transmission. *PLoS Pathog.* 2019 Jun 20;15(6):e1007799

* Tsoleridis T., Chappell J.G., Onianwa O., Marston D.A., Fooks A.R., Monchatre-Leroy E., Umhang G., Müller M.A., Drexler J.F., Drosten C., Tarlinton R.E., McClure C.P., Holmes E.C., Ball J.K. Shared Common Ancestry of Rodent Alphacoronaviruses Sampled Globally. *Viruses.* 2019 Jan 30;11(2)

Monchatre-Leroy E., Murri S., Castel G., Calavas D., Boué F., Hénaux V. and Marianneau P. First insights of PUUV circulation in a rodent population in Alsace, France. *Zoonoses and public health* 2018; 1-12.

* Monchatre-Leroy E., Boué F., Boucher J.-M., Renault C., Moutou F., Ar Gouilh M., Umhang G. Identification of Alpha and Beta Coronavirus in Wildlife Species in France: Bats, Rodents, Rabbits, and Hedgehogs. *Viruses.* 2017, 9, 364.

* Troupin C., Picard-Meyer E., Dellicour S., Casademont I., Kergoat L., Lepelletier A., Dacheux L., Baele G., Monchâtre-Leroy E., Cliquet F., Lemey P., Bourhy H. Host genetic variation does not determine spatio-temporal patterns of European bat 1 lyssavirus. *Genome biology and evolution.* 2017 Nov 1;9(11): 3202-3213.

* Robardet E., Borel C., Moinet M., Jouan D., Wasniewski M., Barrat J., Boué F., Montchâtre-Leroy E., Servat A., Gimenez O., Cliquet C., Picard-Meyer E. Long-term population surveys of two serotine bat (*Eptesicus serotinus*) colonies exposed to EBLV-1 (European Bat Lyssavirus type 1): assessment of rabies transmission using capture-recapture models. *Plos neglected tropical diseases.* 2017 Nov 17;11(11) doi: 10.1371/journal.pntd.0006048. eCollection 2017 Nov.

Monchatre-Leroy E., Crespin L., Boué F., Marianneau P., Calavas D. and Hénaux V. 2017 Spatial and Temporal Epidemiology of Nephropathia Epidemica Incidence and Hantavirus Seroprevalence in Rodent Hosts: Identification of the Main Environmental Factors in Europe. *Transboundary emerging diseases.* 2017 Aug;64(4):1210-1228. doi: 10.1111/tbed.12494. Epub 2016 Mar 20.

* Indique les articles non pris en compte dans le manuscrit

Liste des publications scientifiques nationales

Marianneau P. et Monchatre-Leroy E. 2015 Le virus Puumala dans les écosystèmes forestiers d'Europe de l'Ouest / Puumala virus in the forest ecosystems of western Europe. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France* 2015 - Tome 168 - N°3 <http://www.academie-veterinaire-defrance.org>

* Maris P., Allix S., Etienne E., Garin Bastuji B., Gassilloud B., Lecarrou G., Madani N., Marianneau P., Monchâtre-Leroy E., Rizzo F., Rousset E., Sidi-Boumedine K. et Zini S. 2014 Guide méthodologique pour la mise en œuvre d'un procédé de désinfection des surfaces par voie aérienne appliqué aux zones confinées *Euroreference* 12 ; 11-18.

* Terrier O., Cotrel A., Gorsane S., Agache A., Bernard N., Conessa P., Fortier A., Maguères R., Deniau J.-M., Lemoine T., Leroy E., Perraudin C. Eaux destinées à la consommation humaine en zone de défense ouest : bilan des dossiers d'autorisation des installations de production et de distribution. 2014. *Médecine et Armées*, 42, 3, 245-254.

* Monchatre-Leroy E., Vabret A. and Moutou F. 2013 Détection chez des chauves-souris européennes et africaines de nouveaux coronavirus proches du Bétacoronavirus humain 2c EMC/2012 / Detection in European and African bats of new coronaviruses closely related to human 2cEMC/2012. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* 56 ; 31-32.

* Allix S., Garin-Bastuji B., Jestin V., Madani N., Marianneau P., Monchâtre-Leroy E., Rizzo F., Rousset E., Sidi-Boumedine K. et Zini S. 2013 Mise en œuvre de la nouvelle réglementation MOT : expérience de l'Anses *Euroreference* 11 ; 5-9.

* Dulieu F., Leroy E., Briand P., Perraudin C. Fauconnerie dans l'Armées de l'Air, un domaine d'action original des vétérinaires des armées. 2009. *Médecine et armées*, 37, 4, 341-349.

* Leroy E. Syncopes neurogéniques chez un chien. *Point vétérinaire* 2007 ; n°272 ; p. 41

* Indique les articles non pris en compte dans le manuscrit

Table des illustrations

Figure 1 : Structure schématique du virion d'un orthohantavirus (d'après Vaheri et al. 2013)	10
Figure 2 : Relation phylogénique des orthohantavirus basée sur la protéine N et représentation de la sous famille à laquelle appartient l'espèce hôte (Meyer et Schmaljohn, 2000)	12
Figure 3 : Phylogénie de PUUV en fonction de l'origine géographique de la séquence génétique (Castel et al., 2015)	13
Figure 4 : Aire de répartition actuelle du campagnol roussâtre (<i>Myodes glareolus</i>) en Europe (carte de l'IUCN)	14
Figure 5 : Abondance de campagnols roussâtres en fonction de la saison en Allemagne (Reil et al., 2017)	15
Figure 6 : Schéma des facteurs influençant les variations d'abondance de campagnols roussâtres en fonction de la saison en bleu et en fonction des années en vert (adaptation de Butet et Spitz, 2001)	16
Figure 7 : Influence schématisée des différents facteurs environnementaux sur l'épidémiologie des orthohantavirus	26
Figure 8 : Pays avec un nombre de cas augmentés (en bleu foncé) en Europe de 2005 à 2010 (d'après Heyman et al., 2011)	29
Figure 9 : Nombre de cas annuels de NE en France depuis 1982 en noir et moyenne mobile sur 6 ans en rouge	29
Figure 10 : Nombre moyen mensuel de cas humains de NE en France entre 1999 et 2017 à partir des rapports du CNR	30
Figure 11 : Années épidémiques pour les cas de FHSR en France sur la période de 1999 à 2017 à partir des rapports du CNR	31
Figure 12 : Années non épidémiques pour les cas de FHSR sur la période de 1999 à 2017.	31
Figure 13 : Aire de répartition du mulot à collier (<i>Apodemus flavicollis</i>) en Europe (carte de l'IUCN)	32
Figure 14 : Nombre de cas de NE cumulés par département entre 2012 et 2017 (données CNR)	33
Figure 15 : Hypothèse concernant l'interaction hôte / rongeurs	160
Figure 16 : Facteurs de confusion liés aux phases du cycle de population des rongeurs	164

Table des tableaux

Tableau 1 : Réservoir des espèces d'orthohantavirus européens pathogènes.....	12
Tableau 2 : Fréquences des différents symptômes du tableau clinique d'une NE provoquée par PUUV (d'après Vapalathi et al., 2003 ; Lautrette et al., 2003 ; Penalba et al., 1994).....	19
Tableau 3 : Incidence des FHSR à PUUV et taux de sérologie positive comparée en Europe.....	20
Tableau 4 : Prédispositions génétiques de l'Homme vis-à-vis des infections à orthohantavirus	25

Introduction

1) Les orthohantavirus

a) Classification et description

Les orthohantavirus sont retrouvés sur tous les continents à l'exception de l'Antarctique. Le comité international sur la taxonomie des virus (ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses) décrit 41 espèces. La taxonomie révisée en 2016 pour les orthohantavirus est la suivante :

Ordre: Bunyavirales (9 Familles)

Famille : Hantaviridae (1 Genre)

Genre : Orthohantavirus (41 espèces, cf. annexe 1).

Les particules virales des orthohantavirus sont de formes sphériques ou ovales (figure 1), leur taille varie entre 80 et 120 nm. Le génome de ces virus enveloppés est constitué de trois molécules d'ARN simple brin de polarité négative. Les 3 molécules d'ARN sont désignées en fonction de leur taille : S (small) de 1800 à 2100 nucléotides, M (medium) de 3700 à 3800 nucléotides et L (large) de 6500 à 6600 nucléotides. Le segment S code la nucléoprotéine N d'environ 433 acides aminés et, pour certains orthohantavirus, une protéine non structurale NSs. Le segment M code une glycoprotéine précurseur de deux glycoprotéines d'enveloppe (Gn et Gc), et le segment L code l'ARN polymérase ARN-dépendante de près de 2200 acides aminés (Reuter et Krüger, 2018).

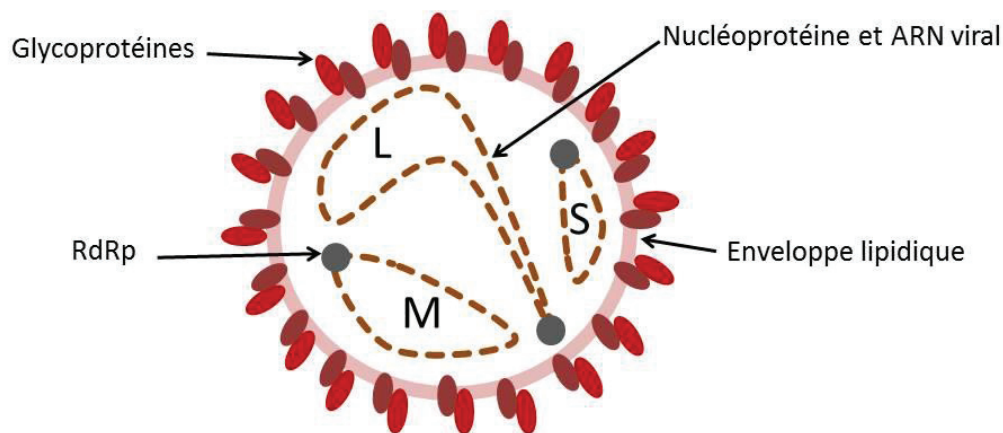


Figure 1 : Structure schématique du virion d'un orthohantavirus (d'après Vaheri et al. 2013)

b) Variabilité génétique

Les orthohantavirus sont des virus à ARN dont le taux de mutation est important comparativement aux virus à ADN du fait de l'absence de correction d'erreurs de l'ARN polymérase virale durant la réplication. Toutefois, le taux d'erreur, estimé entre $0,7 \times 10^{-7}$ et $2,2 \times 10^{-6}$ par site et par an pour Puumala Virus (PUUV) et Tula Virus (TULV), est relativement faible contrairement à d'autres virus à ARN ce qui classe les orthohantavirus parmi les virus à ARN plutôt stables (Sironen et al., 2001). La variabilité nucléotidique n'est pas homogène au sein des trois segments qui comprennent des régions hypervariables et d'autres très conservées (extrémités 3' et 5' des trois segments). De manière générale, la diversité nucléotidique est bien supérieure à celle de la séquence en acides aminés correspondante du fait d'un grand nombre de mutations silencieuses. La variabilité est aussi différente en fonction de l'espèce d'orthohantavirus considérée. Malgré tout, la dérive génétique qui résulte de l'accumulation au fil des réplifications, de substitutions, délétions et insertions semble être un mécanisme particulièrement important d'évolution pour les orthohantavirus (Razzauti et al., 2013). Cette dérive génétique est amplifiée par la sélection de sous-populations virales qui se produit lors de l'effondrement naturel et cyclique de l'abondance de rongeurs qui constitue le réservoir hôte. D'après le principe de l'effet fondateur, lors de l'accroissement suivant de la population de rongeurs, la population de virus s'établit à partir d'un petit nombre de variants viraux, d'où une perte de variation génétique (Escutenaire et al., 2001).

D'autres mécanismes d'évolution peuvent concerner les orthohantavirus : le réassortiment, qui est l'échange de segments entiers S, M ou L, et la recombinaison homologue, qui est l'échange de matériel génétique lors de la réplication entre deux virus d'une même espèce. La recombinaison hétérologue (entre deux virus d'espèces différentes) a rarement été observée chez les orthohantavirus (Zhang et al., 2010). La recombinaison homologue est défavorisée par rapport au réassortiment du fait de l'association intime de l'ARN à la nucléoprotéine N. A l'inverse, le réassortiment n'est pas entravé par la présence de la nucléoprotéine. La recombinaison et le réassortiment sont facilités par le fait que l'infection est chronique chez le réservoir. L'importance des différents mécanismes d'évolution est variable en fonction du segment et de l'espèce virale considérée.

c) Les réservoirs des orthohantavirus

Le réservoir des orthohantavirus est constitué de différentes espèces de l'ordre des rongeurs (*Rodentia*) appartenant aux sous-familles des Murinés, des Arvicolinés, des Néotominés et des Sigmodontinés. D'autres réservoirs ont été mis en évidence parmi d'autres ordres de mammifères, dont celui des soricomorphes (*Soricomorpha*) qui sont insectivores et celui des chauves-souris (*Chiroptera*). Les orthohantavirus associés aux chauves-souris et aux insectivores sont retrouvés comme ceux des rongeurs sur l'ensemble des continents. L'Homme est un hôte accidentel de ces virus, chez qui l'infection peut provoquer des maladies.

D'une manière générale et même si un certain nombre d'exceptions a été découvert, une congruence de phylogénie entre chaque orthohantavirus et son espèce réservoir au sein des rongeurs est montrée par de nombreuses études (figure 2) (Meyer et Schmaljohn, 2000). Elle serait le résultat soit d'une longue co-évolution entre le virus et son réservoir, soit de changements d'hôte suivis d'une spéciation spécifique. (Ramsden et al., 2009).

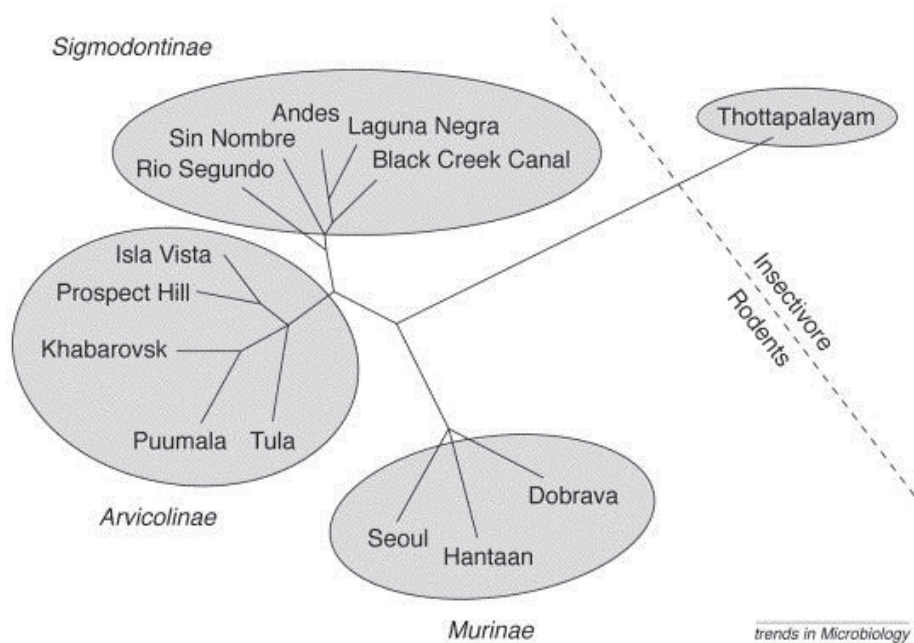


Figure 2 : Relation phylogénique des orthohantavirus basée sur la protéine N et représentation de la sous famille à laquelle appartient l'espèce hôte (Meyer et Schmaljohn, 2000)

d) Les orthohantavirus européens

Sur les 41 espèces d'orthohantavirus décrites par l'ICTV, seules six sont présentes en Europe :

- *Bruges orthohantavirus*
- *Dobrava-Belgrade orthohantavirus* (DOBV)
- *Nova orthohantavirus*
- *Puumala orthohantavirus* (PUUV)
- *Seoul orthohantavirus* (SEOV)
- *Tula orthohantavirus* (TULV)

Les réservoirs de certaines de ces espèces virales sont des rongeurs (tableau 1). Les autres orthohantavirus encore mal connus ont aussi été mis en évidence chez la taupe (*Talpa europaea*).

Espèce virale	Réservoir
Puumala orthohantavirus (PUUV)	Campagnol roussâtre (<i>Myodes glareolus</i>)
Dobrava-Belgrade orthohantavirus (DOBV)	Mulot (<i>Apodemus sp.</i>)
Tula orthohantavirus (TULV)	Campagnol (<i>Microtus sp.</i>)
Séoul orthohantavirus (SEOV)	Rat (<i>Rattus sp.</i>)

Tableau 1 : Réservoir des espèces d'orthohantavirus européens pathogènes

2) Le virus Puumala

Le travail réalisé dans le cadre de cette thèse a surtout porté sur l'épidémiologie du PUUV car c'est cet orthohantavirus en France et en Europe qui provoque chez l'Homme le plus grand nombre de cas de maladies (Vaheri et al., 2013). Les analyses phylogénétiques réalisées sur les séquences des PUUV retrouvées chez l'Homme ou le campagnol roussâtre, son réservoir, montrent des clusters inféodés à des zones géographiques (figure 3). Cette phylogénie géographique s'explique par une forte spécificité d'hôte et par la distance de mouvements limitée de ces hôtes réservoirs (Escutenaire et al., 2001). Les séquences françaises de PUUV font partie de la lignée CE (Central European) avec celles de Belgique, d'Allemagne, de Suisse et de Pologne.

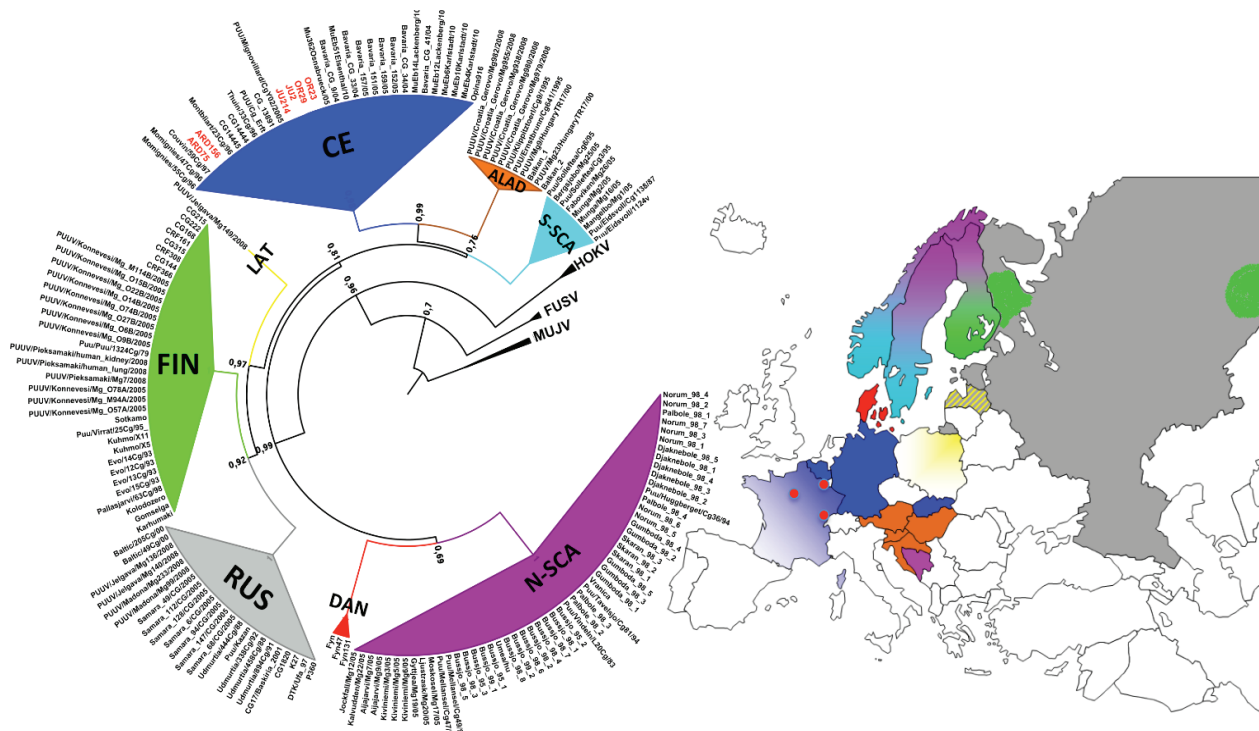


Figure 3 : Phylogénie de PUUV en fonction de l'origine géographique de la séquence génétique (Castel et al., 2015)

a) Biologie des campagnols roussâtres

i) Aire de répartition / biotope

Le campagnol roussâtre (*Myodes glareolus*, anciennement *Clethrionomys glareolus*) est largement répandu en Europe et en France (sauf sur le pourtour méditerranéen, en Corse et au-delà de 2 400 m d'altitude) (figure 4). Son habitat préférentiel est boisé avec un couvert végétatif assez dense. Il peut aussi être retrouvé en lisière de forêts, dans des espaces avec des broussailles, des ronces et des haies, ce campagnol étant assez adaptable. Son domaine vital est en général inférieur à 800 m², ce qui est assez petit pour une espèce forestière. Il y installe son nid souterrain, à faible profondeur, sous une

souche ou une broussaille. Autour de ce nid, une zone de moins de 100 m² est plus fréquemment occupée. Le territoire est marqué par un dépôt régulier d'urine et de fèces par les animaux des deux sexes. Certains individus peuvent effectuer des déplacements plus importants dans des circonstances particulières de recherche de nourriture et / ou de forte densité d'individus après la reproduction. L'activité plutôt nocturne des campagnols consiste pour une grande part à de la recherche de nourriture. Leur régime alimentaire varie en fonction de la zone géographique et de la saison ; il se compose de fleurs, feuilles, fruits, baies, graines, mousses, écorces d'arbres, faines et glands (particulièrement durant l'automne et l'hiver pour les quatre derniers) (Quere et Le Louarn, 2011).



Figure 4 : Aire de répartition actuelle du campagnol roussâtre (*Myodes glareolus*) en Europe (carte de l'IUCN)

ii) Cycle de reproduction et variation saisonnière

En France, la reproduction débute en février et mars et peut se poursuivre jusqu'en octobre. Le pic de reproduction est atteint en juin-juillet puis décline au cours des mois suivants. La reproduction du printemps concerne les individus ayant survécu à l'hiver. Les femelles sont sexuellement mûres à partir de l'âge de 2,5 mois mais un décalage peut se produire si la densité de population est importante ou si la période de naissance de l'individu considéré est tardive (automne ou hiver). Ce phénomène existe aussi pour les mâles. Par contre, les femelles nées très tôt dans l'année, au tout début du printemps peuvent se reproduire dès l'année de leur naissance. Cela conduit à rendre difficile la différenciation des classes d'âges subadulte et adulte simplement par le poids (Prevot-Julliard et al., 1999). La femelle donnera naissance à 3 à 5 petits après 17 jours de gestation en moyenne. Une femelle peut produire 4 à 5 portées par an si les conditions sont favorables, soit une nourriture abondante et une densité de population peu élevée.

Ce cycle de reproduction conduit à une variation saisonnière de l'abondance des campagnols avec peu d'individus dans les premiers mois de l'année, un pic en été puis une décroissance en automne ou en hiver en fonction des conditions climatiques (figure 5). Peu d'individus survivent à l'hiver, ce qui situe la limite de survie du campagnol roussâtre à 18 mois environ.

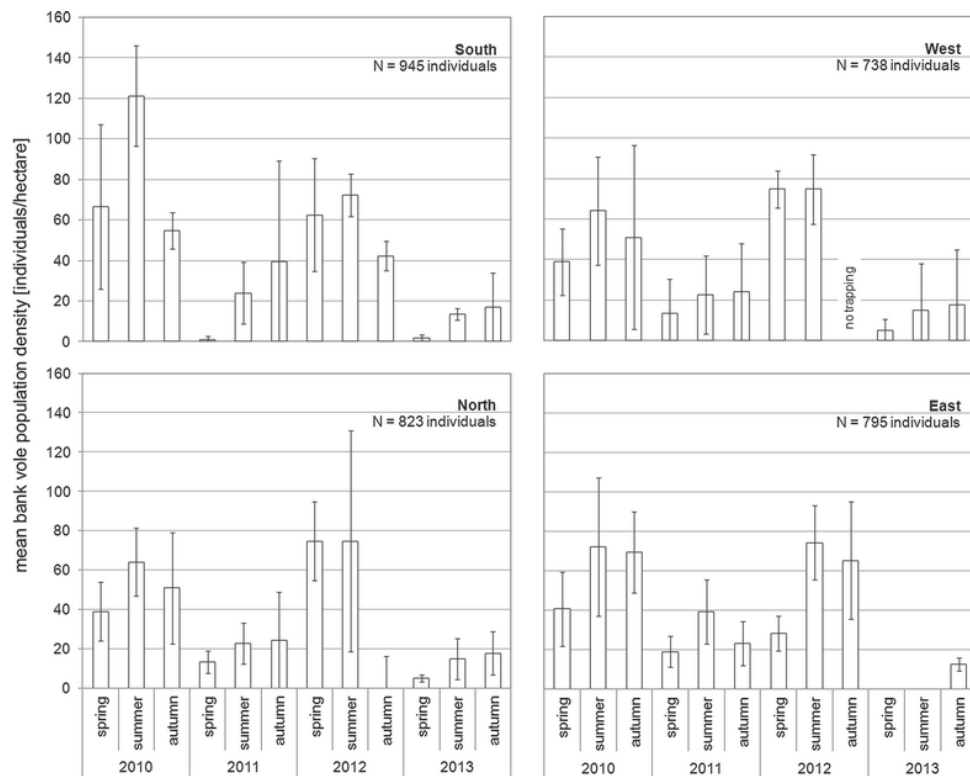


Figure 5 : Abondance de campagnols roussâtres en fonction de la saison en Allemagne (Reil et al., 2017).

Les captures ont été effectuées de 2010 à 2013 au sein d'un site dans la région du Bade-Wurtemberg pour le Sud (à la frontière alsacienne de l'autre côté du Rhin), un site dans la région de Westphalie-Rhénanie du Nord pour l'Ouest, un site dans la région de Poméranie occidentale pour le Nord et un site dans la région de Thuringe pour l'Est.

iii) Variation interannuelle

A cette variation saisonnière, s'ajoute une variation pluriannuelle avec des années (figure 6) où la population explose et d'autres années où la population a un niveau plus bas (Butet et Spitz, 2001). Ces fluctuations semblent assez régulières (avec un pic tous les trois ans) dans le nord de l'Europe (Finlande, Norvège et Suède) mais sont plus irrégulières à des latitudes plus basses, comme en France. De nombreuses études ont cherché à identifier les facteurs responsables de ces fluctuations mais leur influence relative, variable avec le lieu et la période considérés, ne permet pas de prévoir avec précision la survenue des pics de pullulation.

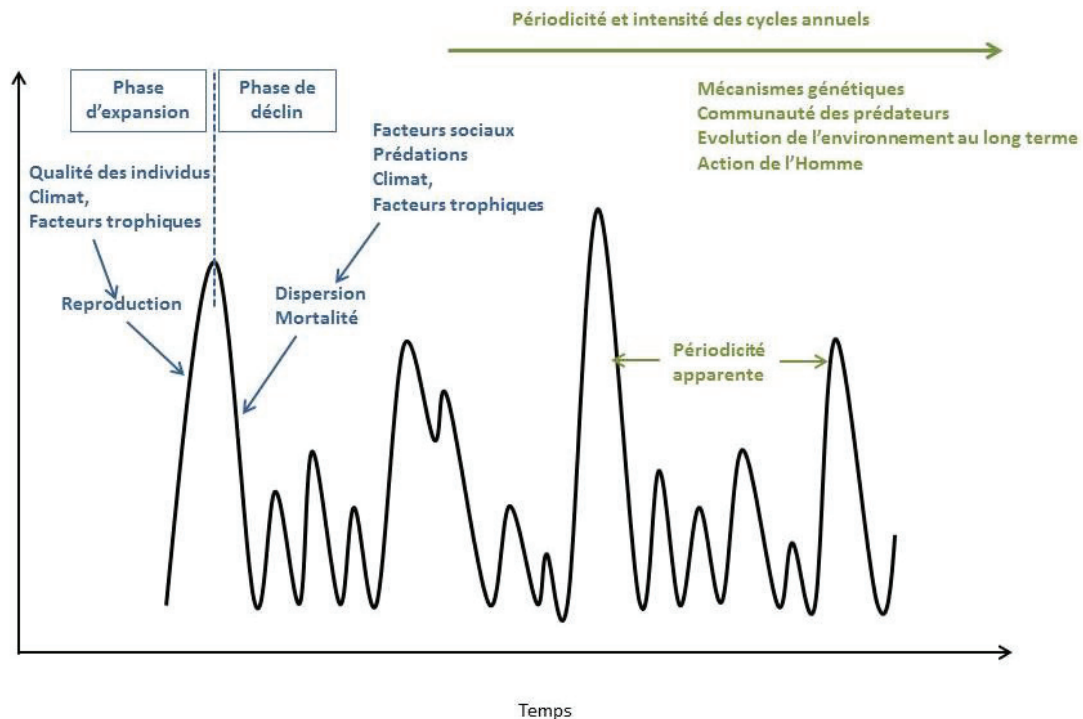


Figure 6 : Schéma des facteurs influençant les variations d'abondance de campagnols roussâtres en fonction de la saison en bleu et en fonction des années en vert (adaptation de Butet et Spitz, 2001)

Les facteurs influençant les variations d'abondance de campagnols roussâtres sont catégorisés en deux grands types : les facteurs extrinsèques et les facteurs intrinsèques (Andreassen et al., 2013). Parmi les facteurs extrinsèques, la prédation et les facteurs trophiques semblent particulièrement importants (Olsson et al., 2010). Le rôle de la prédation a très tôt été mis en avant pour expliquer le déclin saisonnier des populations mais aussi les cycles multi-annuels marqués et réguliers dans le nord de l'Europe (liés à la présence de prédateurs spécialistes). A l'inverse, en région plus méridionale, le ratio prédateurs généralistes / prédateurs spécialistes, plus favorable aux premiers n'entraîne qu'une réaction minime des prédateurs généralistes à une augmentation de leurs proies et les cycles d'abondance de campagnols prennent une allure moins marquée et plus irrégulière. Pour les populations de campagnols de l'Europe de l'Ouest, c'est le facteur trophique qui aurait une importance prépondérante. La production de glands et de faines qui permet une survie bien plus importante des campagnols pendant l'hiver entrainerait un succès reproducteur plus élevé au printemps suivant et une augmentation de la population. Les cycles de population des campagnols suivraient la fructification des hêtres et des chênes. Ces derniers connaîtraient de très bonnes fructifications tous les 7 à 8 ans sachant que cet intervalle est variable avec le climat, la richesse du sol, de la densité du peuplement et de l'âge des arbres. Pour les glandées des chênes, des cycles interannuels ont été observés, avec une cyclicité fortement influencée par le climat (tous les 2-3 ans en climat océanique et tous les 8-10 ans en climat continental avec des glandées partielles entrecoupées).

Les facteurs intrinsèques plus complexes à expérimenter mettent en avant deux effets principaux, les effets maternels (Inchausti et al., 2009) et les effets comportementaux (Andreassen et al., 2013). Les effets maternels posent l'hypothèse qu'à forte densité de population, les mères vont donner des

descendants de moins bonne qualité moyenne en terme de survie et/ou de reproduction, ce qui induit une diminution du taux de croissance de la population. Si les modèles mathématiques mettent en évidence ces effets maternels, ils sont plus difficiles à objectiver sur le terrain. Cette difficulté est encore plus importante avec les effets comportementaux même si certains semblent être impliqués dans les phases de déclin et d'accroissement de la population, notamment les comportements de sociabilité des individus, de partage de l'espace et d'infanticide. Il a ainsi été fait l'hypothèse que l'augmentation de la densité (lors de la phase ascendante du cycle) est favorisée par le haut degré de partage de l'espace entre les femelles et une sociabilité accrue qui se traduit par un plus faible nombre d'infanticides et un partage des ressources alimentaires dans un nid commun hivernal et donc une meilleure thermorégulation. Inversement, à forte densité, la sociabilité moindre des mâles migrants, plus nombreux que dans la phase ascendante du cycle, se traduit par un infanticide plus important et une mortalité accrue des femelles et donc un déclin de la population. Tous les effets en cascades des changements de comportements restent encore souvent hypothétiques et les mécanismes, provoquant ces changements comportementaux, inexplorés.

b) Infection des campagnols roussâtres par PUUV

i) Modes de contamination et excrétion

Plusieurs modes de contamination des campagnols roussâtres par PUUV sont possibles. Les rongeurs se contaminent de façon indirecte à partir des déjections (fèces et urine) contaminées présentes dans le milieu et qui sont déposées par les campagnols pour marquer leur territoire. La contamination peut aussi se faire directement par la salive lors de la reproduction, d'agressions entre mâles matures et via les soins d'une mère à sa portée. La contamination verticale ne semble pas être une voie de transmission du virus (Tordo et al., 2013).

L'excrétion du virus dans les fèces, l'urine et la salive varie entre individus en durée et en concentration au cours du cycle d'infection. Des études en milieu naturel et expérimental ont montré que certains individus excrètent seulement quelques jours lors de la séroconversion, d'autres pendant plusieurs mois et d'autres bien avant la séroconversion (Voutilainen et al., 2015). L'excrétion peut être intermittente et ne concerne pas forcément toutes les déjections en même temps (Haderstam et al., 2008). Certains auteurs émettent aussi l'hypothèse qu'une infection à un très jeune âge, avant le sevrage, provoque une infection et une excrétion persistantes (Calisher et al., 2009). La contamination des individus et la persistance du virus au sein d'une population de rongeurs est donc un phénomène complexe. Cette complexité semble accrue par la modification de l'attractivité des déjections des individus infectés pour les autres individus. Ainsi, l'urine des campagnols infectés semble être moins attirante pour les autres rongeurs qui vont la renifler moins souvent et pendant moins longtemps que de l'urine de rongeurs non infectés (Hughes et al., 2014).

ii) Réponse immunitaire, effets cliniques et autres effets

Les campagnols séroconvertissent environ 15 jours après la contamination (Kallio et al., 2006a), les anticorps produits sont des immunoglobulines de type G (IgG) séroneutralisantes (Dubois et al., 2017). Ces anticorps n'empêchent pas le virus de gagner l'ensemble des organes. La virémie se produit entre

15 jours et 4 mois après la séroconversion mais peut dans certains cas la précéder. La présence d'ARN viral peut être détectée dans le sang pendant plusieurs semaines (Voutilainen et al., 2015). Seuls les anticorps maternels transmis via le placenta et le lait par la mère contaminée protègent les jeunes de l'infection par PUUV. Ces anticorps vont persister pendant 80 jours environ (Bernshtein et al., 1999 ; Kallio et al., 2006b).

Aucun signe clinique apparent n'est mis en évidence chez le campagnol roussâtre suite à une contamination par PUUV. Cependant, certains auteurs ont montré un effet sur la survie à plus long terme et la reproduction. L'effet sur la survie varie en fonction de la période d'exposition avec une survie amoindrie par la contamination pendant l'hiver (Kallio et al., 2007) mais améliorée entre le printemps et l'été (Reil et al., 2017). La contamination par PUUV de jeunes rongeurs, immatures sexuellement, accélérerait leur maturation sexuelle mais diminuerait leur survie (Tersago et al., 2012 ; Kallio et al., 2006b). L'hypothèse d'investissement terminal qui postule un compromis entre reproduction et survie explique ce constat. Comme la survie sur le long terme diminue avec l'infection chronique, toute l'énergie est investie dans la reproduction accélérant la maturation sexuelle des jeunes campagnols qui augmenteront leur chance de se reproduire avant leur mort (Kallio et al., 2015).

La réceptivité des campagnols à l'infection est différente en fonction de leur provenance d'une zone enzootique ou non. La contamination par PUUV se traduit par des réponses immunitaires différentes; la réponse en anticorps neutralisants est moins importante et l'ARN viral sera détecté plus tardivement et à des concentrations moins élevées chez les campagnols de la zone enzootique (Dubois et al., 2017). Cette différence est considérée comme de la tolérance vis-à-vis du PUUV, c'est-à-dire la capacité à limiter l'impact sanitaire de l'infection par un pathogène (Schneider et Ayres, 2008). Cette tolérance a été explorée chez les campagnols par l'étude de divers gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II et du Tumor Necrosis Factor α (TNF α) impliqués dans leurs réactions immunitaires. Ainsi, le TNF α permet de lutter contre les infections mais de fortes productions induisent des désordres inflammatoires. Les campagnols des zones endémiques ont une production moindre de TNF α (Guivier et al., 2010a). Certains allèles du gène Drb du CMH II sont plus fréquemment retrouvés chez les campagnols infectés que les non infectés (Deter et al., 2008) mais cette association n'est pas valable pour toutes les régions échantillonnées. Ce constat suggère l'existence d'autres influences telles que la génétique du virus (Guivier et al., 2010b).

3) Importance zoonotique

a) Généralités et mode de contamination

Certains orthohantavirus sont responsables de maladies humaines appelées hantaviroses à syndrome pulmonaire ou cardiopulmonaire (HSCP) en Amérique et fièvre hémorragique à syndrome rénal (FHSR) en Europe, Afrique et en Asie. Chaque année 150 000 à 200 000 cas humains de FHSR ayant entraîné une hospitalisation sont diagnostiqués dans le monde. En Europe, le nombre de cas humains est en constante augmentation depuis plus de 20 ans avec des pics épidémiques certaines années.

La contamination humaine par les orthohantavirus se fait le plus souvent de façon indirecte via un contact avec des déjections de rongeurs infectés. La contamination directe du rongeur à l'Homme est

possible mais moins fréquente car la manipulation de rongeurs sauvages par l'Homme n'est réalisée qu'à de rares occasions. La transmission directe entre hommes n'est observée que pour un virus particulier, le virus Andes retrouvé en Amérique et non présent en Europe. Le virus est transmis à l'Homme par des aérosols contaminés via les voies respiratoires, les muqueuses ou de la peau lésée.

b) Les infections humaines à PUUV

i) Tableau clinique

La gravité de la maladie est principalement liée à l'espèce virale (Heyman et al., 2009a). Ainsi, parmi les orthohantavirus d'Europe associés aux rongeurs sauvages, DOBV est celui qui provoque la maladie la plus sévère (avec un taux de mortalité entre 9 et 12%) alors que TULV est rarement associé à des symptômes cliniques. PUUV a un pouvoir pathogène entre les deux (taux de mortalité de 0,1 à 0,4%), il provoque une FHSR moins sévère appelée néphropathie épidémique (NE). Les infections cliniques humaines à PUUV sont les plus nombreuses en Europe et surtout en France, et de ce fait les paragraphes suivants portent sur les infections humaines à PUUV.

Les signes cliniques induits par le virus incluent une augmentation de la perméabilité vasculaire et une altération du tonus vasculaire (Cosgriff, 1991). Cinq phases cliniques vont se succéder : une phase fébrile, une phase hypotensive, une phase oligurique, une phase diurétique et enfin la convalescence si elle a lieu.

Le tableau clinique d'une NE provoquée par PUUV apparaît après une phase d'incubation qui peut durer entre une semaine à 1,5 mois (Vapalahti et al., 2003). Après incubation, le tableau clinique évoque d'abord un syndrome grippal avec une hyperthermie élevée autour de 39,5°C. Juste après, des douleurs articulaires et musculaires, des nausées, des vomissements et de la toux peuvent être observés. Au même stade d'évolution de la maladie, des manifestations hémorragiques peuvent survenir, principalement sur le haut du corps (visage, cou et membres supérieurs). Enfin, une myopie passagère (durée maximale de 72h) résolutive peut aussi apparaître et sera fortement évocatrice d'une NE (Penalba et al., 1994). Elle n'est cependant pas présente dans tous les cas (de 10 à 36%, cf. tableau 2).

Fréquence d'apparition	Symptômes décrits
environ 100%	Hyperthermie marquée
	Syndrome algique : articulaire, musculaire, abdominal non amélioré par le paracétamol
≈ 50%	Atteinte rénale
	Troubles digestifs : nausée, vomissement
	Pharyngite, toux
≈ 15%	Troubles hémorragiques : hématurie, épistaxis, conjonctives, gencives
	Myopie transitoire

Tableau 2 : Fréquences des différents symptômes du tableau clinique d'une NE provoquée par PUUV (d'après Vapalathi et al., 2003 ; Lautrette et al., 2003 ; Penalba et al., 1994)

L'atteinte rénale est objectivée dans 50% des infections par une augmentation de la créatinémie et dans 66% par une augmentation de la protéinurie. Cette atteinte rénale traduit la phase pathogénique

d'oligurie qui suivra une évolution majoritairement favorable dès l'apparition de la phase diurétique avec une polyurie de 3 à 6 litres par jour.

Les perturbations du tableau biologique, en plus de celle liées à la fonction rénale, concernent la formule sanguine avec une thrombocytopénie assez précoce (dans les 7 jours après le début de la maladie) dans 98% des cas et une perturbation de la numération plaquettaire.

ii) Formes asymptomatiques

Tous les individus infectés ne développent pas de signe clinique apparent. Ainsi suite à une contamination par PUUV, les études ont estimé à 30% la proportion d'individus qui présentent des signes cliniques. Les études épidémiologiques où aucun cas clinique n'a été déclaré ont montré des séroprévalences moyennes de 2,1% (n=727) en Irlande du Nord (McKenna et al., 1994) et entre 0,7% (n= 299) à 7,1% (n=265) en fonction des catégories de populations dans le Nord de l'Italie entre 1987 et 1991 (Nuti et al., 1993). Dans les pays où des cas humains sont signalés, il existe une séroprévalence plus importante que l'incidence de NE (cf. tableau 3). Ce constat est basé sur des études assez anciennes qui mériteraient d'être revues mais il peut être supposé que compte tenu de l'augmentation du nombre de cas cliniques actuels par rapport aux périodes des études, la séroprévalence ne peut aussi avoir qu'augmentée.

Pays	Incidence moyenne annuelle / période et lieu de la mesure	Séroprévalence / période et lieu de la mesure	Références bibliographiques
Allemagne	Moins de 200 cas par an sur l'ensemble du territoire entre 1983 et 1995	0,8- 3,12% sur l'ensemble du territoire (période non précisée)	(Zöller et al., 1995)
Grèce	Moins de 10 cas par an sur le territoire entre 1982 et 1993	4% de 1982 à 1985 et de 1983 à 1993 sur l'ensemble du territoire mais plus de prélèvements au Nord	Antoniadis et al., 1987 ; Papadimitriou et Antoniadis, 1994
Pays-Bas	10 cas par an sur le territoire avant 1995	0,7% de 1989 à 1992 en zone endémique, soit une bonne partie du territoire sauf Nord	Groen et al., 1995
Finlande	19 à 90 cas pour 100 000 habitants de 1989 à 1996 sur l'ensemble du territoire	20% de 1989 à 1996 sur l'ensemble du territoire	Bremmer-Korvenkontio et al., 1999
Suède	21 à 31 cas pour 100 000 habitants annuellement de 1987 à 1991 dans les 2 comtés les plus au Nord	5,4% de janvier à avril 1990 dans les 2 comtés les plus au Nord	Ahlm et al., 1994

Tableau 3 : Incidence des FHSR à PUUV et taux de sérologie positive comparée en Europe

iii) Diagnostic

La suspicion d'une NE sera en premier lieu clinique, particulièrement dans les zones d'endémie connue de la maladie (Lautrette et al., 2003). Une fièvre élevée accompagnée de facteurs de risques, c'est-à-dire un lien avec le milieu forestier, est évocateur pour les médecins. Un des symptômes est quasi pathognomonique : la myopie transitoire aiguë mais cet état n'est pas présent sur l'ensemble des cas et peut passer inaperçu car il dure de quelques minutes à quelques heures seulement. L'exploration de l'hyperthermie élevée par des examens complémentaires va aiguiller ou renforcer la suspicion clinique avec la thrombocytopénie, la numération plaquettaire et l'atteinte de la fonction rénale.

Le diagnostic spécifique de certitude d'une NE est basé sur la sérologie. Des immunoglobulines de type M (IgM) sont retrouvées assez précocement après les premiers signes cliniques, cinq jours après l'infection pour PUUV. Ces IgM vont persister pendant plusieurs mois. De même, des immunoglobulines de type A (IgA) apparaissent aussi assez tôt dans la salive et dans le sang à des taux assez élevés. Les premières IgG dirigées contre la nucléoprotéine apparaissent ensuite dans un délai de 1 à 2 jours, ils persisteront pendant plusieurs années (Kallio-Kokko et al., 2001). Ces IgG sont des anticorps non neutralisants contrairement à ceux un peu plus tardifs (après plus de dix jours) et qui sont dirigés contre les protéines Gn et Gc. Il existe des réactions croisées entre les IgG dirigées contre la nucléoprotéine (Escutenaire et al., 2001). Les réactions croisées sont d'autant plus importantes que les espèces virales sont proches phylogénétiquement. Ainsi la réactivité sérologique croisée va se produire entre les orthohantavirus PUUV et TULV, d'un côté, et entre DOBV et SEOV, de l'autre.

Un résultat positif en sérologie chez un individu sans symptôme clinique ne signifie pas nécessairement que l'individu va développer une FHSR (Vapalahti et al., 2003). En effet, les anticorps persistent bien plus longtemps que l'expression clinique d'une part, et d'autre part, toutes les personnes ayant été en contact avec le virus ne déclarent pas de maladie.

En plus de la sérologie, l'ARN viral est détectable dans le sang des malades de façon fugace, lorsque le patient a une sérologie en IgM positive et en IgG négative.

Lors d'un tableau clinique et de facteurs de risques évocateurs, le diagnostic de certitude ne sera établi que par une sérologie positive à IgM et/ou IgG, le plus souvent suivi d'un deuxième prélèvement à 5 à 15 jours d'intervalle pour voir l'évolution de la concentration en anticorps.

En France, une quinzaine de laboratoires (dont la plupart sont les laboratoires des hôpitaux de la zone d'endémie) effectue les diagnostics de première intention grâce à des kits commerciaux Elisa ciblant majoritairement les IgM en réaction au PUUV. Les résultats positifs et douteux sont confirmés (ou infirmés) par le centre national de référence (CNR) des hantavirus à l'Institut Pasteur. Le CNR effectue la recherche des IgM et des IgG spécifiques de différentes espèces virales (PUUV, DOBV, SEOV et Sin Nombre) pour préciser le diagnostic en fonction du lieu d'exposition des patients. Sur les prélèvements issus d'individus malades depuis moins de dix jours, une recherche d'ARN viral sera effectuée par RT-PCR nichée ou PCR temps réel. Le CNR conclura à un diagnostic positif pour une NE si :

- les IgM et IgG sont détectées,
- et / ou de l'ARN est détecté,

- et / ou il y a apparition d'IgM et / ou d'IgG dans un deuxième prélèvement (Reynes et al., 2017).

iv) Traitement et prévention

Le principal traitement des NE est symptomatique avec administration en fonction de la gravité, d'une fluidothérapie et de substances vasotoniques. La dialyse pourra être mise en œuvre dans les cas les plus graves. En France, la majeure partie des cas diagnostiqués sont hospitalisés, non pas que tous les cas de FHSR soient graves mais plutôt du fait que les formes bénignes de FHSR sont généralement non diagnostiquées.

Plusieurs essais et études sur des traitements plus spécifiques ont montré leur efficacité, ce qui constitue un apport pour le traitement des cas les plus graves. Ainsi, une étude de 2014 suggère que l'immunothérapie passive serait utile dans le traitement des FHSR provoquée par PUUV car la gravité de la maladie chez les patients suivis dans l'étude était associée à la faible concentration d'IgG séroneutralisants et non pas à la charge virale, mesurée par le taux d'ARN viral retrouvé dans le sang (Pettersson et al., 2014).

Certaines molécules comme la ribavirine semblerait diminuer la mortalité des cas de FHSR mais serait moins active contre les HSCP (Moreli et al., 2014). L'icatibant, qui est un antagoniste des bradykinines de type B2 vasodilatatrices, a été utilisé dans le traitement de cas compliqués de FHSR en 2015 (Laine et al., 2015). D'autres essais réalisés in vitro ou sur modèle animal concluent à des effets positifs de la lactoferrine (antiviral et antibactérien) et du favipiravir (antiviral actif contre les virus à ARN) mais qui doivent être administrés très précocement, en préventif pour la première molécule (pour inhiber la réplication virale) et avant l'apparition d'ARN viral dans le sang pour la seconde (Safronetz et al., 2013 ; Murphy et al., 2001).

La principale prévention est d'éviter tout contact avec les rongeurs sauvages et leurs excréments. Le seul vaccin commercialisé est un vaccin inactivé à partir de cultures cellulaires infectées ou de système nerveux central de souris infectées par SEOV ou le virus Hantaan (HTNV). Il est utilisé en Corée du Sud mais son efficacité semble limitée (protection estimée entre 71,4% et 78,7%) (Jung et al., 2018). Les pistes de développement de vaccin passent par l'utilisation de vaccins recombinants à partir de vaccin ou de baculovirus exprimant la nucléoprotéine et / ou les glycoprotéines de HTNV, ou par l'immunisation par de l'ADN nu du segment M de HTNV, de SEOV et du virus Andes (ANDV) (Jonsson et al., 2008). Les deux types de vaccins semblent fonctionner sur des modèles animaux mais aucun n'est encore commercialisé à ce jour.

c) Facteurs de risques des hantaviroses

i) Viraux

Un des mécanismes expliquant la différence de pathogénicité entre les différentes espèces d'orthohantavirus est liée à l'utilisation de différentes intégrines en tant que récepteurs cellulaires. Les intégrines sont des récepteurs cellulaires qui, une fois liées à leur ligand, activent certaines voies de signalisation cellulaire. Les intégrines $\beta 3$ jouent ainsi un rôle dans la migration des cellules

endothéliales et donc dans la perméabilité vasculaire et le maintien de l'intégrité vasculaire. Les intégrines $\beta 1$, quant à elles, jouent un rôle dans l'hématopoïèse. Les orthohantavirus SEOV, PUUV, DOBV et HTNV qui utilisent l'intégrine $\beta 3$ comme récepteur sont les plus pathogènes alors que le TULV et le Prospect Hill orthohantavirus (PHV), qui utilisent l'intégrine $\beta 1$, sont peu ou pas pathogènes pour l'Homme (Popugaeva et al., 2012). Le pouvoir pathogène des orthohantavirus semblent donc lié à la perturbation du fonctionnement du système cellulaire activé par les intégrines $\beta 3$.

Au sein de chaque espèce d'orthohantavirus, peu de données existent sur des souches qui seraient plus pathogènes que les autres. Cela est cependant théoriquement possible compte tenu des mécanismes d'évolution des orthohantavirus et cela a été rarement étudié (Plyusnina et al., 2012). Ainsi, un épisode de FHSR dans une université chinoise en 2003 a été provoquée par un variant de HTNV issu du réassortiment entre les segments S et L d'une souche humaine et le segment M d'une souche de rat (Zhang et al., 2010). Ce variant d'HTNV était bien moins pathogène que ne peuvent l'être les HTNV en général. De la même manière, en France, une mutation dans le domaine antigénique principal des variants de PUUV retrouvés dans la région d'Orléans a été évoquée pour expliquer l'absence de cas humains dans cette zone géographique malgré une séroprévalence chez les rongeurs de plus de 17% (Castel et al., 2015).

De même, il semblerait que les récepteurs utilisés par l'espèce virale jouent un rôle dans la transmissibilité du virus. ANDV est le seul orthohantavirus qui soit transmissible d'Homme à Homme. Ce virus utilise l'intégrine $\beta 3$ comme récepteur mais des cellules déficientes en intégrines $\beta 3$ permettent aussi l'infection par ANDV même si l'entrée du virus dans la cellule semble moins efficace que dans une cellule non déficiente. Ce résultat laisse supposer l'existence d'une autre voie d'entrée importante pour ANDV, qui pourrait expliquer la transmissibilité interhumaine (Ray et al., 2010). Hormis le cas d'ANDV, la transmissibilité des diverses espèces d'orthohantavirus ou des variants au sein d'une même espèce est rarement étudiée. La bibliographie ne mentionne pas à ma connaissance des facteurs viraux au sein d'une espèce virale qui détermineraient la transmissibilité du virus à l'Homme.

ii) Humains

Les facteurs de risques humains liés aux hantaviroses sont de deux types : génétiques et comportementaux. Les prédispositions génétiques de l'Homme aux maladies infectieuses sont celles qui modifient leur réponse immunitaire. Le CMH est un groupe important de gènes qui codent pour des molécules ayant un rôle central dans le système immunitaire. Les molécules du CMH de classe I, présentes sur toutes les cellules nucléées et les plaquettes, et les molécules du CMH de classe II, présentes sur les cellules lymphocytaires (certains lymphocytes T, lymphocytes B, macrophages et monocytes), interviennent dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T. Les molécules du CMH de classe III sont plus diverses mais certains composés du complément (C4, C2) et certaines cytokines en font partie. Aussi, certaines études ont montré que le fait de posséder certains allèles du CMH de classe I, II ou III prédisposait à être infecté et / ou à développer des formes sévères des maladies provoquées par les orthohantavirus (cf. tableau 4).

	Prédispositions génétiques		
Conséquences	Allèles du CMH1 / Allèles du CMH2 / Allèles du CMH3	Haplotype CMH	Autres allèles
Susceptibilité accrue	<u>HTNV</u> ¹ HLA-DRB1*0401-0411 ¹ HLA-DRB1*1001 ¹ HLA-DRB1*1305 ¹ HLA-DRB5*0101-0201 <u>SEOV</u> ¹ HLA-DRB1*1201-1202 ¹ HLA-DRB5*0101-0201 <u>PUUV</u> ⁸ HLA-A1 ³ HLA-DRB1*03 ⁸ HLA-DQB1*0201 ⁸ HLA-DQA1*0501 ⁶ HLA-DRB3 ⁶ TNFα 2 ⁸ HLA-C4AQ*0 <u>DOBV</u> ³ HLA-DRB1*03		
Sévérité accrue de la maladie	<u>PUUV</u> ³ HLA-B56	<u>PUUV</u> ⁶ HLA-B8 DRB3	
Susceptibilité et sévérité accrues	<u>HTNV</u> ^{2,4} HLA-B46 ^{2,4} HLA-DRB1*09 ¹ HLA-DRB1*1101-1105 <u>PUUV</u> ^{6,8} HLA-B8 ³ allèle HLA-DRB1*13 ⁸ allèle HLA-DRB1*0301	<u>HTNV</u> ^{2,4} HLA-B46 DRB1*09 ^{2,4} HLA-B51 DRB1*09	<u>HTNV</u> ⁵ HPA-3*b
Susceptibilité moindre	<u>HTNV</u> ² HLA-DRB1*12		
Gravité moindre de la maladie	<u>HTNV</u> ¹ HLA-DRB1*0401-0411 ¹ HLA-DRB1*1001 ¹ HLA-DRB1*1305 <u>SEOV</u> ¹ HLA-DRB1*1201-1202 <u>PUUV</u> ³ HLA-B07 ³ HLA-B57 ³ HLA-DRB1*03 ³ HLA-DRB1*15		
Effet protecteur (susceptibilité et gravité moindres)	<u>HTNV</u> ¹ HLA-DRB5*0101-0201 <u>SEOV</u> ¹ HLA-DRB5*0101-0201		

	PUUV ⁷ HLA-B27		
--	------------------------------	--	--

¹ : Zhu et al., 2015 ; ² : Ma et al., 2012 ; ³ : Korva et al., 2011 ; ⁴ : Wang et al. 2009 ; ⁵ : Liu et al., 2009 ;
⁶ : Makela et al., 2002 ; ⁷ : Mustonen et al., 1998 ; ⁸ : Mustonen et al., 1996

Tableau 4 : Prédispositions génétiques de l'Homme vis-à-vis des infections à orthohantavirus

Les mécanismes sous-jacents ne sont pas parfaitement élucidés. Une bonne partie des allèles identifiés (HLA-DRB, HLA-DQA, HLA-DQB, HLA-A et HLA-B) est le support de la production de glycoprotéines qui permettent la présentation de peptides endogènes ou exogènes (respectivement molécules de CMH I ou de CMH II) aux lymphocytes T. HLA-C4AQ*0 est la base de production d'un composé classique de l'activation du système du complément et l'allèle TNFα 2 est situé dans la région promotrice du gène de TNFα. Ces aspects du système immunitaire de l'Homme sont donc impliqués dans la pathogénie des maladies à orthohantavirus. Le seul allèle qui ne relève pas du CMH est HPA-3*b, qui est l'allèle du gène HPA-3, allo-antigène (c'est-à-dire un antigène qui concernent plusieurs individus au sein d'une espèce comme les groupes sanguins) présent seulement sur les plaquettes sanguines qui a un rôle dans l'agrégation et l'adhésion des plaquettes. Les allèles associés à une susceptibilité accrue et/ou une maladie plus grave sont très dépendantes des orthohantavirus et des populations humaines considérés. Les fréquences de ces allèles ou haplotypes sont en effet très variables entre zones géographiques. Ainsi, l'haplotype HLA-B46 DRB1*09 qui est associé à une plus grande susceptibilité à HTNV et à une forme de maladie plus sévère est très fréquent dans la population chinoise mais extrêmement rare dans la population européenne, rendant la mise en évidence d'une association entre allèles du CMH et susceptibilité / sévérité de la maladie (si elle existe) bien plus difficile.

Indépendamment des facteurs génétiques, l'Homme sera plus susceptible de se contaminer si son mode de vie le met plus fréquemment en contact avec les déjections possiblement contaminées des rongeurs. Ainsi, en Europe, une activité professionnelle ou récréative liée à la forêt ou le simple fait d'habiter à proximité des forêts dans un environnement rural est un facteur de risque mis en évidence dans diverses études épidémiologiques (Crowcroft et al., 1999). Les activités pratiquées influent aussi sur le risque de se contaminer, les plus à risque étant celles qui génèrent le plus de particules inhalables, le balayage de poussières, le terrassement, le travail du bois, les entraînements militaires (notamment le fait de ramper) (Watson et al., 2014 ; Richardson et al., 2013)). Le temps global passé dans les zones où vivent possiblement les rongeurs réservoirs a aussi été mis en évidence (Childs et al., 1995). Le comportement individuel va donc directement influencer le propre degré d'exposition aux poussières contaminées par les rongeurs infectés.

iii) Environnement et réservoir

Les activités humaines altèrent l'environnement avec notamment des diminutions de biodiversité et des modifications des paysages qui peuvent indirectement influencer l'incidence chez le réservoir animal et constituer une variation du risque d'exposition pour l'Homme. La fragmentation des paysages et la présence de milieux connectés, favorables aux espèces réservoirs, augmentent les capacités de déplacements des rongeurs et les probabilités de contamination (Zeimes et al., 2015 ; Langlois et al., 2001). En Amérique du Sud, la déforestation au bénéfice des zones de culture augmente les milieux favorables aux espèces réservoirs et diminue la biodiversité. Or une biodiversité plus importante implique un nombre d'espèces susceptibles d'être infectées mais sans être réservoir plus

élevé diminuant la probabilité de contamination de l'espèce réservoir. C'est cet effet dilution qui sera amoindri par la déforestation (Prist et al., 2017).

Les bouleversements actuels du climat ont un impact sur la distribution des hôtes réservoirs des différents orthohantavirus et sur les risques de maladies humaines (Tian et al., 2017 ; Guterres et al., 2018 ; Dearing et al., 2010). Il est cependant assez complexe de prédire quel changement climatique aura une influence car cet effet est variable en fonction des régions géographiques, de l'espèce virale et de l'espèce réservoir et peut être en interaction avec d'autres facteurs tels que le comportement individuel humain, le biotope, etc. (Previtali et al., 2010).

L'épidémiologie des orthohantavirus chez les espèces réservoirs et chez l'Homme fait intervenir de nombreux facteurs de risques environnementaux qui regroupent les facteurs climatiques, la composition de l'environnement à petite et grande échelles (composition du sol, densité du couvert végétatif, altitude, connectivité et fragmentation des paysages, etc.), la disponibilité alimentaire et la biodiversité (effet dilution et prédation).

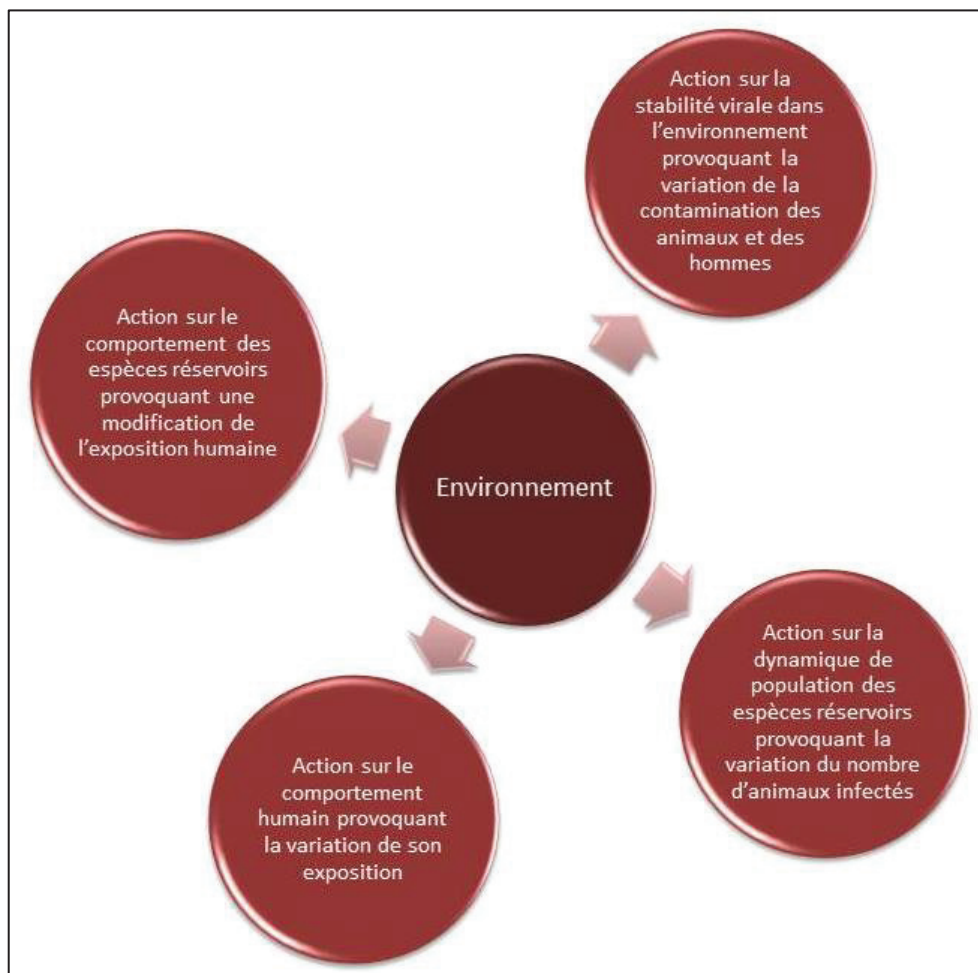


Figure 7 : Influence schématisée des différents facteurs environnementaux sur l'épidémiologie des orthohantavirus

Ces différents facteurs vont agir suivant différentes voies (cf. figure 7). La voie la plus explorée est celle qui s'intéresse aux facteurs modifiant la dynamique de population des espèces réservoirs. L'abondance de la population sera favorisée par une reproduction précoce et/ou importante qui sera dépendante des conditions météorologiques favorables (température et précipitations), de la disponibilité alimentaire, du couvert végétal permettant de s'abriter et de la présence de prédateurs. Un individu de l'espèce réservoir aura alors une probabilité d'infection variable en fonction de la densité de la population à laquelle il appartient, de la structure des paysages et de la biodiversité (du fait de l'effet dilution favorisant ou non les rencontres entre animaux infectés). Le nombre d'animaux infectés détermine l'importance de l'excrétion virale dans l'environnement où une meilleure survie virale favorisera la transmission indirecte entre rongeurs ou vers l'Homme. Certains facteurs environnementaux tels que le climat peuvent défavoriser la survie du virus dans les déjections déposées dans le milieu et diminuer, voire inhiber, la contamination par voie indirecte. Les orthohantavirus étant sensibles à la température, à la dessiccation et aux UV, le climat, la composition du sol et du couvert végétatif conditionneront cette survie virale. Enfin, l'exposition humaine sera aussi influencée par le climat, le beau temps favorisant les activités à l'extérieur. Certains événements, le plus souvent climatiques, vont modifier les habitats des rongeurs les forçant à trouver refuge ailleurs, voire dans les zones plus proches de l'Homme, ce qui augmente la possibilité d'exposition humaine aux rongeurs infectés. Ainsi, un redoux hivernal en Suède en 2006-2007 a provoqué une fonte des neiges anormale et une perte d'abri pour les rongeurs, entraînant un nombre de cas de NE très important (Pettersson et al., 2008). De même, des pluies très importantes suivies d'inondations (comme en Chine en 1998) ou des explosions de populations de rongeurs (comme en 1993 aux USA dans la région des « Four corner ») entraînent des mouvements plus importants des animaux et un nombre plus élevé de contaminations humaines du fait d'une plus grande exposition (Jonsson et al., 2010).

L'existence des facteurs de risques environnementaux et comportementaux humains entraînent une saisonnalité des maladies à orthohantavirus. Les risques et le nombre de cas sont maximum lors de certaines saisons qui diffèrent en fonction de la zone géographique. En Europe centrale et de l'Ouest et sur le continent américain, le pic de maladies humaines a lieu au printemps et à l'été (Heyman et al., 2009a ; Mac Neil et al., 2011 ; Figueiredo et al., 2014). En Europe du Nord et en Asie, le pic est plutôt automnal et hivernal (Lee et al., 2013 ; Rose et al., 2003). Cette saisonnalité annuelle est accompagnée par une variation entre années qui dépend en partie de l'abondance des rongeurs réservoirs. Cette variation interannuelle peut être assez régulière, aboutissant à des cycles interannuels tous les 3 à 4 ans en Europe du Nord, ou plus irrégulière dans les autres zones géographiques.

4) Epidémiologie des fièvres hémorragiques à syndrome rénal en France

a) Détection des cas de NE

Les premières suspicions cliniques décrites en France datent de la première guerre mondiale avec la néphrite des tranchées et ensuite, en 1977, avec la fièvre des bûcherons de la région de Hirson. Le premier cas confirmé sérologiquement par immunofluorescence indirecte est celui d'un jeune homme de 29 ans hospitalisé à Paris en 1982 après un séjour dans l'Aisne (Mery et al., 1983). A la fin des années

1980, le CNR des fièvres hémorragiques virales est mis en place pour le diagnostic des infections à hantavirus par sérologie. Les techniques sérologiques utilisées sont d'abord l'immunofluorescence indirecte seule puis associée à l'ELISA dès 1993 (Heyman et al., 2012). L'utilisation de kits sérologiques développés en 2002-2003 permet à d'autres laboratoires d'analyse médicale de participer aux diagnostics. Tous les résultats positifs et douteux sont confirmés (ou infirmés) par le CNR. En 2011, le CNR Hantavirus est créé, il utilise les mêmes techniques sérologiques qu'il peut aussi associer à des diagnostics par biologie moléculaire (RT-PCR en temps réel ou conventionnelles). La demande de diagnostic est surtout effectuée pour des cas hospitalisés car le diagnostic de laboratoire n'est pas pris en compte par le service public de la Sécurité sociale et demeure relativement coûteux. Les infections à orthohantavirus ne font pas partie des maladies à déclaration obligatoire comme c'est le cas en Allemagne ou en Suisse. Il est donc fort probable que l'infection soit sous-diagnostiquée particulièrement pour les cas les plus bénins.

Le profil type des cas est un homme autour de 40 ans ayant eu le plus souvent un lien avec la forêt. Le virus le plus fréquent mis en évidence est PUUV. Cependant, SEOV a été incriminé assez tôt dans certaines infections en France (6 entre 1977 et 1997) (Le Guenno, 1997). Il n'est pas forcément distinguable du PUUV selon le kit diagnostic mis en œuvre par les laboratoires pour un dépistage de 1^{ère} intention (Reynes et al., 2017). Il a aussi la particularité d'être associé à un rongeur commensal de l'Homme, le rat brun (*Rattus norvegicus*) vivant dans les zones habitées voire même comme animal de compagnie. Il pourrait ainsi être sous-diagnostiqué car il serait à l'origine de contamination en dehors de la zone endémique traditionnelle et serait donc non suspecté par les médecins. Enfin, un cas d'infection à TULV pourtant réputé pas ou peu pathogène a été détecté en 2015.

b) Suivi temporel

La France métropolitaine est considérée comme un pays où l'incidence des FHSR est moyenne (Reynes, 2013). Comme pour les autres pays européens voisins (Allemagne et Belgique), le nombre de cas est variable en fonction des années (cf. figure 8) même si les très fortes hausses du nombre de cas se produisent en même temps pour les 3 pays.

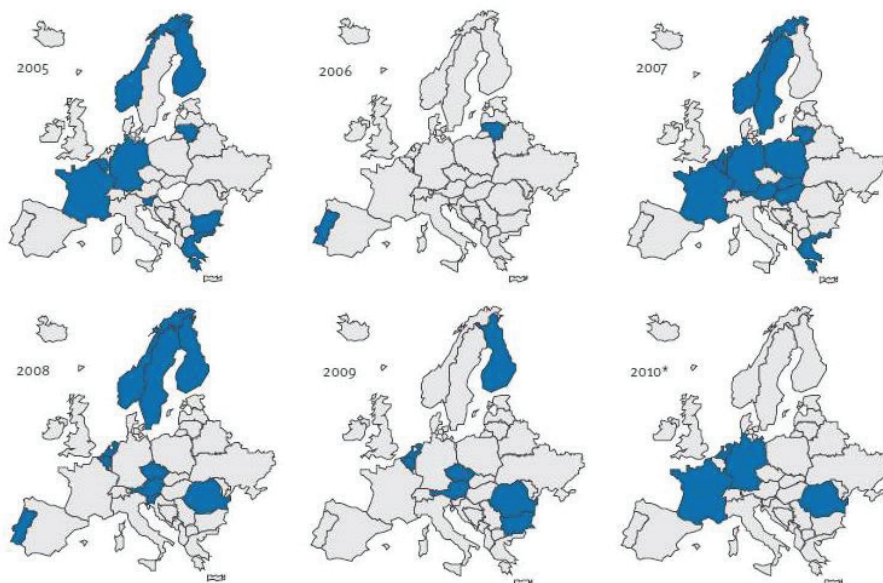


Figure 8 : Pays avec un nombre de cas augmentés (en bleu foncé) en Europe de 2005 à 2010 (d'après Heyman et al., 2011)

L'analyse de la moyenne mobile du nombre de cas annuels de NE (cf. figure 9) montre une tendance à l'augmentation avec un premier palier assez discret vers 1992 et un autre plus marqué à partir de 2005. Les augmentations du nombre de cas peuvent être dues à une réémergence de la maladie humaine mais correspondent aussi à des modifications du système de surveillance. Ainsi, la première période avant 1992 correspond à la mise en place du CNR qui n'utilisait alors qu'une seule technique : l'immunofluorescence indirecte. La deuxième période correspond à l'utilisation de deux techniques par le CNR : l'immunofluorescence indirecte et l'ELISA. La fin de la deuxième période coïncide avec l'arrivée des laboratoires médicaux spécialisés en tant qu'acteurs supplémentaires de la surveillance.

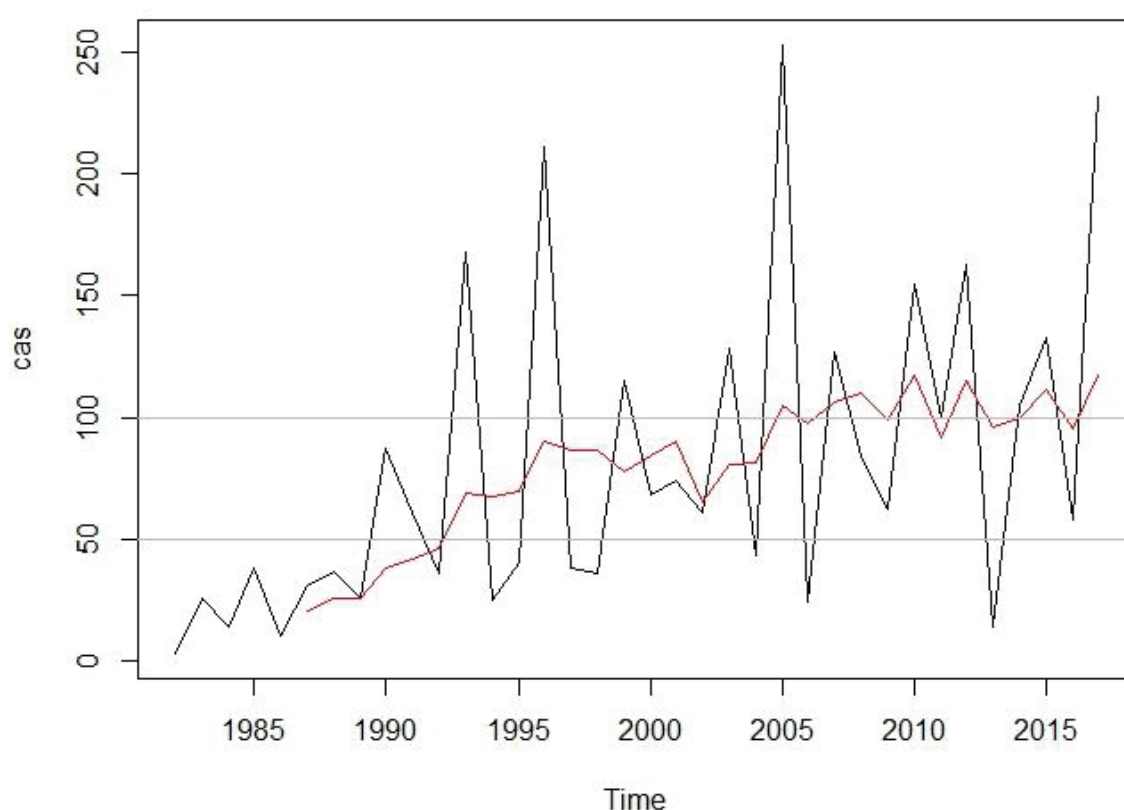


Figure 9 : Nombre de cas annuels de NE en France depuis 1982 en noir et moyenne mobile sur 6 ans en rouge

Le CNR définit les années épidémiques comme les années où le nombre de cas est supérieur de 20% à la moyenne sur 10 ans (Reynes, 2013). En découpant les 36 ans du suivi du nombre de cas en trois périodes à partir des paliers décrits auparavant, il est observé :

- 34 cas annuels sur la période de 1982 à 1992, les années épidémiques étant 1990 et 1991,
- 84 cas annuels sur la période de 1993 à 2004, les années épidémiques étant 1993, 1996, 1999 et 2003,
- 116 cas annuels sur la période de 2005 à 2017, les années épidémiques étant 2005, 2010, 2012 et 2017.

Les années épidémiques sont donc assez irrégulières en France, contrairement aux pays du Nord de l'Europe où elles se produisent tous le 3 ou 4 ans. La notion d'année épidémique n'est cependant pas forcément la même pour tous les pays. Le réseau européen ENIVD (European Network for Diagnostics of Imported Viral Diseases) dont fait partie la France distingue plusieurs niveaux d'activité des années en fonction du nombre de cas annuels de NE, en se basant sur le nombre de cas moyen sur les 10 dernières années (Heyman et al., 2011):

- activité normale, soit +/- 10% du nombre de cas moyen,
- activité modérée, soit 10 à 50% de cas en plus par rapport à la moyenne,
- activité légèrement augmentée, soit 50 à 100% de cas en plus par rapport à la moyenne,
- activité augmentée, soit plus de 100% de cas par rapport à la moyenne.

En France, les années à activité légèrement augmentée ou augmentée sont depuis le début des années 1990, les suivantes : 1991, 1993, 1996, 2003, 2005, 2010 et 2017. Ce mode de calcul donne donc moins d'années épidémiques qu'avec celui du CNR.

Ces variations interannuelles sont associées à des variations saisonnières. Les facteurs de risques environnementaux et comportementaux humains déterminent une augmentation du nombre de cas au printemps et à l'été en Europe de l'Ouest. Pour la France, le pic du nombre de cas humains se situe aux environs du mois de juin (Figure 10).

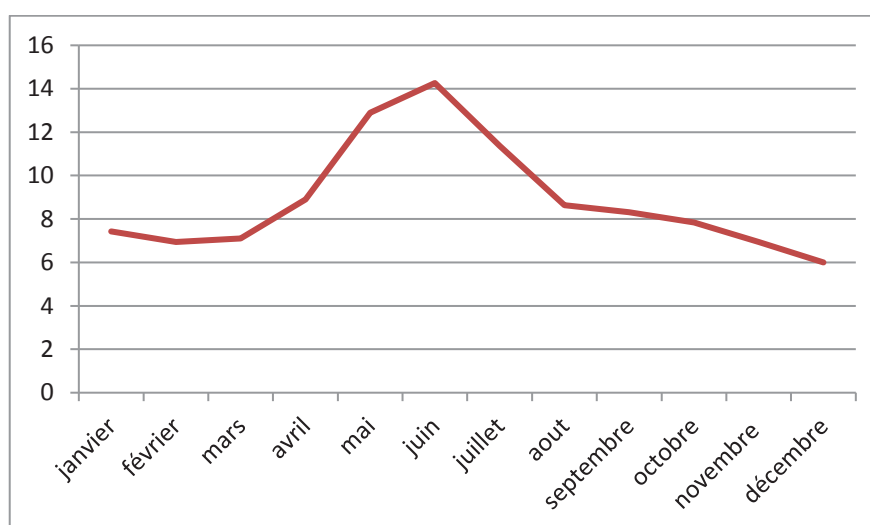


Figure 10 : Nombre moyen mensuel de cas humains de NE en France entre 1999 et 2017 à partir des rapports du CNR

Certaines années épidémiques (Figure 11) présentent cependant des profils un peu différents avec un pic préalable en janvier / février (comme en 2003 ou 2012) et une augmentation plus tardive (novembre 2007). Certains auteurs évoquent une augmentation du nombre de cas de NE durant l'automne précédant une année épidémique. C'est notamment le cas pour les années 2004, 2011 et 2014 qui précèdent des années avec de nombreux cas mais ce pattern ne s'observe pas pour toutes les années épidémiques (Figure 12).

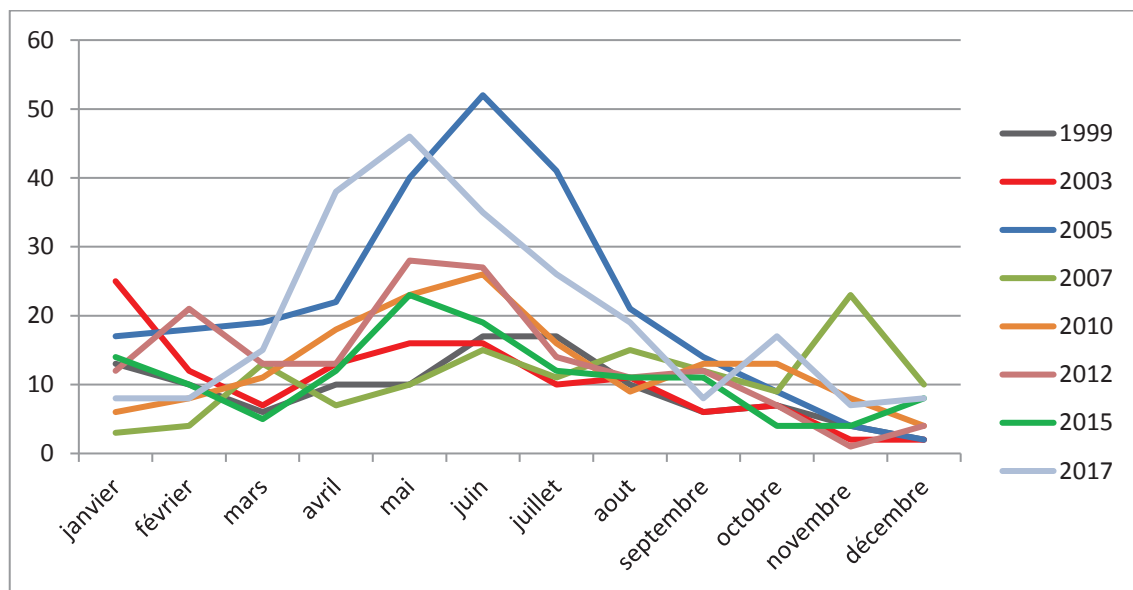


Figure 11 : Années épidémiques pour les cas de FHSR en France sur la période de 1999 à 2017 à partir des rapports du CNR

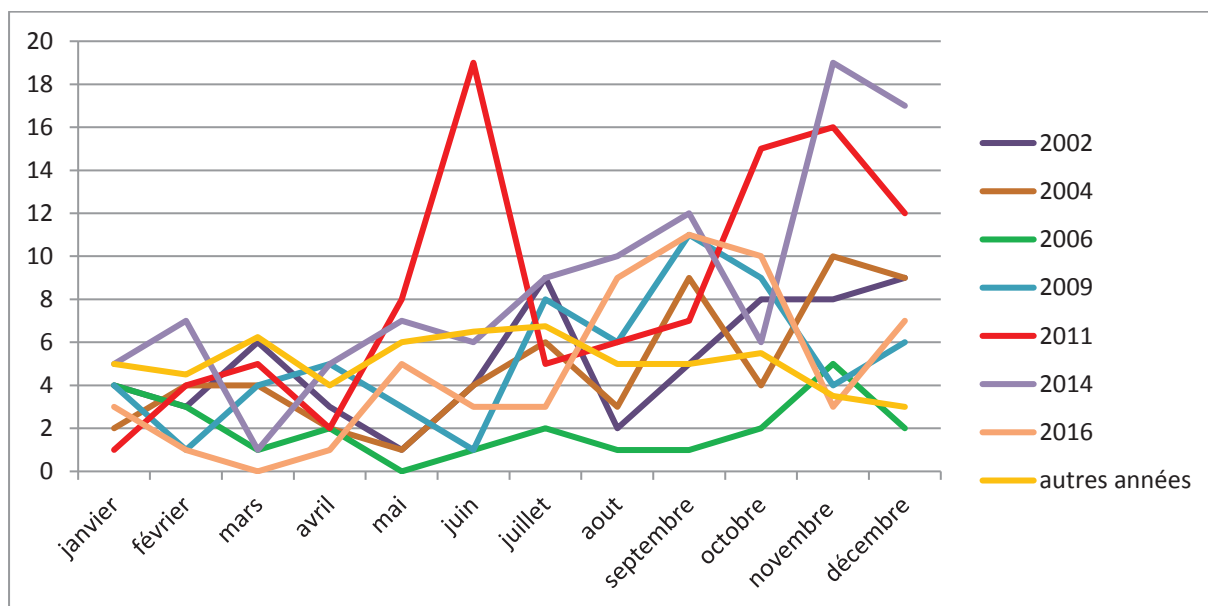


Figure 12 : Années non épidémiques pour les cas de FHSR sur la période de 1999 à 2017.

Les années précédant les années épidémiques sont individualisées, les autres (soit 2000, 2001, 2008 et 2013) sont moyennées à partir des rapports du CNR.

c) Répartition géographique

L'apparition de cas humains nécessite la présence d'une population d'hôtes infectés. Cependant, la répartition du rongeur réservoir est beaucoup plus étendue que celle des cas humains. Ainsi, le campagnol roussâtre est présent sur presque tout le territoire français (Figure 4) mais la zone d'endémie de cas de FHSR à PUUV se limite au quart Nord-Est de la France. De la même manière,

même si le mulot rayé est présent sur une bonne partie du territoire français (figure 13), aucun cas autochtone de FHSR à DOBV n'a été recensé en France.



Figure 13 : Aire de répartition du mulot à collier (*Apodemus flavicollis*) en Europe (carte de l'IUCN)

Pour les cas de FHSR à PUUV en France, il a été montré que la présence de rongeurs infectés ne signifie pas non plus la présence de cas humains. C'est le cas du Loiret, hors zone d'endémie où la séroprévalence des rongeurs a atteint 17,2% entre juin 2008 et juillet 2010 (Castel et al., 2015). Aucun cas humain n'a été diagnostiqué ces mêmes années, le seul cas connu datant de 2014 (rapport CNR).

La zone d'endémie des cas humains en France est le quart Nord-Est (Figure 14). Au sein de cette zone, plusieurs foyers ont été identifiés parmi lesquels certains sont plus actifs en nombre de cas. Le foyer le plus important est celui centré sur les départements des Ardennes et de l'Aisne et débordant sur l'Oise, le Nord, la Marne et la Meuse. Le second foyer est celui centré sur le Doubs et le Jura. Selon les années, les cas par département sont plus ou moins nombreux mais le premier foyer inclut environ la moitié des cas. Ce foyer constitue le foyer historique (Ilef et al., 1999) et même si son intensité varie, son étendue géographique est globalement fixe dans le temps (Figure 14). Au contraire, le foyer situé dans le Doubs et le Jura semble s'être élargi à partir de 2005 vers le sud du Jura (Heyman et al., 2007).

D'autres zones géographiques ont connu des évolutions du nombre de cas depuis la déclaration du premier cas français en 1982. Ainsi, le foyer Lorrain, localisé plus particulièrement autour de Nancy, a été cité comme un foyer actif jusqu'en 2003 puis simplement comme faisant partie de la zone d'endémie après cette date (Le Guenno, 1997 ; Penalba et al., 2001 ; Zeller et al., 2003). Des cas se produisent sporadiquement hors de la zone d'endémie classique (rapports du CNR). Ils sont

généralement situés dans les départements frontaliers de la zone d'endémie : Haute-Savoie en 1984, Savoie en 2007 et en 2015, Ain en 2008, Loiret en 2014 et Loir-et-Cher en 2017. Toutefois, un premier cas a été diagnostiqué en Isère en 2015 et quatre en 2017, ce qui suggère un déplacement de la zone d'endémie vers le sud.

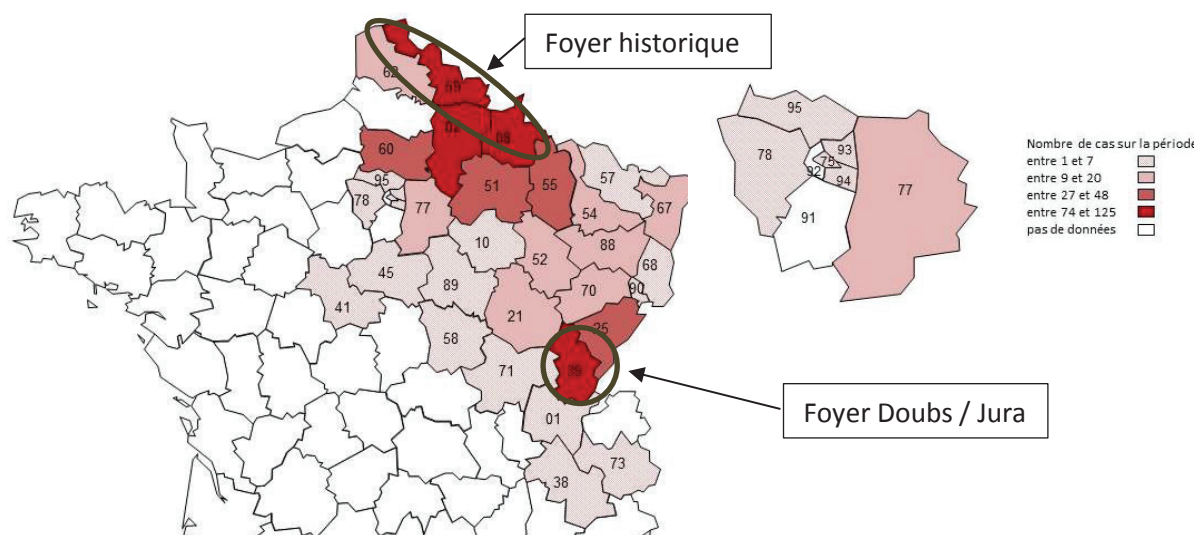


Figure 14 : Nombre de cas de NE cumulés par département entre 2012 et 2017 (données CNR)

5) Problématiques et axes de recherche

En France, les cas humains de NE se situent dans le quart Nord-Est. Le suivi des cas a montré que leur répartition dans le temps et dans l'espace n'est pas homogène au sein de cette zone. Ainsi, le département des Ardennes inclut des foyers humains très actifs, alors que d'autres zones comme l'Alsace, présentent un nombre de cas humains bien moins élevé (rapports annuels du CNR).

Pour une maladie humaine dont le réservoir est animal, la disparité spatiale du nombre de cas humains peut être due à la répartition de l'espèce réservoir. Cependant, en ce qui concerne le nombre de cas de NE, le réservoir, *Myodes glareolus*, est présent et commun sur l'ensemble de la zone d'endémie. D'autres facteurs doivent donc expliquer cette différence de répartition au sein de cette zone.

L'objectif général de cette thèse est de mieux comprendre les facteurs qui pourraient permettre d'expliquer cette différence en comparant une zone de faible endémie qu'est l'Alsace et une zone de forte endémie bien connue que sont les Ardennes.

L'infection de l'Homme se fait par une exposition à un environnement suffisamment contaminé par le virus. Le niveau de contamination environnemental est le résultat de l'excrétion du virus par les rongeurs infectés et va donc varier en fonction du niveau d'excrétion individuelle de chaque animal infecté et du nombre de rongeurs excréteurs présents. Une des premières pistes de travail a donc été la description dans le temps et dans l'espace de l'infection des rongeurs à PUUV dans une zone de faible endémie comme l'Alsace. L'évolution de la séroprévalence suivie sur plusieurs années au sein du site de capture permet d'estimer l'importance de la contamination virale et de vérifier le lien entre

risque humain et importance du nombre de rongeurs infectés. Ce nombre de rongeurs potentiellement excréteurs a été suivi en lien avec leur dynamique de population car il peut être supposé que le nombre de rongeurs infectés va augmenter avec la densité de population.

Outre le nombre de rongeurs infectés, l'importance de la contamination environnementale est aussi dépendante du niveau d'excrétion virale par chaque rongeur infecté. Or, les caractéristiques de l'infection dont l'importance et la durée de l'excrétion est intimement liée à l'interaction entre l'hôte et le virus. La deuxième piste de travail a donc été d'étudier la microévolution du virus de plusieurs sites géographiques dans les Ardennes. Cette microévolution virale a été considérée en fonction des caractéristiques des populations de rongeurs infectés. L'hypothèse était que si l'interaction entre un type de virus et de rongeurs dataient, les rongeurs avaient développé des stratégies pour contrôler l'infection et potentiellement limiter l'excrétion. Les caractéristiques étudiées de la population ont donc été celles liées au renouvellement des individus au sein de la population.

Enfin, le troisième volet de ce travail a été de considérer l'environnement qui va impacter la population de campagnols et la survie du virus agissant sur la dynamique de transmission et le maintien du PUUV dans l'espèce réservoir. Dans un premier temps, une revue exhaustive de la bibliographie a été réalisée pour établir les liens entre climat, disponibilité alimentaire, infection des campagnols roussâtres et nombre de cas de NE en Europe. Cette revue a permis d'identifier les indicateurs approximant le climat et la disponibilité alimentaire, les différents biais liés à ces indicateurs et les différents modèles statistiques applicables. Dans un second temps, des données sérologiques issues d'un suivi sur 10 ans par capture-marquage-recapture multi-sites de populations de rongeurs ont été analysées à l'aide de modèles statistiques pour examiner l'influence de différents facteurs de risque d'infection. L'étude a comparé deux indicateurs alternatifs de l'infection des rongeurs : la séroprévalence, qui est communément utilisée et qui permettrait de comparer nos résultats à ceux de précédentes évaluations et le taux d'incidence qui est un indicateur bien plus sensible du moment de l'infection du rongeur. L'hypothèse de travail était que cette précision quant au moment de l'infection apporterait une plus grande capacité de détection des facteurs environnementaux influençant la survenue de l'infection des rongeurs.

Partie expérimentale

Chapitre 1 - Contribution à l'épidémiologie descriptive des orthohantavirus des rongeurs en France, cas de l'Alsace, zone de faible endémie.

La surveillance des cas humains d'infection par PUUV par le CNR et son réseau de laboratoires partenaires a mis en évidence une hétérogénéité dans la distribution des cas au sein de la zone d'endémie située dans le quart Nord-Est de la France (Augot et al., 2006). Les campagnols roussâtres (*Myodes glareolus*), qui sont le réservoir du virus, sont pourtant communs sur toute cette zone. Cette dissymétrie entre la répartition spatiale des cas humains de NE et celle du réservoir hôte suggère que la présence de populations de campagnols infectés seule ne suffit pas à expliquer cette distribution.

De nombreuses études se sont intéressées à l'épidémiologie de l'infection à PUUV chez les rongeurs et aux facteurs de risques humains dans les Ardennes et le Jura où l'incidence humaine est particulièrement élevée (Augot et al., 2008 ; Dubois et al., 2018). Par contre, peu d'études ont investigué l'épidémiologie de ce virus au sein du réservoir dans les zones d'endémie où les cas humains sont peu nombreux. Le premier volet de cette thèse a visé à explorer l'épidémiologie de l'infection des campagnols par PUUV en Alsace, région de faible endémie d'infections humaines et a été décliné en trois objectifs.

Le premier objectif était d'évaluer si le faible nombre de cas humains dans cette zone était lié à une plus faible prévalence de l'infection par PUUV dans les populations de rongeurs. Pour répondre à cette question, nous avons conduit une étude longitudinale de données de séroprévalence au sein d'une population de rongeurs suivi par capture-marquage-recapture pendant 6 années.

Dans un second temps, afin de mieux comprendre les mécanismes conduisant à la séroprévalence mise en évidence dans ce suivi longitudinal, le deuxième objectif a été d'étudier les modalités de transmission entre rongeurs grâce une analyse spatiale des mouvements des rongeurs.

Enfin, la sensibilité des rongeurs à l'infection peut varier en fonction du variant du PUUV (Guivier et al. 2010b). De même, la génétique du virus influence la sensibilité de l'Homme et l'expression clinique de l'infection (Plyusnina et al., 2012). Le 3ème objectif était donc de voir si la génétique virale pouvait expliquer les valeurs de séroprévalence mise en évidence chez les rongeurs et le faible nombre de cas de NE dans cette région. Cet objectif a été mis en œuvre par une analyse phylogénétique des séquences virales du segment S amplifiées à partir des sérums des rongeurs séropositifs de notre site d'étude et des séquences de PUUV de l'ensemble des régions voisines de l'Alsace. L'Alsace est en effet, une région située entre le Jura au Sud et les Ardennes à l'Ouest, zones de forte endémie de cas humains (Heymann et al., 2012 ; Sauvage et al., 2002). Au Nord dans la région du Palatinat en Allemagne, la situation est assez comparable à l'Alsace avec un faible nombre de cas humains. A l'est, de l'autre côté du Rhin, le Baden-Württemberg présente une répartition spatiale hétérogène des cas de NE (Ulrich et al., 2008 ; Reil et al., 2015). Cette situation de carrefour géographique fait de l'Alsace le lieu privilégié pour cette étude phylogénétique.

Afin de répondre à ces trois objectifs, la population de rongeurs de Murbach a été suivie par capture-marquage-recapture sur la période 2012-2017 sur un site de capture de plus de 3 hectares. Le protocole est décrit en détail dans Monchâtre-Leroy et al., 2018. Brièvement, chaque année, les captures ont été réalisées à l'aide de 196 pièges répartis de façon régulière (en grille). Le piégeage était effectué cinq fois par an (en avril, juin, juillet, septembre et octobre) au cours de 3 nuits consécutives. Pour chaque individu capturé, il y a eu identification par transpondeur, détermination de son sexe et de son espèce, pesée, prélèvement sanguin et relevé de la position du piège de capture. Le statut sérologique a été déterminé par un test ELISA spécifique de PUUV et les séquences du segment S du virus ont été obtenues par PCR nichée. Ce suivi sur 6 ans a permis de prendre en compte presque 2 cycles complets de densité de rongeurs.

La séroprévalence dans la population de campagnols au cours de 2012, 2015, 2016 et 2017 était respectivement de 3,6 % [intervalle de confiance à 95% : 1,8 ; 6,9], 4,0 % [2,2 ; 7,2], 7,1 % [1,3 ; 31,5] et 3,5 % [1,7 ; 7,1]. Il n'y a pas eu d'individu séropositif capturé en 2013 et 2014. Les rongeurs séropositifs ont été retrouvés préférentiellement les années où l'abondance de rongeurs, approximée par le nombre d'individus capturés, était plus importante. Cependant, notre étude révèle que cela n'est pas toujours le cas comme en 2016 (14 individus capturés et un individu séropositif). Ces résultats suggèrent qu'en Alsace, zone de faible endémie humaine, la séroprévalence des rongeurs est faible par rapport au zone de forte endémie humaine où des séroprévalences jusqu'à 29,7 % ont été observés certaines années (Castel et al., 2015).

L'analyse spatiale a montré que les individus séropositifs étaient regroupés autour de certains pièges et que leurs déplacements étaient peu nombreux et de faible distance en comparaison de ceux de l'autre espèce de rongeur présente sur le site, le mulot à collier (*Apodemus flavicollis*). Les caractéristiques de répartition spatiale et de déplacement ne semblent pas liées au statut de séropositivité des campagnols puisque la répartition spatiale hétérogène et les faibles mouvements sont aussi retrouvés chez les campagnols séronégatifs. A une toute petite échelle spatiale qui est celle des rongeurs, la contamination semble se faire de proche en proche à partir d'un individu positif. Cela se traduit par une forte hétérogénéité de la distribution spatiale des rongeurs positifs ; ainsi, dans la partie sud-est du site de capture, aucun individu séropositif n'a été capturé quelle que soit l'année. En 2016, cette contamination d'individu à individu ne s'est pas produite en raison, potentiellement, du nombre d'individus capturés très faible par rapport aux autres années rendant la probabilité de contamination faible.

La séquence du segment S du PUUV amplifiée à partir des virus isolés chez les individus positifs est très conservée quelle que soit l'année considérée. Seules trois mutations non silencieuses dans la zone codante ont été mises en évidence. L'analyse phylogénétique a révélé que les séquences alsaciennes appartenaient à la lignée « Central European » (CE). Au sein des séquences françaises, la séquence de la population de rongeurs alsaciens forme un groupe avec les séquences du Jura et de l'Aube, distinct des séquences ardennaises d'une part et des séquences du Loiret d'autre part. Aucune proximité phylogénétique n'a été retrouvée avec les séquences du Baden-Württemberg, ce qui confirme le rôle de barrière infranchissable du Rhin pour les rongeurs. L'absence de séquence de PUUV issue de la région du Palatinat, en continuité avec l'Alsace, a rendu impossible l'étude du lien phylogénétique potentiel des virus de ces deux régions. L'analyse phylogénétique n'a pas révélé de distinction entre les séquences issues de régions de faible endémicité et de celles issues de régions de forte endémicité.

Publication 1 :

Les résultats de l'étude ont été publiés dans la revue « Zoonoses and Public Health »

Monchatre-Leroy E., Murri S., Castel G., Calavas D., Boué F., Hénau V. and Marianneau P. First insights of PUUV circulation in a rodent population in Alsace, France. *Zoonoses and public health* 2018; 1-12.

Article 1

**First insights into Puumala
orthohantavirus in a rodent
population in Alsace, France**

First insights into Puumala orthohantavirus circulation in a rodent population in Alsace, France

Authors

E. Monchatre-Leroy¹, S. Murri², G. Castel³, D. Calavas⁴, F. Boué¹, V. Hénau⁴, P. Marianneau².

¹ ANSES, Laboratoire de la rage et de la faune sauvage, Nancy, 54220, France

² ANSES, Unité de virologie, Laboratoire de Lyon, Lyon, 69364, France

³ CBGP, INRA, CIRAD, IRD, 34000 Montpellier SupAgro, Univ Montpellier, Montpellier, France

⁴ ANSES, Unité d'épidémiologie, Laboratoire de Lyon, Lyon, 69364, France

Correspondence

E. Monchatre-Leroy - ANSES, Laboratoire de la rage et de la faune sauvage

CS 40009 - Domaine de Pixérécourt - 54220 Malzéville, France

Tel.: +33 3 83 29 89 50

Fax: +33 3 83 29 89 58

E-mail: elodie.monchatre-leroy@anses.fr

Keywords: Puumala virus, behavior, population dynamics of reservoir host, genetic diversity

Word count: 189 words for abstract, 4285 words for manuscript and 117 words for impacts

Impacts

- Puumala virus (PUUV), the most prevalent orthohantavirus in Western Europe, causes a mild form of hemorrhagic fever with renal syndrome in humans. Human infection occurs through inhalation of aerosolized excreta of infected bank voles, the reservoir of the virus.
- This four-year study explores the epidemiology of PUUV in the bank vole population in Alsace, a French region where human cases have occurred, but for which there are no studies on this reservoir host.

- The spatial and temporal distribution of seropositive rodents was heterogeneous, showing spatially clustered seropositive animals, likely due to their limited movements. The similarity of PUUV sequences from Alsace over the four years of the study suggests that the virus persists in the rodent population.

Abstract

In-depth knowledge on the mechanisms that maintain infection by a zoonotic pathogen in an animal reservoir is the key to predicting and preventing transmission to humans. The Puumala orthohantavirus (PUUV), the most prevalent orthohantavirus in Western Europe, causes a mild form of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in humans. In France, this endemic illness affects the northeastern part of the country.

We conducted a four-year capture-mark-recapture study in a bank vole population, combined with molecular analyses, to explore the epidemiological situation of PUUV in Alsace, a French region where human cases have occurred, but for which no studies have been conducted on this reservoir host.

PUUV-infected bank voles were detected in the two years that showed high bank vole density with a prevalence of 4%. The individual PUUV sequences identified in this study were similar from year to year and similar to other French sequences. On a very small spatial scale, the distribution of seropositive bank voles was very heterogeneous in time and space. The short distances traveled on average by bank voles resulted in spatial clusters of seropositive rodents, which spread only very gradually throughout the year.

Introduction

In Western Europe, the most prevalent orthohantavirus that is pathogenic for humans is the Puumala orthohantavirus (PUUV) (Heyman et al., 2011). PUUV infection in humans occurs indirectly, through inhalation of aerosolized excreta of infected bank voles (*Myodes glareolus*), and shows a wide spectrum of clinical severity, ranging from asymptomatic or mild, unspecific flu-like illnesses to lethal infections. Most cases of human infection are manifested by a mild form of hemorrhagic fever with renal syndrome

(HFRS) called nephropathia epidemica (NE). Bank voles have been identified as the main reservoir host for PUUV. Spillovers to other rodent species that live close to bank vole populations have already been described, including the wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) (Dobly et al., 2012; Heyman et al., 2009) or the yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*) (Essbauer et al., 2006). Field studies (Bernshtein et al., 1999; Kallio et al., 2006a; Niklasson et al., 1995) as well as experimental infections (Kallio et al., 2006b) strongly suggest that PUUV is transmitted only horizontally in the bank vole population. Horizontal transmission can occur by direct contact among individuals. Several types of behavior enhance the probability of infection, such as reproduction (Bernshtein et al., 1999; Tersago et al., 2008), inter-individual aggression (Escutenaire et al., 2002), and dispersal of young adults (Deter et al., 2008). Transmission can also be indirect (Kallio et al., 2006b; Sauvage et al., 2003) through the contamination of the environment by infected feces and urine. The relative importance of indirect contamination depends on environmental conditions that can influence virus survival (Kallio et al., 2006b).

Understanding the epidemiology of PUUV infection in bank voles is essential for predicting the risk for humans (Haredasht et al., 2013; Tersago et al., 2011). The epidemiology of PUUV in the host population is regulated by several environmental factors, including habitat conditions, food availability, and climate, which all influence the dynamics and distribution of the host population (Monchatre-Leroy et al., 2016). The nature and extent of these effects depend on geographical and temporal scales (Monchatre-Leroy et al., 2016). Moreover, intrinsic factors, such as bank vole behavior (Escutenaire et al., 2002), movements (Deter et al., 2008), or genetics (Charbonnel et al., 2014; Guivier et al., 2010; Drewes et al., 2017), affect PUUV transmission among rodents, with consequences for the incidence of human cases. Lastly, climate and/or soil composition may affect virus survival outside the host (Sauvage et al., 2003).

Although bank voles are widely distributed across Western Europe, human NE cases occur mainly in an area encompassing northeastern France (Augot et al., 2006), the Netherlands, Belgium, Luxembourg and the western half of Germany (Heyman et al. 2011). The incidence of NE cases is not homogeneous,

suggesting that the presence of an infected reservoir cannot solely explain the occurrence of human cases. In addition to the above-cited factors affecting rodent prevalence, it has been shown that NE epidemiology is altered by human behavior as well as human and/or viral genetics (Charbonnel et al., 2014; Heyman et al., 2012; Olson et al., 2010; Reusken et al., 2013). Accordingly, genetic polymorphism (especially in the coding region of the main antigenic domain of the nucleocapsid protein (N protein)) between isolates from NE endemic and peri-endemic regions likely plays a role in the pathogenicity level in humans and may explain in part the heterogeneous distribution of human cases (Castel et al., 2015). Furthermore, phylogenetic studies have demonstrated that the strains detected in France, Germany and Belgium belong to the Central European (CE) PUUV lineage. In particular, genetic similarity is high between French sequences from Ardennes and sequences from southern Belgium (Castel et al., 2015), whereas sequences from other parts of France cluster together in another French (sub)lineage.

Here, we focused on Alsace, a region located in northeastern France, east of Jura and Ardennes, two French *départements* (Fig. 1) with high human incidence (Heyman et al., 2012; Sauvage et al., 2002). In addition, it shares a border with the German Baden-Württemberg region, where NE cases have been reported (Reil et al., 2015; Ulrich et al., 2008). Despite the occurrence of human cases in Alsace (CNR Report, 2016), no study has assessed the epidemiological situation in rodent reservoir populations. Therefore, first, we assessed PUUV epidemiology in a bank vole population in Alsace. We monitored PUUV seroprevalence over a four-year period, analyzed seroprevalence and host abundance patterns, and determined the effect of rodent movements on PUUV epidemiology. Second, we sequenced and analyzed the S segment of the PUUV strains in Alsace and compared them with strains from neighboring regions in France, Belgium and Germany. Alsace is ideally situated to provide detailed information on the phylogenetic relationship between the different PUUV sublineages that are found among neighboring regions.

Methods

Study site and field trapping data

The study site was located in the south of Alsace (47°55'N, 7°08'E). Rodent trapping was conducted for four consecutive years (2012 to 2015) with five trapping sessions each year: in April, June, July, September, and October. The trapping grid was based on 196 live traps (14 X 14 Ugglan Live Trap) spaced at 12.5 m intervals, covering a surface of more than 3 ha. For each session, traps were set for three consecutive nights and were baited with pieces of carrot and sunflower seeds. Trapped rodents were individually marked with a microchip (model Vétérisimo Mini RWI-I, Vethica, France) and released at their original site of capture after collecting a blood sample from the retro-orbital sinus. Blood was stored at 4°C before dispatch to the laboratory. All rodents were weighed and sexed.

The species of each rodent was determined visually except for the *A. flavicollis* individual found seropositive in 2012. The molecular confirmation of its species was carried out on blood cells obtained after centrifugation. After DNA extraction by using the iPreppurification kit (Invitrogen, iPrep ChargeSwitch gDNATissue Kit), PCR was performed using universal primers BatL5310 and R6036R from the 5'-proximal 680 bp portion of subunit I of the cytochrome oxidase gene (Hebert et al., 2003; Robins et al., 2007). PCR amplicons were sequenced by a private company (Genewizz) and the nucleotide sequences were aligned using the Vector NTI software program (Invitrogen). Species identification was obtained by comparison with sequences available in GenBank using the BLASTn program (expected threshold = 10). The sequence selected for comparison with the obtained sequence showed an identity of 99%. The experimental protocol, complied with the EU Directive 2010/63/EU and was submitted to and approved by the French Ministry of Research (Apafis no. 2015120215112678).

Figure 1. *Départements* (in grey) and regions boxed in northeastern France showing the study site (●).



Serological and molecular analyses

Serum samples were screened for PUUV using an immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on plates coated with recombinant PUUV N proteins (Castel et al., 2015). The detection of PUUV-reactive antibodies in bank voles may indicate a persistent infection or may be due to passive transfer of maternal antibodies. Several factors were considered to discriminate seropositive rodents with maternal antibodies from those with infection:

- Capture weight comparable to that of an adult (i.e. >20 g);
- Positive molecular test (see below RT-qPCR);
- ELISA results on sequential captures:

- First sample negative and second sample positive: incident infection;
- First sample positive and second sample positive:
 - time lag of more than 80 days, i.e timespan of maternal antibody persistence;
 - time lag of less than 80 days with no decrease in antibody titer.

All seropositive rodents had to fulfill at least one criterion to be considered as seropositive. Confidence intervals for seroprevalence were estimated using the Wilson method (Brown et al. 2001) in the EpiTools calculator (Ausvet, 2017).

PUUV RNA was extracted from sera of positive bank voles using the QIAcube system (Qiagen, France) following the manufacturer's recommendations. Quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) was performed using the SuperScript III One-Step RT-PCR with Platinum Taq High Fidelity. The S segment was amplified by reverse transcription PCR using the Titan One Tube RT-PCR Kit and nested PCR with Taq polymerase. Amplicons were purified from agarose gels and sequenced using the Sanger method. Sequence primers are shown in Table 1. Four sequences of the PUUV S segment of this study in Alsace were deposited in GenBank (accession numbers KY365000, KY365001, KY365002 and KY365003).

The phylogenetic tree (Fig. 3) was calculated from sequences extracted from GenBank (listed in Fig. 3). Sequence alignments were performed in SEAVIEW v4.4.2. Phylogenetic construction using maximum likelihood was done in PhyML v3.0. with 100 bootstrap replicates of the original alignments, using the Muju virus DQ138133 and the Hokkaido virus AB675450 as outgroups. The GTR+G+I (General Time Reversible) substitution model was selected as the optimal model by the SMS (Smart Model Selection) program (Lefort et al., 2017) available on the ATGC platform webserver (<http://www.atgc-montpellier.fr/>) with the transition/transversion ratio set to 4 (estimate of I = 0.376) and with a discrete gamma distribution for rate heterogeneity (estimated gamma shape parameter = 0.406). For better readability, sequences belonging to the Alpes-Adrian (ALAD), Danish (DAN), south Scandinavian (S-SCA), Finnish (FIN), Russian (RUS), Latvian and north Scandinavian (N-SCA) lineages were collapsed

on the phylogenetic tree and only the lineage names are shown. Sequences from Belgium, France and Germany (which belong to the CE lineage) were identified by country.

Table 1: Sequences of primers and probes and cycling conditions of quantitative and nested reverse transcription PCR (RT-PCR).

Method	Primer and probe name and sequence (5' to 3')	Cycling steps	Temperature (°C)	Time	Number of cycles
Quantitative RT-PCR	Primer PUU R CCKGGACACAYCATCTGCCAT	Reverse transcription	50	30 minutes	1
	Primer PUU F GARRTGGACCCRGATGACGTTAA	Hot Start activation	95	10 minutes	1
	Probe PUU 1 CAACAGACAGTGTCTCAGCA	Denaturation	95	15 seconds	45
	Probe PUU 2 CAACARACAGTGTCTCAGCA	Annealing /Extension	60	60 seconds	45
		Cooling	40	30 seconds	1
		Reverse transcription	44	30 minutes	1
	Primer Puu1F1 CCTTGAAAAGCTACTACGAG	Denaturation	94	2 minutes	40
RT-PCR	Primer Puu1R1 CCTTGAAAAGCAATCAAGAA	Annealing	50	60 seconds	40
		Extension	68	2 minutes	40
		Final extension	68	7 minutes	1
Nested-PCR	Fragment 1 Primers Puu1F1/ Puu1R17 CCTTGAAAAGCTACTACGAG / ACCCGATGACTCCCATCAC	Initial denaturation	94	2 minutes	1
	Fragment 2 Primer Puu1F2A1/Puu1R5A1 TAAGGGGACTCGTATTCGG / CATCACCAGATGAAAGTGATCT	Denaturation	94	1 minute	40
		Annealing	50	60 seconds	40
	Fragment 3 Primer Puu1F25/Puu1R1 CTGTTGGCACAGCTGAAG / CCTTGAAAAGCAATCAAGAA	Extension	68	2 minutes	40
		Final extension	768	17 minutes	1

Spatial autocorrelation

Moran's *I* statistic was calculated in the statistical software R (package spdep). Moran's *I* quantifies the similarity of an outcome variable (here the number of seropositive bank voles) among spatially related areas and is defined as follows (Bivand, 2017):

$$I = \frac{n}{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n w_{ij}} \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n w_{ij} (x_i - \bar{x})(x_j - \bar{x})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

where x_i is the i^{th} observation, $\bar{x}$ is the mean of the variable of interest (here the number of seropositive bank voles) and w_{ij} is the spatial weight of the link between i and j . The spatial weight matrix W was calculated in R using the function “dnearneigh” that identifies the distance between neighbors (traps) from their coordinates on a grid. The null hypothesis used for testing the presence of spatial autocorrelation was that the observed seropositive bank voles were randomly distributed in the trap grid. The alternative hypothesis tested was two-sided. A statistically significant positive Moran’s index indicates that traps with seropositive bank voles are clustered in space.

Inter-trap movement

Each trap was identified by a unique identification (ID) number throughout the study and recorded for each capture. For each rodent, the minimum distance moved between two trapping sessions was calculated as the straight-line distance between the two traps where the rodent was captured (Gurnell et al., 1989; Rajaska, 2000; Tomich, 1970). Rodents trapped only once or several times, but not in two successive sessions were excluded. When a rodent was captured in the same trap as the previous capture, a zero value was recorded for the distance. The mean distance covered between two successive sessions was calculated as the ratio of the sum of the distances of all rodents to the number of rodents.

Results

1. Rodent populations and seroprevalence

Between 2012 and 2015, the two main species found at the study site were bank voles and yellow-necked mice (Table 2). The number of rodents belonging to these two species varied markedly across years at the study site. The bank vole population peaked in 2012 and 2015 with 223 and 251 trapped individuals, respectively, and collapsed in 2013 and 2014 with 9 and 21 trapped individuals, respectively. The same pattern was observed for the population of yellow-necked mice, although the

variation was less pronounced (Table 2). In addition, two field voles (*Microtus agrestis*) were trapped in 2012 and 2015 (1 each year) and two shrews (*Sorex* sp.) in 2015.

Positive bank voles were found only in 2012 and 2015. PUUV seroprevalence in bank voles was 3.6% [95% confidence interval: 1.8; 6.9] in 2012, 4.0% [2.2; 7.2] in 2015 and nil in 2013 and 2014 (Table 2). One yellow-necked mouse (species confirmed by molecular biology) was seropositive in 2012, which was the year with the highest proportion of yellow-necked mice in the overall rodent population (chi-square (X^2) test between proportions of yellow-necked mice in 2012 and 2015 significant at $p < 0.001$) (Table 2).

Table 2. Number of trapped individuals and PUUV seroprevalence in bank voles and yellow-necked mice in each study year and during each trapping session.

	Bank voles		Yellow-necked mice	
	Number of individuals (% of voles among rodents [95% CI] ^a)	Number of seropositive individuals (% of positive animals [95% CI])	Number of individuals (% of mice among rodents [95% CI])	Number of seropositive individuals (% of positive animals [95% CI])
2012	223 (53.6 [48.8; 58.3])	8 (3.6 [1.8; 6.9])	193 (46.4 [41.7 ; 51.2])	1 (0.5 [0.1 ; 2.9])
April	65	0	26	0
June	140	6 ^b	137	0
July	107	3	101	0
September	57	5	21	1
October	36	1	6	0
2013	9 (28.1 [15.6 ; 45.4])	0 (0.0 [0.0 ; 29.9])	23 (71.9 [54.6 ; 84.4])	0 (0.0 [0.0 ; 14.3])
April	4	0	12	0
June	1	0	5	0
July	2	0	4	0
September	2	0	6	0
October	1	0	1	0
2014	21 (26.9 [18.3 ; 37.7])	0 (0.0 [0.0 ; 15.5])	57 (73.1 [62.3 ; 81.7])	0 (0.0 [0.0 ; 6.3])
April	1	0	6	0
June	7	0	24	0
July	16	0	34	0
September	5	0	4	0
October	6	0	4	0
2015	251 (69.9[65.0 ; 74.4])	10 (4.0 [2.2 ; 7.2])	108 (30.1 [25.6 ; 35.0])	0 (0.0 [0.0 ; 3.4])
April	86	1 ^b	40	0
June	114	4 ^b	63	0
July	109	7	50	0
September	105	2	12	0

October	62	4	5	0
---------	----	---	---	---

^a 95% confidence interval

^b sequences of the PUUV S segment were obtained from one of these samples

2. Movement of rodents and seroprevalence

Inter-trap movements

Bank voles moved less ($X^2 = 8.11$, $p < 0.01$) and at shorter distances than mice (unequal variance t -test, $p < 0.01$) (Table 3). The low number of seropositive bank voles prevented the comparison of the movement patterns between seropositive and seronegative bank voles.

Table 3. Comparison of inter-trap movements according to species and seropositivity.

	Total number of movements	Mean distance moved in meters (SD)	Number of animals recaptured in the same trap (% [CI 95%])
Seropositive bank voles	24	19.12 (23.51)	8 (25.0 [13.3 ; 42.1])
Seronegative bank voles	357	17.00 (21.80)	109 (23.4 [19.8 ; 24.4])
Bank voles	396	18.37 (23.15)	118 (23.0 [19.5; 26.8])
Yellow-necked mice	174	25.10 (30.31)	32 (15.5 [11.2; 21.1])

Spatial clustering

The study of inter-trap movements highlighted clusters in the distribution of bank voles in 2012 ($I = 0.21$, $p < 0.001$) and in 2015 ($I = 0.16$, $p = 0.0095$). These spatial clusters were also found for seropositive bank voles in 2015 (global Moran Index: $I = 0.18$, $p < 0.001$), but not in 2012 ($I = 0.02$, $p = 0.29$) (Fig. 2). In 2012, no seropositive rodent was detected during the first trapping session (i.e. in April). During session 2 (i.e. in June), five seropositive bank voles were found in the northern part of the study site, in an area defined by an open grid of 4×8 traps (5000 m²) and one seropositive rodent was detected in the southern part, at a distance of 106 m from the closest trap with a seropositive rodent (Fig. 2). During sessions 3 to 5, the previously captured rodents along with three new seropositive rodents were detected in traps close by (between 12.5 and 45 m from previous locations of seropositive rodents). In 2015, one rodent was found seropositive during session 1 in the southern part of the trapping area (Fig. 2). During session 2, the previously captured rodent and a new seropositive rodent was detected in the same trap as

session 1, in an adjacent trap and in a trap located at about 98 m away (Fig. 2). During sessions 3 to 5, new seropositive individuals were captured in the same traps and in traps located between 38 and 63 m from the previous locations, resulting in one cluster of 2×8 traps (2500 m²).

3. Genetic diversity

Complete sequences of the PUUV S segment were recovered from samples of positive bank voles in Alsace in 2012 (one sample, GenBank no. KY365000) and in 2015 (three samples, GenBank nos. KY365001, KY365002 and KY365003). Phylogenetic analyses (Fig. 3) on the coding region (N protein) revealed that PUUV sequences from Alsace belonged to the CE lineage as did the other French sequences. The sequences from Alsace clustered with the sequences from the *Aube département* (Troyes) and the *Jura département* in one sublineage. The other French sequences clustered in two other sublineages, one including the sequences from the *Ardennes département* together with Belgian sequences, and the second including sequences from the *Loiret département* (central France). These three sublineages were well supported (bootstrap ≥ 99), but the phylogenetic relationships between them were not resolved (bootstrap < 50). Coding sequences were very well conserved between 2012 and 2015. Compared with sequence KY365000 (2012 specimen), only one (silent) mutation at the nucleotide level was found at position 190 in sequences KY365001 and KY365003 from 2015 and three mutations (two of which were silent) in sequences KY36502 from 2015 at positions 190, 221 and 360. Regarding the three sequences from 2015, two sequences were identical (KY365001 and KY365003) and only two mutations were found in the third sequence (KY36502). One of these mutations was silent (221) and the other one generated an arginine instead of a lysine in position 360.

Discussion

This study provides insights into PUUV circulation in the animal reservoir in a study site in Alsace, a French region with NE, cases but where information is lacking on the epidemiology of the disease in the bank vole reservoir host. To better understand the epidemiology of PUUV in bank voles, the study was conducted over a period of four years to cover a population cycle of the reservoir host, and combined

classical virology tools (serology and molecular biology) with population dynamics methods (capture-mark-recapture, movement behavior).

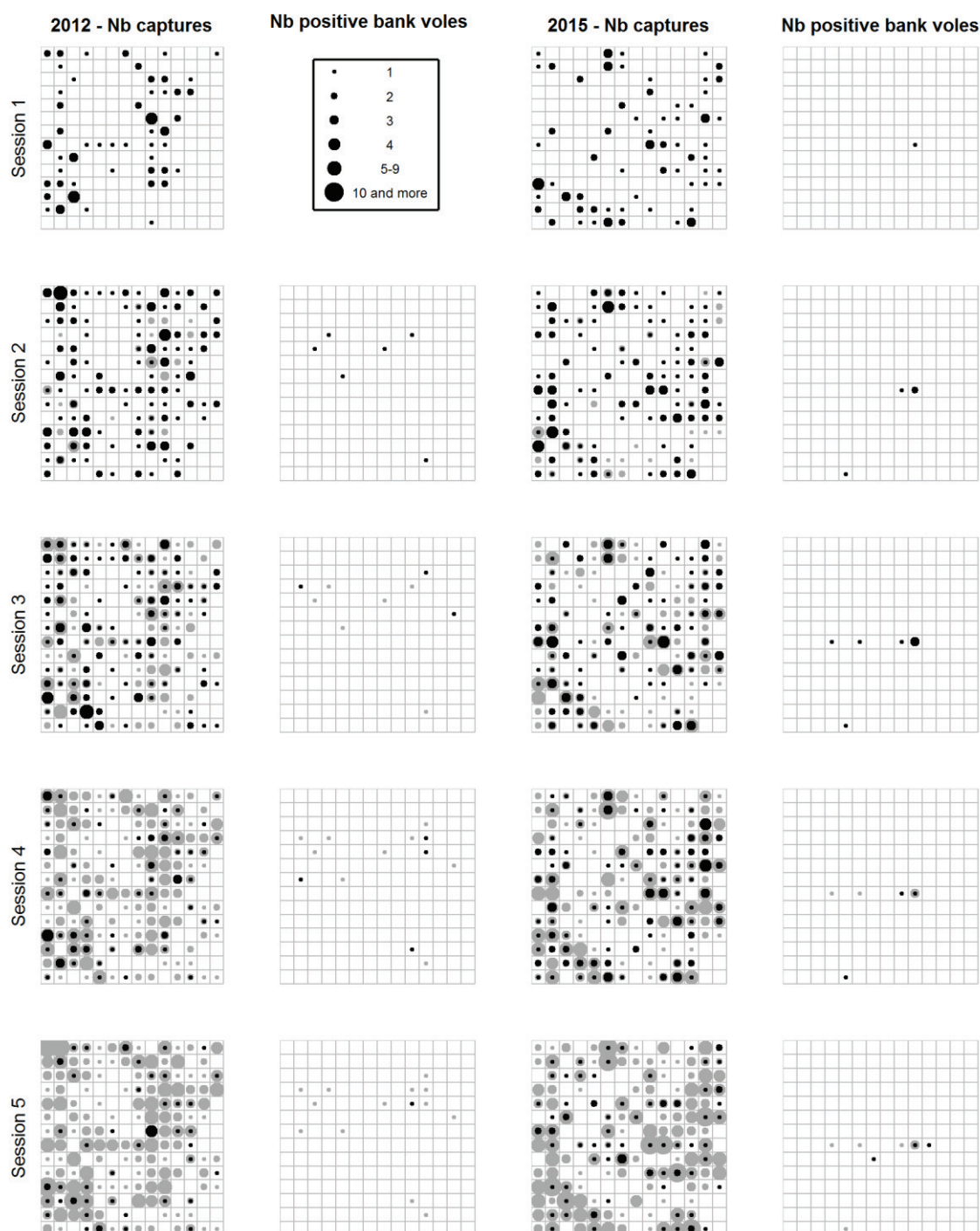
1. PUUV seroprevalence in bank voles

Seroprevalence in bank voles in our study site in Alsace was relatively low (about 4% in 2012 and 2015) in comparison with neighboring NE endemic regions, where PUUV seroprevalence has reached 15% in the Ardennes *département* and 29.7% in the Jura *département* (Castel et al., 2015). Overall, in other NE endemic regions, annual seroprevalence at specific sites may fluctuate from 0 to more than 50% among years (Augot et al., 2008; Deter et al., 2008; Escutenaire et al., 2000) and from 0 to 23% on average among locations (Castel et al., 2015; Ribas Salvador et al., 2011). In our study, the trapping area covered a larger surface than in most studies using a similar trapping protocol. Our results showed that seropositive bank voles were spatially clustered in 2015, in an area different from the localization of seropositive rodents observed in 2012. This heterogeneous distribution of seropositive bank voles can lead to biased estimates of seroprevalence, depending on the sampling season and the size of the capture areas (Monchatre-Leroy et al., 2016), limiting the interpretation of differences in seroprevalence among studies.

A low molecular serological prevalence in bank voles was found in 2012 and 2013 in German districts bordering France (Drewes et al., 2017), leading to the suggestion of a causal relationship with the low human incidence in this area in comparison with districts further west showing higher rodent PUUV prevalence and higher human incidence. The low seroprevalence in rodents and the low number of human cases (four in 2012 and none in 2013) in Alsace suggest that the epidemiological situation may be similar to German districts along the French border, especially because the annual abundance of bank voles peaked on both sides of the border in 2012 and 2015 (Drewes et al., 2017; Reil et al., 2015). Further studies in other trapping sites in Alsace would help determine the link between rodent and human infection and the extent to which the epidemiological situation is similar on both sides of the border.

Figure 2. Location of captured and PUUV-seropositive bank voles at each capture session in 2012 and 2015. The trapping area consisted of a grid of 14×14 live traps spaced at intervals of 12.5 m. Black

dots indicate the number (nb) of captures and seropositive rodents detected during the capture session and gray dots correspond to cumulative numbers of captures and seropositive rodents during the previous sessions of the same year.



2. Factors involved in PUUV epidemiology

Rodent population dynamics

Our study showed that a large population of yellow-necked mice lived in the study site alongside bank voles. This species is also known to harbor orthohantaviruses, mainly DOBV (Klempa et al., 2013; Rizzoli et al., 2015), PUUV (Lohmus et al., 2016) or TULV (Lohmus et al., 2016). Detection of PUUV and TULV in yellow-necked mice is the result of spillover from other rodents. However, a recent study in Sweden suggested that the role of yellow-necked mice in PUUV epidemiology may potentially be more important and may contribute to the amplification and transmission of PUUV (Lohmus et al., 2016). In our study site, the densities of bank voles and yellow-necked mice were cyclic and synchronous, with less marked changes in abundance for mice. The capture effort was the same each year (196 traps over 4 ha for three nights, five times a year) and cannot be the cause of the high variation in the numbers of trapped rodents between years. Similar fluctuations in population size for both species have been reported in Italy (Amori et al., 2015), Germany (Döhle et al., 1984 as cited in Amori et al., 2015), and England (Gurnell et al., 1985). We detected only one seropositive yellow-necked mouse in 2012, the year when the proportion of yellow-necked mice in the overall rodent population was the highest. This result suggests a spillover of PUUV from bank voles to yellow-necked mice, as already described in one yellow-necked mouse in Germany (Essbauer et al., 2006), in wood mice in Germany (Dobly et al., 2012) and in a common vole in Belgium (*Microtus arvalis*) (Klingström et al., 2002).

Spatial distribution of seropositive rodents

Our study highlighted that bank voles roam over short distances, suggesting that they did not use a large habitat, thereby corroborating other studies on rodent ecology (Gurnell et al., 1989; Rajaska, 2000). Most marked and recaptured bank voles were found in the same trap or in an adjacent one during the annual trapping sessions. These limited movements of individuals — and, incidentally, of seropositive bank voles — resulted in the limited spread of the PUUV-contaminated area during a given year, suggesting step-by-step contamination. This stepwise contamination depends on the overlapping of individual territories, which varies with population density, sex, and season (Ylonen et al., 1985). Due to the small number of positive bank voles in this study, it was not possible to explore the impact of

these different factors on PUUV spread. Furthermore, the existence of clusters of infected rodents (Fig. 2), in spite of the short-distance vole movements, may have arisen from the dispersal of only a small number of individuals. Several studies have suggested that young mature individuals play an important role in the dispersion of PUUV due to their higher mobility (Khlyap et al., 1989 as cited in Bernshtein et al., 1999; Deter et al., 2008) and more aggressive behavior (Escutenaire et al., 2002). However, demonstrating long-distance dispersal of seropositive rodents in the field is challenging because it requires intensive capture efforts on large temporal and spatial scales (Guivier et al., 2011).

Our results also indicated a shift in the infected area from the northern part of the study site in 2012 to the southern part of the study site in 2015, even though rodents were captured all over the study site in both years. It was not possible to study the epidemiological situation in 2013 and 2014 due to the limited number of bank voles trapped. The shift in the infected area may result from several non-exclusive mechanisms, including step-by-step diffusion, as observed between trapping sessions in 2012 and 2015 (although to a lower extent in 2012), the migration of infected young adults after breeding season when population density is high (Deter et al., 2008), and the dispersion of over-wintering adults after winter huddling (Hayes, 2000). These latter two hypotheses are predicted to cause PUUV emergence at a random location in the area with respect to the previous year(s). More studies are required to assess the importance of different PUUV diffusion patterns depending on season and population density. Little is known about PUUV epidemiology in years of population decline or during the winter. Further studies in Western Europe on PUUV transmission would provide a better understanding of PUUV epidemiology. For instance, the mechanisms of winter huddling are frequently studied in Northern Europe, but its significance varies with year, habitat type, and winter weather (Viitala et al., 1984) and a recent study (Sipari et al., 2016) showed behavioral plasticity in the overwintering strategies of bank voles. Furthermore, the absence of seropositive cases in 2015 at locations where seropositive rodents were found in 2012 suggests that orthohantaviruses cannot survive in the environment over several years. Experimental studies have documented periods of virus persistence outside the host of about 15 days in cold temperatures (Kallio et al., 2006b). Therefore, virus survival in the environment has been

suggested to play a role in orthohantavirus persistence, especially during low-density periods (Sauvage et al., 2003). The development of methods to detect orthohantaviruses in soil is a prerequisite to quantifying the rate of viral contamination of soil through bank vole feces, urine, and oropharyngeal secretions and to understanding the role of the environment and indirect contamination in PUUV epidemiology.

Figure 3. Phylogenetic tree inferred from the complete sequences of the S segment of Puumala virus (PUUV) using the maximum likelihood (ML) approach implemented in PhyML v3.0 and the GTR+G+I (General Time Reversible) substitution model as determined as optimal. The Muju virus DQ138133 and Hokkaido virus AB675450 were used as outgroups. Bootstrap (100 replicates) values >50 are indicated at the internal nodes. The length of each pair of branches represents the distance between sequence pairs. Newly identified PUUV strains of Alsace in this study are indicated by a red star. Newly identified PUUV sequences from France are KY364996, KY364997, KY364998, KY364999, KY365004, KY365005, KY365006 and KY365007. All other sequences were sourced from GenBank. Sequences **from France**: KT247592.1, KT247593.1, KT247595.1, KT247594.1, KT247596.2, KT247597.1, AM695638; **Germany**: JN696358, JN696372, JN696373, JN696371, JN696376, JN696374, JN696375, DQ16432, DQ16430, EU439968, AY954722, AY954723, AJ238779; **and Belgium**: U22423, AJ277030, AJ277031, AJ277032, AJ277033, AJ277034, AJ277075, AJ277076. Except for sequences from Belgium, France, Germany and Slovakia (AF294652) belonging to the Central European (CE) lineage, sequences of the following lineages were pooled (triangles) for better legibility: Alps-Adrian lineage (**ALAD**): AJ314600, FN377821, FN377822, AJ314601, AJ888751, AJ888752, KC676613, KC676615; Danish lineage (**DAN**): AJ238791, AJ278093; South Scandinavian lineage (**S-SCA**): AJ223368, AJ223369, AJ223376, AJ223377, GQ339483, GQ339484, GQ339487; Finnish lineage (**FIN**): AF367070, AF367071, AF367066, AF367067, JQ319171, JQ319167, Z46942, JN831943, JN831947, Z69985, GU808825, GU808824, AJ314597, Z30705, AJ238788; Russian lineage (**RUS**): AJ314598, AJ314599, JN657230, JN657231, JN657232, JN657229, AB433845, AB433843, AF442613, M32750, Z21497, Z84204, Z30706; Latvian lineage (**LAT**): JN657228; North Scandinavian lineage (**N-SCA**): AM746326, AM746322, AM746321, AM746320, AM746327, AM746312, AM746311, AM746313, AM746314, AM74631, AJ223371, AM746331, AM746330, AM746332, AM746333, AM746325, AM746324, AM746319, AM746317, AM746316, AM746315, AJ223380, U14137, GQ339473, GQ339474, GQ339475, GQ339476, AY526219, GQ339477, GQ339478, GQ339479, GQ339482, Z48596, AJ223375, AJ223374.

(Razzauti et al., 2008). PUUV appears to follow a quasi-neutral mode of microevolution with a steady generation of transient variants (including reassortants) and the preservation of a few preferred genotypes (Razzauti et al., 2013). Our field observations were consistent with these previous studies.

Alsace is located at the crossroads between several orthohantavirus-infected regions which have phylogenetically distinct PUUV isolates within the CE lineage. PUUV sequences from Alsace were more closely related to other French sequences than to those from Germany. German sequences available in GenBank corresponded to orthohantaviruses found far from the study site or at the border between the two countries formed by the Rhine River, which is an impassable obstacle to the circulation of bank voles. Testing for a possible genetic link between PUUV strains in both countries requires obtaining orthohantavirus sequences from rodent populations from southern Rhineland-Palatinate (which is north of Alsace with no large rivers in between) to assess a potential overland connection. Sequences from Alsace were in the same sublineage as those from Jura and Aube, but in a distinct sublineage from the Ardennes and Belgian sequences, providing insight into the evolution and the propagation of PUUV in France (Fig. 3). The presence of three sublineages in France raises the questions of their respective origins and more generally of the origin of French PUUV. Furthermore, although Aube is geographically closer to Ardennes (190 km) than Alsace (310 km), the area between Aube and Ardennes is very sparsely wooded, and the lack of suitable habitat may represent a barrier to the dispersal of rodents and PUUV, unlike areas between Aube and Alsace or Jura. Lastly, the isolated position of sequences from Loiret in a third sublineage raises questions as to its origin. Further sampling in unstudied regions are needed to investigate the phylogenetic origin of French lineages.

Acknowledgements

We wish to thank Coup de Puce Expansion and Scitex for their professional editing services by a native English speaker.

Conflict of interest

The authors declare not to have any conflict of interest.

References

- Amori, G., V. Castigliani, O. Locasciulli and L. Luiselli, 2015: Long-term density fluctuations and microhabitat use of sympatric *Apodemus flavicollis* and *Myodes glareolus* in central Italy. *Community Ecol.*, 16, 196-205.
- Augot, D., D. Muller, J. M. Demerson, F. Boue, C. Caillot and F. Cliquet, 2006: Dynamics of Puumala virus infection in bank voles in Ardennes department (France). *Pathol. Biol. (Paris)*, 54, 572-577.
- Augot, D., F. Sauvage, F. Boue, M. Bouloy, M. Artois, J. M. Demerson, B. Combes, D. Coudrier, H. Zeller, F. Cliquet and D. Pontier, 2008: Spatial and temporal patterning of bank vole demography and the epidemiology of the Puumala hantavirus in northeastern France. *Epidemiol. Infect.*, 136, 1638-1643.
- Ausvet, 2017: EpiTools epidemiological calculators. Available at: <http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=CiProportion&lang=en> (accessed on 20 July 2017).
- Bernshtein, A. D., N. S. Apekina, T. V. Mikhailova, Y. A. Myasnikov, L. A. Khlyap, Y. S. Korotkov and I. N. Gavrilovskaya, 1999: Dynamics of Puumala hantavirus infection in naturally infected bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Arch Virol*, 144, 2415-2428.
- Bivand, R. (2017). Spatial dependence: Weighting schemes, statistics and models. Available at: <https://r-forge.r-project.org/projects/spdep/>
- Brown, L. D., T. T. Cat and A. DasGupta, 2001: Interval estimation for a proportion. *Statistical Science*, 16, 101-133.
- Castel, G., M. Couteaudier, F. Sauvage, J. B. Pons, S. Murri, A. Plyusnina, D. Pontier, J. F. Cosson, A. Plyusnin, P. Marianneau and N. Tordo, 2015: Complete genome and phylogeny of Puumala hantavirus isolates circulating in France. *Viruses*, 7, 5476-5488.

- Charbonnel, N., M. Pagès, T. Sironen, H. Henttonen, O. Vapalahti, J. Mustonen and A. Vaheri, 2014: Immunogenetic factors affecting susceptibility of humans and rodents to hantaviruses and the clinical course of hantaviral disease in humans. *Viruses*, 6, 2214-2241.
- CNR report, 2016: Report of the National Reference Centre for Hantavirus 2016. Available on <http://www.pasteur.fr/sites/www.pasteur.fr/files/cnr-hantavirus-surveillance-mai-2016.pdf>. (accessed on 29 June 2017)
- Deter, J., Y. Chaval, M. Galan, B. Gauffre, S. Morand, H. Henttonen, J. Laakkonen, L. Voutilainen, N. Charbonnel and J. F. Cosson, 2008: Kinship, dispersal and hantavirus transmission in bank and common voles. *Arch. Virol.*, 153, 435-444.
- Dobly, A., C. Yzoard, C. Cochez, G. Ducoffre, M. Aerts, S. Roels and P. Heyman, 2012: Spatiotemporal dynamics of Puumala hantavirus in suburban reservoir rodent populations. *J. Vector Ecol.*, 37, 276-283.
- Döhle, H. J., M. Stubbe, U. Lange and H. J. Altner, 1984: Dominanz-und Abundanzdynamic von Kleinnagern (Rodentia: Arvicolidae: Muridae) in Auwäldern der mittleren DDR. *Säugetierkd. Inf.*, 2, 115-136.
- Drewes, S., H. S. Ali, M. Saxenhofer, U. M. Rosenfeld, F. Binder, F. Cuypers, M. Schlegel, S. Röhrs, G. Heckel, R. G. Ulrich, 2017: Host-associated absence of human Puumala virus infection in northern and eastern Germany. *Emerg. Infect. Dis.*, 23, 83-86.
- Escutenaire, S., P. Chalon, F. De Jaegere, L. Karelle-Bui, G. Mees, B. Brochier, F. Rozenfeld and P. P. Pastoret, 2002: Behavioral, physiologic, and habitat influences on the dynamics of Puumala virus infection in bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Emerg. Infect. Dis.*, 8, 930-936.
- Escutenaire, S., P. Chalon, R. Verhagen, P. Heyman, I. Thomas, L. Karelle-Bui, T. Avsic-Zupanc, A. Lundkvist, A. Plyusnin and P. Pastoret, 2000: Spatial and temporal dynamics of Puumala hantavirus infection in red bank vole (*Clethrionomys glareolus*) populations in Belgium. *Virus Res.*, 67, 91-107.
- Essbauer, S., J. Schmidt, F. J. Conraths, R. Friedrich, J. Koch, W. Hautmann, M. Pfeffer, R. Wolfel, J. Finke, G. Dobler and R. Ulrich, 2006: A new Puumala hantavirus subtype in rodents associated

- with an outbreak of Nephropathia epidemica in South-East Germany in 2004. *Epidemiol. Infect.*, 134, 1333-1344.
- Guivier, E., M. Galan, Y. Chaval, A. Xuéreb, A. R. Salvador, M. L. Poulle, L. Voutilainen, H. Henttonen, N. Charbonnel, J.F. Cosson, 2011: Landscape genetics highlights the role of bank vole metapopulation dynamics in the epidemiology of Puumala hantavirus. *Mol. Ecol.*, 17, 3569-3583.
- Guivier, E., M. Galan, A. R. Salvador, A. Xuereb, Y. Chaval, G. E. Olsson, S. Essbauer, H. Henttonen, L. Voutilainen, J. F. Cosson and N. Charbonnel, 2010: Tnf-alpha expression and promoter sequences reflect the balance of tolerance/resistance to Puumala hantavirus infection in European bank vole populations. *Infect. Genet. Evol.*, 10, 1208-1217.
- Gurnell, J., 1985: Woodland rodent communities. *Symp. Zool. Soc. Lond.*, 55, 377-411.
- Gurnell, J. and J. H. W. Gipps, 1989: Inter-trap movement and estimating rodent densities. *J. Zool.*, 217, 241-254.
- Haredasht, S. A., C. J. Taylor, P. Maes, W. W. Verstraeten, J. Clement, M. Barrios, K. Lagrou, M. Van Ranst, P. Coppin, D. Berckmans and J. M. Aerts, 2013: Model-based prediction of Nephropathia epidemica outbreaks based on climatological and vegetation data and bank vole population dynamics. *Zoon. Public Health*, 60, 461-477.
- Hayes, L. D., 2000: To nest communally or not to nest communally: a review of rodent communal nesting and nursing. *Anim. Behav.*, 59, 677-688.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball, and J. R. DeWaard, 2003: Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc B*, 270, 313-321.
- Heyman, P., C. S. Ceianu, I. Christova, N. Tordo, M. Beersma, M. Joao Alves, A. Lundkvist, M. Hukic, A. Papa, A. Tenorio, H. Zelena, S. Essbauer, I. Visontai, I. Golovljova, J. Connell, L. Nicoletti, M. van Esbroeck, S. Gjeruldsen Dudman, S. W. Aberle, T. Avsic-Zupanc, G. Korukluoglu, A. Nowakowska, B. Klempa, R. G. Ulrich, S. Bino, O. Engler, M. Opp and A. Vaheri, 2011: A five-year perspective on the situation of haemorrhagic fever with renal syndrome and status of the hantavirus reservoirs in Europe, 2005-2010. *Eurosurveillance*, 16, 1-6.

- Heyman, P., R. V. Mele, L. Smajlovic, A. Dobly, C. Cochez and C. Vandenvelde, 2009: Association between habitat and prevalence of hantavirus infections in bank voles (*Myodes glareolus*) and wood mice (*Apodemus sylvaticus*). *Vector-Borne Zoon. Dis.*, 9, 141-146.
- Heyman, P., B. R. Thoma, J. L. Marié, C. Cochez and S. S. Essbauer, 2012: In search for factors that drive hantavirus epidemics. *Front. Physiol.*, 3 1-23.
- Kallio, E. R., J. Klingström, E. Gustafsson, T. Manni, A. Vaheri, H. Henttonen, O. Vapalahti and Å. Lundkvist, 2006b: Prolonged survival of Puumala hantavirus outside the host: Evidence for indirect transmission via the environment. *J. Gen. Virol.*, 87, 2127-2134.
- Kallio, E. R., A. Poikonen, A. Vaheri, O. Vapalahti, H. Henttonen, E. Koskela and T. Mappes, 2006a: Maternal antibodies postpone hantavirus infection and enhance individual breeding success. *Proc. Biol. Sci.*, 273, 2771-2776.
- Khlyap, L. A., S. A. Albov, M. A. Serbenyuk and N. V. Zagarujko, 1989: Ecolo-ethological preconditions of infections transmission among bank voles by theirs excreta. Conference on natural focalities of diseases, Moscow, 155-156.
- Klempa, B., T. Avsic-Zupanc, J. Clement, T. K. Dzagurova, H. Henttonen, P. Heyman, F. Jakab, D. H. Kruger, P. Maes, A. Papa, E. A. Tkachenko, R. G. Ulrich, O. Vapalahti and A. Vaheri, 2013: Complex evolution and epidemiology of Dobrava-Belgrade hantavirus: Definition of genotypes and their characteristics. *Arch. Virol.*, 158, 521-529.
- Klingström, J., P. Heyman, S. Escutenaire, K. B. Sjolander, F. De Jaegere, H. Henttonen and A. Lundkvist, 2002: Rodent host specificity of european hantaviruses: Evidence of Puumala virus interspecific spillover. *J. Med. Virol.*, 68, 581-588.
- Lefort V., Longueville J.E., Gascuel O., 2017: SMS: Smart Model Selection in PhyML. *Molecular Biology and Evolution*, msx149.
- Lohmus, M., J. Verner-Carlsson, O. Borg, A. Albiñ and A. Lundkvist, 2016: Hantavirus in new geographic regions, Sweden. *Infect. Ecol. Epidemiol.*, 6, 31465.
- Monchâtre-Leroy, E., L. Crespin, F. Boué, P. Marianneau, D. Calavas and V. Hénau, 2016: Spatial and temporal epidemiology of Nephropathia epidemica incidence and hantavirus seroprevalence in

- rodent hosts: Identification of the main environmental factors in Europe. *Transbound. Emerg. Dis.*, in press. DOI 10.1111/tbed.12494
- Niklasson, B., B. Hornfeldt, A. Lundkvist, S. Björsten and J. Leduc, 1995: Temporal dynamics of Puumala virus antibody prevalence in voles and of nephropathia epidemica incidence in humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 53, 134-140.
- Olal, D. and O. Daumke, 2016: Structure of the hantavirus nucleoprotein provides insights into the mechanism of RNA encapsidation. *Cell Rep.*, 14, 2092-2099.
- Olsson, G. E., M. Hjertqvist, C. Ahlm, M. Evander and B. Hornfeldt, 2010: [Nephropathia epidemica: Data on voles indicate new, extensive outbreak]. *Lakartidningen*, 107, 1769-1770.
- Rajska-Jurgiel, E., 2000: Breeding dispersal in *Clethrionomys glareolus* females. *Acta Theriol.*, 45, 367-376.
- Razzauti, M., A. Plyusnina, H. Henttonen and A. Plyusnin, 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.
- Razzauti, M., A. Plyusnina, H. Henttonen and A. Plyusnin, 2013: Microevolution of Puumala hantavirus during a complete population cycle of its host, the bank vole (*Myodes glareolus*). *PLoS One*, 8, e64447.
- Reil, D., C. Imholt, J. A. Eccard and J. Jacob, 2015: Beech fructification and bank vole population dynamics - Combined analyses of promoters of human puumala virus infections in Germany. *PLoS One*, 10, e0134124.
- Reusken, C., B. L. Haagmans, M. A. Muller, C. Gutierrez, G. Godeke, B. Meyer, D. Muth, V. S. Raj, L. Smits-De Vries, V. M. Corman, J. F. Drexler, S. L. Smits, Y. El Tahir, R. de Sousa, J. van Beek, N. Nowotny, K. van Maanen, E. Hidalgo-Hermoso, B. J. Bosch, P. J. Rottier, A. Osterhaus, C. Gortazar Schmidt, C. Drosten and M. P. G. Koopmans, 2013: Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralising serum antibodies in dromedary camels: a comparative serological study *The Lancet*, 13, 859-866.

- Ribas Salvador, A., E. Guivier, A. Xuereb, Y. Chaval, P. Cadet, M.-L. Poulle, T. Sironen, L. Voutilainen, H. Henttonen, J.-F. Cosson and N. Charbonnel, 2011: Concomitant influence of helminth infection and landscape on the distribution of Puumala hantavirus in its reservoir, *Myodes glareolus*. *BMC Microbiol.*, 11, 1-13.
- Rizzoli, A., V. Tagliapietra, R. Rosa, H. C. Hauffe, G. Marini, L. Voutilainen, T. Sironen, C. Rossi, D. Arnoldi and H. Henttonen, 2015: Recent increase in prevalence of antibodies to Dobrava-Belgrade virus (DOBV) in yellow-necked mice in Northern Italy. *Epidemiol. Infect.*, 143, 2241-2244.
- Robins, J. H., M. Hingston, E. Matisoo-Smith and H. A. Ross, 2007: Identifying *Rattus* species using mitochondrial DNA. *Mol Ecol Notes* 7, 717–729.
- Sauvage, F., M. Langlais, N. G. Yoccoz and D. Pontier, 2003: Modelling hantavirus in fluctuating populations of bank voles: The role of indirect transmission on virus persistence. *J. Anim. Ecol.*, 72, 1-13.
- Sauvage, F., C. Penalba, P. Vuillaume, F. Boue, D. Coudrier, D. Pontier and M. Artois, 2002: Puumala hantavirus infection in humans and in the reservoir host, Ardennes region, France. *Emerg. Infect. Dis.*, 8, 1509-1511.
- Sipari S., M. Haapakoski, I. Klemme, R. Palme, J. Sundell and H. Ylönen, 2016: Population sex-ratio affecting behavior and physiology of overwintering bank voles (*Myodes glareolus*). *Physiology & Behavior*, 159, 45-51.
- Sokalingam, S., G. Raghunathan, N. Soundrarajan and S. G. Lee, 2012: A study on the effect of surface lysine to arginine mutagenesis on protein stability and structure using green fluorescent protein. *PLoS One*, 7, e40410.
- Tersago, K., A. Schreurs, C. Linard, R. Verhagen, S. Van Dongen and H. Leirs, 2008: Population, environmental, and community effects on local bank vole (*Myodes glareolus*) Puumala virus infection in an area with low human incidence. *Vector-Borne Zoon. Dis.*, 8, 235-244.

- Tersago, K., R. Verhagen, O. Vapalahti, P. Heyman, G. Ducoffre and H. Leirs, 2011: Hantavirus outbreak in Western Europe: reservoir host infection dynamics related to human disease patterns. *Epidemiol. Infect.*, 139, 381-390.
- Tomich, P. Q., 1970: Movement patterns of field rodents in Hawaii. *Pacific Sci.*, 24, 195-234.
- Ulrich, R. G., J. Schmidt-Chanasit, M. Schlegel, J. Jacob, H. J. Pelz, M. Mertens, M. Wenk, T. Buchner, D. Masur, K. Sevke, M. H. Groschup, F. W. Gerstengarbe, M. Pfeffer, R. Oehme, W. Wegener, M. Bemann, L. Ohlmeyer, R. Wolf, H. Zoller, J. Koch, S. Brockmann, G. Heckel and S. S. Essbauer, 2008: Network "Rodent-borne pathogens" in Germany: longitudinal studies on the geographical distribution and prevalence of hantavirus infections. *Parasitol. Res.*, 103, S121-129.
- Viitala J. and J.F. Merritt, 1984: Stability of overwintering populations of *Clethrionomys glareolus* and *Microtus* at Kilpisjärvi, Finnish Lapland: Winter ecology of small Mammals. Carnegie Museum of History, Pittsburgh, spec. Pub.10.
- Weber de Melo, V., H. Sheikh Ali, J. Freise, D. Kühnert, S. Essbauer, M. Mertens, K. M. Wanka, S. Drewes, R. G. Ulrich and G. Heckel, 2015: Spatiotemporal dynamics of Puumala hantavirus associated with its rodent host, *Myodes glareolus*. *Evol. Appl.*, 8, 545-559.
- Ylönen H. and J. Viitala, 1985: Social organization of an enclosed winter population of the bank vole *Clethrionomys glareolus*. *Ann. Zool. Fennici.*, 22, 353-358.

Chapitre 2 – Dix ans d'évolution génétique des variants du virus Puumala dans les forêts des Ardennes, France.

Notre étude en Alsace suggère qu'en zone de faible endémie de NE, la séroprévalence des rongeurs est faible (Monchatre-Leroy et al. 2018). Toutefois, une forte séroprévalence n'est pas toujours associée à un nombre élevé de cas de NE comme le montre une étude française qui met en évidence une séroprévalence chez les rongeurs de 17,2 % à Orléans situé en dehors de la zone d'endémie humaine (Castel et al., 2015). De même, dans les Ardennes la répartition des cas humains n'est pas homogène bien que la séroprévalence des rongeurs soit globalement élevée dans l'ensemble des sites étudiés (Augot et al. 2008). Des facteurs autres que la séroprévalence chez le campagnol doivent donc intervenir pour expliquer la présence de zones de faible endémie et de forte endémie de NE.

Un des aspects importants est la génétique du virus qui a été suggérée comme facteur impactant les caractéristiques de l'infection de l'hôte (Guivier et al., 2010b), la pathogénicité chez l'Homme (Zhang et al., 2010) et la transmissibilité à l'Homme (Castel et al. 2015). Or, la diversité génétique du PUUV est surtout liée à une dérive génétique, c'est-à-dire à l'accumulation progressive au cours du temps de points de mutation dans le génome ainsi que de micro délétions et micro insertions dans les zones non codantes (Razzauti et al., 2013). Si la majeure partie de ces mutations est silencieuse en terme de traduction en acides aminés, cette micro évolution peut conduire à de nouveaux variants si une pression de sélection s'exerce. Pour PUUV, cette pression de sélection va s'exercer au niveau individuel du fait de l'interaction entre le virus et le système immunitaire de l'hôte dont l'efficacité va varier en fonction de son âge, de son statut reproducteur et de son état de santé. Au niveau de la population, cette pression de sélection aura donc des conséquences plus ou moins importantes en fonction de la phase considérée du cycle dans les populations des campagnols : phase d'accroissement par reproduction, phase où la proportion de jeunes est élevée, ou phase de déclin. D'autre part, ces cycles d'abondance du rongeur conduisent à l'extinction de certains variants lors de la phase de déclin et l'amplification d'autres lors de l'accroissement de la population, c'est l'effet fondateur (Escutenaire et al., 2001). Ces constats laissent entrevoir les liens qui pourraient donc exister entre dynamique de population, micro évolution du virus et potentiellement l'épidémiologie des cas de NE.

Dans ce contexte, le deuxième volet de la thèse portait sur une comparaison de la micro évolution virale et de la dynamique de population de campagnols entre deux sites des Ardennes présentant un nombre de cas de NE différents malgré des séroprévalences de rongeurs comparables.

Pour répondre à cet objectif, deux zones des Ardennes françaises ont été étudiées sur une période de 10 ans : une au Sud de Charleville-Mézières dans la forêt d'Elan et une autre à 30km plus au Nord, en forêt de Croix-Scaille. La forêt d'Elan est associée à peu ou pas de cas de NE contrairement à la forêt de Croix-Scaille. Au sein de deux sites par zone, un suivi de la population de campagnols roussâtres, de leur statut sérologique vis-à-vis du PUUV et des variants génétiques du segment S du PUUV a été réalisé. Le protocole a été identique sur les quatre sites de 2000 à 2009 avec cinq sessions de capture par an en avril, juin, juillet, septembre et octobre au cours de trois nuits consécutives. Pour chaque individu capturé, il y a eu identification individuelle, détermination de son sexe et de son espèce, pesée et prélèvement sanguin. Les quatre sites comprenaient chacun 49 pièges répartis de manière régulière

(en grille). Le statut sérologique a été déterminé par un test ELISA spécifique de PUUV et les séquences du segment S du virus ont été obtenues par PCR nichée. Les paramètres caractérisant la dynamique de population ont été estimés par un modèle de « Robust design ».

Le protocole a permis dans un premier temps de vérifier la valeur des séroprévalences au sein de chaque forêt. Si la séroprévalence moyenne en forêt d'Elan ($23,1\% \pm 2,3$, écart-type) est plus faible que celle en forêt de Croix-Scaille ($36,6\% \pm 3,6$), les séroprévalences sont importantes. A partir des sérums positifs, 56 variants viraux ont été amplifiés. Leur analyse phylogénétique a montré qu'ils se répartissaient en 4 groupes : un dans la forêt d'Elan, présent sur presque toute la durée de l'étude et 3 dans la forêt de Croix-Scaille, dont un qui a persisté dans le temps et deux transitoires sur une année. La diversité génétique de chaque groupe au cours du temps est plus importante en forêt de Croix-Scaille qu'en forêt d'Elan où un seul variant était présent. D'un point de vue dynamique de population, les caractéristiques démographiques de la population de rongeurs présente dans la forêt de Croix-Scaille diffèrent au cours du temps de celle présente dans la forêt d'Elan. Si la cyclicité inter annuelle a été constatée sur l'ensemble des sites d'études, les effondrements de populations ont duré bien plus longtemps et étaient bien plus marqués en forêt de Croix-Scaille. Comparativement aux sites de la forêt d'Elan, les sites de Croix-Scaille étaient associés à un taux de recrutement des individus plus fort et à une plus faible probabilité de persistance sur site des individus entre deux captures consécutives. Ces paramètres sont assez stables dans le temps pour chaque site.

Il semblerait donc que la forêt de Croix-Scaille soit associée à une population de rongeurs qui bénéficie d'apport d'individus par immigration mais qui est plus transitoire, à cause d'une mortalité plus élevée ou d'un taux d'émigration important. Cette population instable se traduit par une diversité génétique virale élevée au cours du temps avec apparition de nouveaux groupes viraux introduits par les migrants disparaissant au fur et à mesure des effondrements de populations. A contrario, la forêt d'Elan est associée à une population de rongeurs plus stable entretenant un variant viral très stable. Or, le maintien dans le temps d'une population de campagnols va dépendre essentiellement de l'environnement qui doit être favorable à ses conditions de vie (apport de nourriture, végétations et sols propices aux abris et conditions météorologiques favorables). En Europe de l'Ouest, l'habitat préférentiel des campagnols est la forêt de feuillus (Quere et Le Louarn, 2011). Les deux sites d'Elan sont d'ailleurs au cœur d'un massif forestier de feuillus dont la taille importante est délimitée par des routes et des cultures. Les deux sites de Croix-Scaille sont situés dans un massif forestier bien plus large où dominent des résineux qui sont bien moins favorables à l'établissement des campagnols.

En résumé, les deux sites de forte endémie de NE (i.e. en forêt de Croix Scaille) sont associés à une diversité virale importante qui est le résultat de la dynamique de population dans un habitat peu favorable connecté avec d'autres sites. Cette dynamique conduit à des groupes génétiques de PUUV transitoires en fonction des migrations de rongeurs et une variabilité génétique élevée au sein de ces groupes du fait de la pression de sélection générée par les conditions de vies plus stressantes des rongeurs et de leur diversité d'origine. Inversement, les deux sites de très faible endémie de NE (en forêt d'Elan) sont caractérisés par une diversité génétique du PUUV très faible du fait d'une population de rongeurs stable qui induit une pression de sélection non directionnelle et favorise une dérive génétique sur un mode de quasi-neutralité comme cela a déjà été constaté pour PUUV (Razzauti et al., 2013). Les liens suggérés par notre étude entre diversité génétique et nombre de NE restent à être confortés et explicités mais ouvrent des pistes de recherche qui ont peu été explorées jusqu'à présent.

Publication 2 :

Les résultats de l'étude sont à soumettre dans la revue « Journal of Wildlife diseases »

Castel G., Monchatre-Leroy E., Lopez Roig M., Murris S., Boué F., Augot D., Sauvage F., Pontier D., Crespin L., Serra Cobo J., Marianneau P., Tordo N. Ten years of genetic evolution of Puumala virus variants circulating in forests of Ardennes, France.

Article 2

Ten years of genetic evolution of Puumala variants circulating in forests of Ardennes, France

Ten years of genetic evolution of Puumala virus variants circulating in forests of Ardennes, France.

Castel G^{*}., Monchatre-Leroy E^{*}., Lopez Roig M., Murris S., Boué F., Augot D., Sauvage F., Pontier D., N. Charbonnel, Crespin L., Serra Cobo J., Marianneau P[§]., Tordo N[§].

* These authors contributed equally to this work

§ These authors contributed equally to this work

Abstract:

In Europe, Puumala virus (PUUV) transmitted by the bank vole (*Myodes glareolus*) is the agent of Nephropathia Epidemica a mild form of Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome. In France, very little is known about the spatial and temporal variability of the virus in the distribution of infected bank vole. In the present study we present the follow up of bank vole density and PUUV microdiversity over a period of ten years (2000-2009) in two forests presenting different environmental conditions and epidemiologically contrasted close to Charleville-Mezière city in the Ardennes region of France. Rodent trapping using the capture/markings/recapture method was performed to determine the global seroprevalence of PUUV in bank vole populations. PUUV variants from each of the two forests were sequenced over a partial sequence in the coding part of S segment and phylogenetic analyses were performed to determine the genetic diversity of the local PUUV isolates and to follow its dynamics over time. Uncovering the link between host dynamic and virus microevolution will improve our understanding of PUUV epidemiology and of NE incidence in this at risk region of France.

Keywords: *Orthohantavirus*; *Puumala virus*; Microdiversity; Evolution; France

1. Introduction

Within the family *Hantaviridae* (Order *Bunyavirales*) the genus *Orthohantavirus* is constituted by viruses transmitted via contaminated aerosolized excreta of small mammals (rodents, shrews, moles, bats). Hantaviruses are distributed worldwide except in Antarctica and are closely associated to their mammal vector in which they do not show any obvious pathogenicity (Plyusnin and Sironen, 2014). When transmitted to human, they provoke Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS) or Hantavirus Cardio Pulmonary Syndrome (HCPS) mainly depending if their rodent vector is in the Old World (Europe, Asia) or in the New World (Americas) (Vaheri et al.,

2013). In the last decades, hantaviruses have become emerging zoonotic pathogens and the associated diseases have generated growing public health concern because of their increasing in frequency, amplitude, and geographic expansion (Vaheri et al., 2013). In Europe, Puumala virus (PUUV) is the agent of Nephropathia Epidemica (NE), a mild form of HFRS (Vaheri et al., 2013). It is transmitted by the bank vole (*Myodes glareolus*) which is distributed throughout a large part of Europe. However, the spatial distribution of NE incidence is substantially smaller with a high variation at large as well as at small geographical scales (Olsson et al., 2010). In addition to the discrepancy between bank vole and NE cases distribution, there is discrepancy between NE cases and infected rodent distribution. In France, infected rodents were found in some sites outside (Castel et al., 2015) and even inside the endemic region (Augot et al., 2008), without associated human cases. The reason of these discrepancies in distribution between the reservoir infected or not and the associated disease is not clearly elucidated (Olsson et al., 2010).

The infection in humans and rodents is the result of the interaction between PUUV and the contaminated host that lead to “no disease” or disease more or less serious. PUUV infection is modulated by host immune mechanisms (Guivier et al., 2010; Deter et al., 2008) in interaction with different viral variant that should be more or less pathogenic and escape more or less to immune system (Schonrich et al., 2008). PUUV variations are driven by genetic evolution and the main mechanisms of hantavirus evolution are genetic drift (accumulation of nucleotide substitutions, in addition to small insertions and/or deletions (Plyusnin et al., 1995; Rowe et al., 1995; Lundkvist et al., 1998; Razzauti et al., 2008) and genetic shift (essentially reassortments, i.e., exchange of genome segments, (Razzauti et al., 2008, 2009). The long-term evolution process (macroevolution) is probably different from the microevolution (short time-scale). At short time-scale, the determinants for diversification and variability among closely related viruses of the same viral species circulating in different geographic areas are still poorly understood (Streicker et al., 2012). Five-year monitoring of PUUV microevolution in bank vole population in Central Finland has evidenced accumulation of nucleotide substitutions generating diversification within the PUUV population facilitating a rapid adaptation to environmental changes and new stressors (Razzauti 2013). Apart of these transient variants, a quasi-neutral mode of PUUV microevolution was observed with preservation of a few preferred genetic variants over several seasons/years.

Microevolution of PUUV is then very depending of stressors mainly induce by immune system of bank voles individually modulated by reproductive status, health status, the age of each rodent (Escutenaire et al., 2000; Olsson et al., 2002). At rodent population level, viral stressors should be different between seasons. Indeed, as rodent dynamics population is very seasonal, the

importance of the different population group, reproductive adults, pregnant female, juvenils and old adults, is seasonal too. Fluctuations in abundance of rodent population occur both seasonally and annually (Mazurkiewicz and Rajska, 1998) depending on climate and environmental conditions. The massive winter decrease of rodent population could lead to the extinction of some genetic variants of PUUV and the selection of those infected survivor rodents, i.e. the genetic bottleneck of PUUV (Voutilainen et al., 2015). Then, population dynamics of rodents highly affects the genetic diversity of PUUV.

In France, NE endemic area is located in the North East in which Ardennes region is the most important endemic region, with a mean of 40% of the French reported annual cases over the considered period (Sauvage et al., 2002) and a seroprevalence of 20% in the forest workers (Penalba 1995). The spatially distribution of human cases is heterogeneous in Ardennes. The forest of Croix-Scaille is a large spruce forest to which many human NE cases have been reported, whereas the Elan forest is a small hedge, broad leaves, forest to which no linked human NE case is known (Augot 2008). In both forests, rodents are infected (Augot et al., 2008).

The aim of the study is to compare sites with and without human cases. Firstly, the global seroprevalence of PUUV in bank vole populations of both type of sites was assessed by rodents trapping using the capture/markings/recapture method from 2000 to 2009. Secondly, viral microevolution and rodent population dynamics were compared from 2000 to 2009 between sites with and without human cases.

2. Materials and Methods

2.1. Rodent trapping and collection data

Sampling sites were chosen in the forests of Elan (station 3 and 4) and of Croix-Scaille (station 2 and 5), distant by 30 km and separated by the Charleville-Meziere city (figure 1) (Cf A, B, C et D de Augot 2008). Stations 3 and 4 are separated each other by 2 km, stations 2 and 5 by 5 km. The stations 3 and 4 are located in a limited forest of broadleaves surrounded by fields and roads. The stations 2 and 5 are located in a large forest area mainly constituted by conifers (ONF).

The trapping protocol consisted for one station in one quadrat of 7x7 Ugglan traps separated from each other by a distance of 14 meters that were deployed for 3 successive nights. Five trapping

sessions were organized each year from 2000 to 2009 (10 years). These five sessions were fixed during the most active season for *Myodes*, i.e. April/June/August/September/October.

Captured rodents were weighted, sexed and blood-sampled. Blood was taken from the retroorbital sinus and the rodent was marked by toe-clipping and released at their original site of capture.

All the procedures were carried out according to EC Directive 86/609/CEE and the French transposition of this directive, décret 2001-486 of June 2001 that were in force during the experimentation.

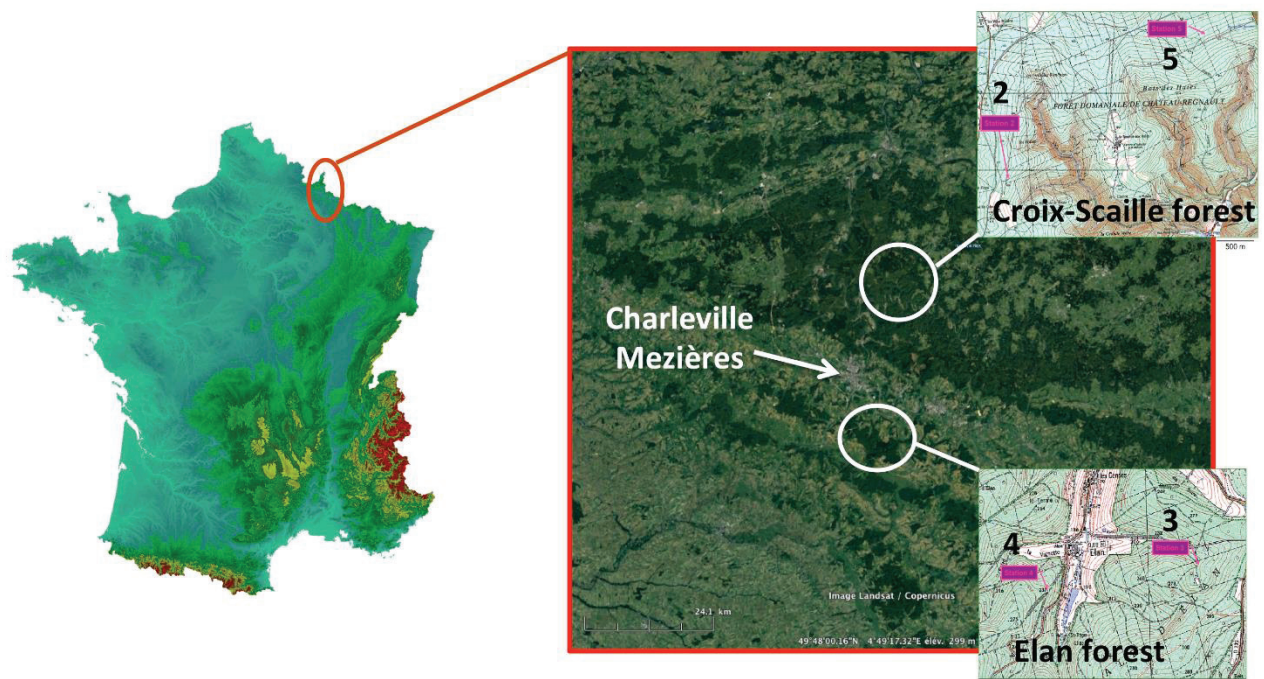


Figure 1: Map of France showing the sampling sites. Pink rectangles indicate the localization of the sampling stations 2,3,4 and 5 on the Elan and Croix-Scaille forests. Each station is constituted by one quadrat of 7x7 Ugglan traps separated from each other by a distance of 14 meters.

2.2. Serological and molecular analysis

Bank vole serum samples were screened for previous PUUV exposure by an IgG ELISA on plaques coated with N recombinant protein of PUUV or controls as already described in Castel et al 2015.

Seroprevalence was calculated as the proportion of seropositive rodents (PUUV+) among all individuals captured during a given trapping session. All individuals weighting less than 14 g, considered as young individuals still protected by maternal antibodies, were excluded.

RNA was extracted from serum samples of ELISA of seropositive bank voles using the Qiaamp viral RNA extraction kit (Qiagen) following the manufacturer's recommendations. Reverse transcription-PCR (RT-PCR) was performed essentially as described earlier (in Plyusnina et al, 2012). Sequences of primers are available upon request. PCR-amplicons were purified from agarose gel and sequenced by the Sanger method (nucleotides 352–654 of the coding part of the PUUV S segment; 101 aa).

2.3. *PUUV microevolution*

Multiple sequence alignments were prepared with the Clustal Omega alignment program implemented in SEAVIEW v4.6.1 (Gouy et al., 2010). Phylogenetic reconstructions were conducted with the Maximum Likelihood (ML) approach using PhyML v3.1 (Lee et al., 1982) implemented in SEAVIEW v4.6.1 with 1000 bootstrap replicates. The optimal substitution model was identified as the HKY85 + I (0,79) model using the SMS v1.8.1 program (Lefort et al, 2017) available online at <http://www.atgc-montpellier.fr/sms/> on the ATGC bioinformatics platform. The transition/transversion ratio was fixed to 4 and nucleotide frequencies were optimized from the data set. Estimate of evolutionary divergence (nucleotide) within and between stations was calculated using a function implemented in the Mega v7.0 program. Analyses were conducted using the Maximum Composite Likelihood. The rate variation among sites was modelled with a gamma distribution (shape parameter = 1). All the other parameters were set to their default. All ambiguous positions were removed for each sequence pair. Phylogenetics trees were visualized using FigTree v1.4.3.

2.4. *Bank voles population dynamics*

To estimate population size for each period we used the robust-design model within program MARK (White and Burnham 1999) which combines the Cormack–Jolly–Seber model (Cormack 1964; Jolly 1965; Seber 1965) and closed capture models (Kendall 2001; Pollock 1982). The robust design consists of five primary trapping periods (April/June/August/September/October), over which populations are open, and included secondary trapping occasions (3 consecutive trapping days) when populations are assumed to be closed (Figure 2). This design allowed to encounter history input data for the robust-design models, to estimate capture and recapture probabilities and subsequently to improve the precision of population size estimates (Pollock 1982). No goodness-

of-fit tests are available for robust-design models (Bailey et al. 2004). Not all years of each site were analysed since no (or too few) captures were obtained in several trapping days or months.

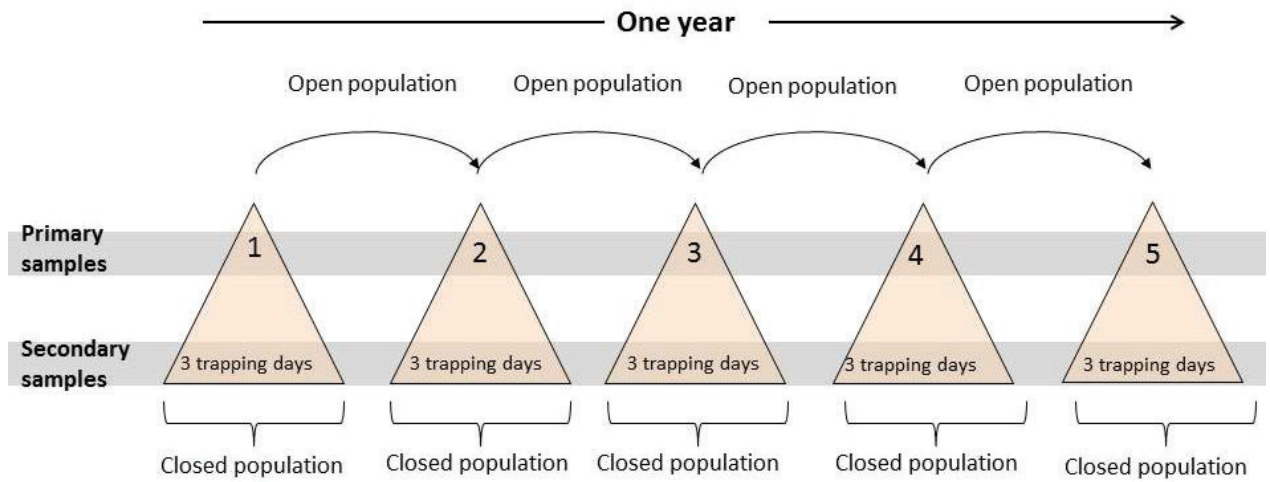


Figure 2: Sampling design of the study (adapted from Program MARK, a gentle introduction / Chapter 15/ figure of sampling structure of classical Pollock's Robust design)

We used in Mark program, the Cormack–Jolly–Seber to estimate annually ϕ and the Pradel models to estimate γ , $1 - \gamma$ and f (table 1).

parameter	Name of parameter	Signification of the parameter
ϕ	apparent survival	the probability of an animal surviving and not emigrating permanently between occasions i and $i + 1$
γ	Seniority probability	the probability that if an individual is alive and in the population at time (i) that it was also alive and in the population at time ($i-1$)
$1 - \gamma$	Complement of the seniority probability	the probability that an individual present at ($i+1$) is a new one; i.e. not present at (i)
f	recruitment	Number of individuals entering the population between (i) and ($i+1$) per individual already in the population at time (i)

Cormack–Jolly–Seber model in MARK program allows testing for external variables as factor affecting survival. Time (2000-2009 period), site (four sites 2-5), and interaction between time and site were included to generate 16 different candidate models including all possible combinations. We used

bootstrap procedure (Mark program) to test the goodness-of-fit and used the variance inflation factor $\hat{c}$ ($\text{Dev}/\text{mean}(\text{Dev})$) estimated to correct for the overdispersion in the data before model selection if necessary (White and Burnham 1999). We used Akaike's information criterion corrected for small sample size (AICc) to select the most parsimonious models from the candidate models (Burnham and Anderson 2002). The best approximating model has the lowest AICc value. ΔAICc of a model was computed as the AICc difference between the model and the most parsimonious model (Burnham and Anderson 2002).

3. Results

3.1. Rodents trapping and seroprevalence

During 10-year study period we captured and identified a total of 2005 individual bank voles in sites 2 (524) and 5 (167) of forest Croix-Scaille (total 691) and in sites 3 (771) and 4 (543) of forest Elan locality (total 1314).

From 2000 to 2009, upon all samples from 2005 bank voles, 556 (27.73%) reacted positively by IgG ELISA against the recombinant PUUV N protein. The mean seroprevalence were of 36.6% (± 3.6) in Croix-Scaille and 23.1% (± 2.3) in Elan but fluctuated largely among years. Seroprevalence was significant lower ($\text{Khi}^2 = 69.13$) in station 3 (15.4%) than in the other three stations ($36.8\% \pm 4.1$, $33.9\% \pm 4.0$ and $35.9\% \pm 7.3$ respectively in station 2, 4 and 5).

3.2. PUUV microevolution

3.2.1. Phylogenetic analysis

The final dataset was constituted by 56 sequences that were deposited in GenBank database. Accession numbers, sampling year and station were indicated in Table S1. At the small geographic scale of these two forests, after phylogenetic analysis by the Maximum Likelihood method, we observed a strong geographical structure of the phylogenetic tree. Three clusters of genetic variant (here called B, C and D) were shown to circulate in Croix-Scaille forest (green), only one (A) in Elan forest (red) (Figure 3). Two genetic variants of the virus from Elan belonged to the cluster B of Croix-Scaille.

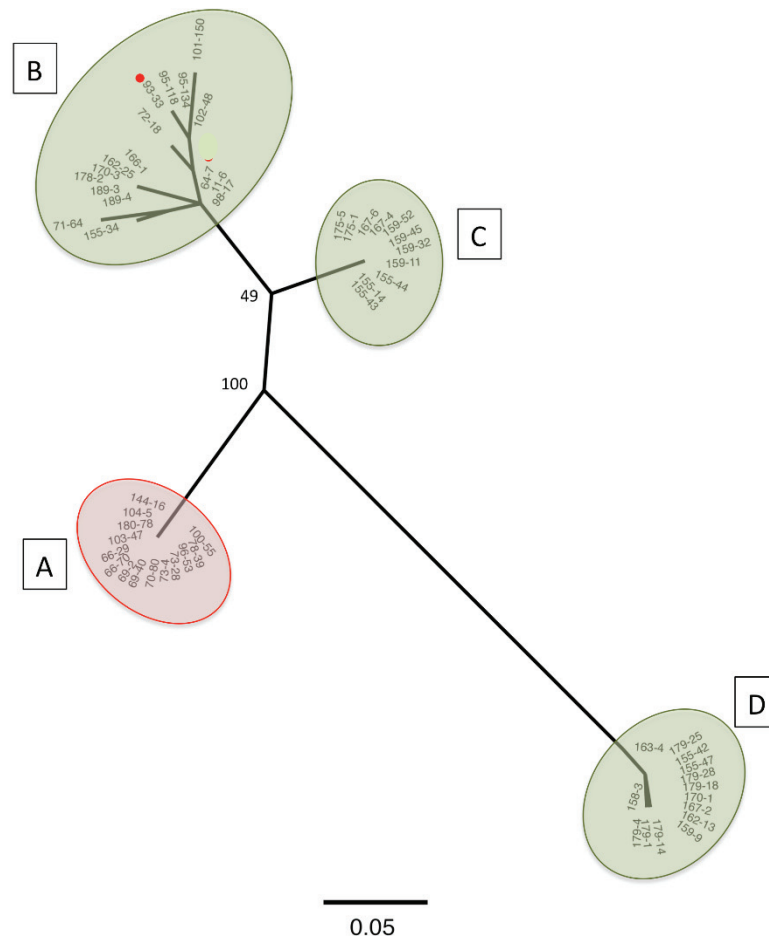


Figure 3: Unrooted phylogenetic tree based on the S segment of PUUV isolates (354–654 nt) constructed using ML method and HKY85 + I substitution model. Bootstrap percentages from 1000 resamplings are indicated at the two main nodes. Clusters of sequences from Elan (A) and Croix-Scaille (B, C, D) forests are coloured respectively in red and green. Red point indicates isolate from Elan forest clustering within Croix-Scaille clusters. Scale bar indicates nucleotide substitution per site.

3.2.2. Genetic Diversity of PUUV isolates

Analyses of the 56 sequences overall mean distance estimate that the average evolutionary divergence between all PUUV viruses circulating in all the four stations was 0,037 base substitutions per site. All the mutations were silent, reflecting a strong purifying selection in the segment of the coding region of the nucleoprotein gene targeted by the RT-PCR.

(A) Within group	average nb of different bases	average % of base difference
Station 2	10,81	3,5
Station 5	8,51	2,8
Station 3	2,22	0,7
Station 4	3,71	1,2

(B) Between group		average nb of different bases	average % of base difference
Station 2	Station 5	10,76	3,6
Station 2	Station 3	12,44	4,1
Station 5	Station 3	11,96	3,9
Station 2	Station 4	12,58	4,2
Station 5	Station 4	11,96	3,9
Station 3	Station 4	2,65	0,9

Table 2. Estimates of Average Evolutionary Divergence over Sequence Pairs (A) within station. and (B) between stations. The average number of base differences per sequence (and the corresponding percentage) within each station and between stations are shown. The analysis involved 56 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All ambiguous positions were removed for each sequence pair. There were a total of 303 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 [1].

Combined analysis of the phylogenetic tree (Figure 3) and the Average Evolutionary Divergence (Table 2) showed that isolates from the Elan forest stations have a very low genetic diversity (mean of 0,95%) compared to those from the Croix-Scaille forest stations which show a mean of 3,15% but stations 2 and 5 can diverge up to 3,6% which is similar to the mean divergence between Elan and Croix-Scaille forests (4%) (Table 2).

3.2.3. Evolution of genetic diversity over times

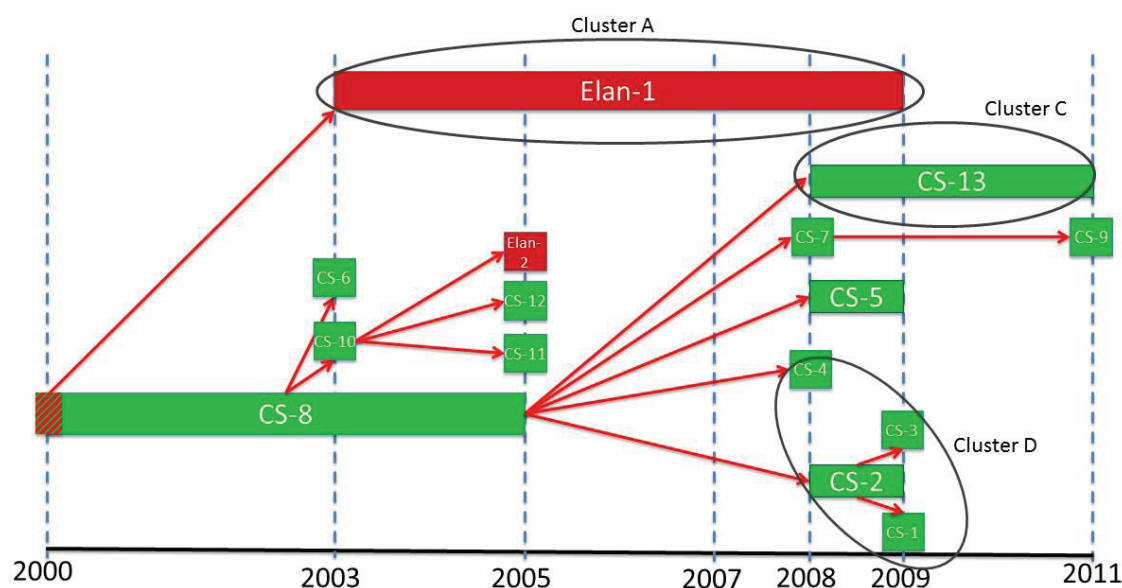


Figure 4. Presence and diversification of the sub-lineages isolated in Elan (in red) and Croix-Scaille forests (in green) over time.

Figure 4 shows a representation of the different genetic variants identified over time in the different forests in order to better understand the local dynamics of PUUV evolution. Isolates from the Elan forest (Elan-1) show very slow evolution along time most of them (grouped within cluster A) belonging to the same genotype from 2003 to 2009 regardless of their trapping station.

Isolates from Croix-Scaille present much more genetic diversity. Isolates grouped within clusters B (CS-5 to CS-12) and D (CS-1 to CS-4) are spread between station 2 and 5 and show more diversification over time (8 different genotypes detected in 10 years within isolates of cluster B and 4 in 2 years within isolates of cluster D). Isolates of cluster C (CS-13) are found specifically in station 2, interestingly they show no diversification over their two years detection period.

3.3. Population dynamics of rodents

The closed-model estimates of population size of bank voles showed large fluctuations throughout the study period. In Elan, the presence of bank voles was observed overall years of the study (the only exception in 2006 in station 4 which was caused by a clear-cutting of trees on the trapping site). A similar pattern was observed in the two stations 3 and 4 with remarkable peaks of

abundance in 2003, 2005, 2007 for both stations and 2009 for station 4 (figure 2). In contrast, the two stations in Croix-Scaille showed years without estimated abundance of bank voles because of too few trapping bank voles (2004 and 2006 in the two stations and in addition in 2002 for station 5) and peaks of abundance of bank voles were only observed in 2005 and 2009 in station 2 while abundance of station 5 remained practically constant and lower than the other stations (figure 2).

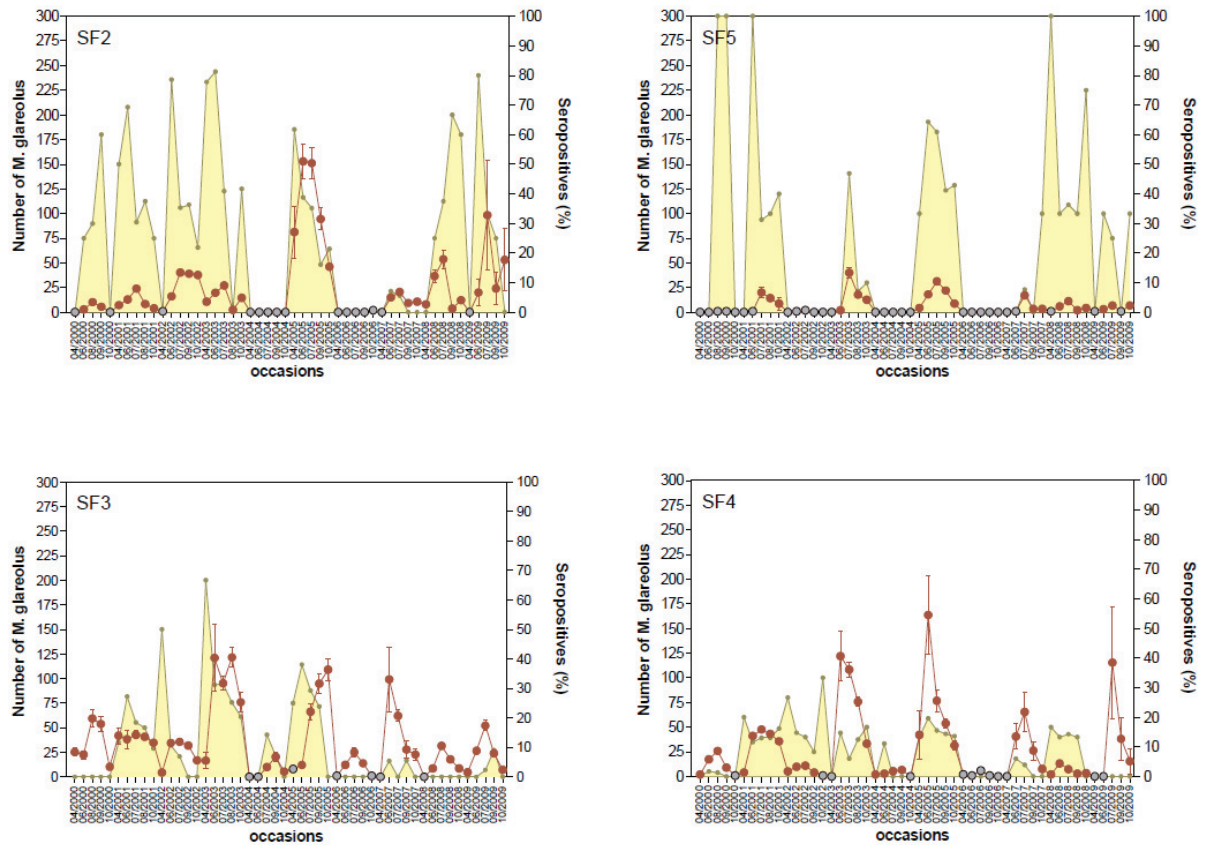


Figure 2. On Y axis to the left: number of bank voles captured (grey) when abundance is not estimated because of too few trapping bank voles and estimated abundance by capture-recapture (red). On Y axis to the right: seroprevalence (yellow) in percent calculated with abundance estimated by CMR. SF2: station2, SF3: station3, SF4: station 4 and SF5: station 5.

The most parsimonious models for apparent survival and seniority probabilities of bank voles were well supported with $\Delta AIC > 2$ and a better Akaike weight (> 0.70) compared to other models (Table 1, supporting information). The variance inflation factor obtained from bootstrap procedure indicated a reasonable fit to a general model. However, we used QAICc, adjusted by $\hat{c} = 1.83$, to account for overdispersion in our results for model selection and report adjusted standard errors.

The Cormack–Jolly–Seber model indicated that survival probabilities were constant in time for each site but differed between sites, ranging from 0.09 in site 5 to 0.31 in site 4. The Pradel model selection also indicated significant differences between sites but no time variation in the seniority probabilities that ranged from 0.07 (site 5) to 0.27 (site 4) (Table 2). Mean of survival and seniority probabilities were lower in Croix-Scaille than in Elan (table 2). However, recruitment parameters ($1-\gamma$ and f) indicated higher recruitment rates in Croix-Scaille than in Elan (table 2) and especially in station 5.

Station	Survival (ϕ) ^a	Gamma (γ) ^b	1-Gamma ^b	Recruitment (f) ^b
Croix-Scaille				
sf2	0,231	0,186	0,814	1,011
sf5	0,094	0,071	0,929	1,230
<i>mean</i>	<i>0,278</i>	<i>0,128</i>	<i>0,871</i>	<i>1,120</i>
Elan				
sf3	0,160	0,134	0,866	1,034
sf4	0,315	0,267	0,733	0,865
<i>mean</i>	<i>0,317</i>	<i>0,200</i>	<i>0,799</i>	<i>0,949</i>

^a Estimation from capture-recapture analysis.

^b Estimation obtained from Pradel formulation.

Table 2. Demographic parameters by all four stations.

4. Discussion

Seropositive rodents were found in both types of site, with or without human cases associated. Seroprevalence fluctuated largely among years but there was no clear difference of seroprevalence between sites with and without human cases associated.

Both viral microevolution and population dynamics of bank voles had different pattern between sites with and without human cases associated. In Elan forest (stations 3 and 4), genetic diversity was low and only one genetic variant was found from 2000 to 2009. In Elan, bank voles was observed overall years of the study (except in 2006 in station because of human activities). In Croix-Scaille forest (stations 2 and 5), genetic diversity was higher than in Elan forest and many transient variants were found during the same period. Collapses of populations were observed over several years. Mean survival was lower and recruitment higher in Croix-Scaille forest than in Elan forest. This pattern of population suggest a more stable settlement of rodents in Elan whereas voles settlement in Croix-Scaille forest was less sustainable and more dependent of rodent migration from other sites.

All the genetic variants highlighted in this study belong to the Central European lineage as the other French PUUV isolates, but different sub-lineages exist in France, strains from Ardennes being significantly divergent than those from Jura and Orleans (Castel et al., 2015). Isolates from Ardennes forests belongs to the “Ardennes sub-lineage”, together with Belgian isolates (Monchatre-Leroy et al., 2018). A microevolution process with accumulation of point mutations at a very local geographic scale as highlighted in this study, resulting in the generation of few preferred genotypes (Razzauti et al., 2008 ; Razzauti et al., 2013), could constitute an hypothesis to explain this co-circulation of PUUV strains in France. The distribution and genetic variability of PUUV circulating in France until now remains poorly studied and understood. Our study certainly underestimated genetic diversity because of using of sequences obtained from PCR product, originally designed for virus detection and thus, located in the central conserved domain (suggested as containing the RNA binding domain) of the N protein of hantaviruses (Xu et al., 2002 ; Kaukinen et al., 2005). Accordingly, this bias did not change the finding and even reinforce the stronger diversification of PUUV in Croix-Scaille forest.

At the local scale of the both studied forest, higher genetic diversity of PUUV in Croix-Scaille should be due to more numerous bank voles emigrating from various sites and potentially infected with different viral variants. These results were consistent with a previous study in the same forest that has shown that asymmetric bank vole migration was detected from large forest to hedge wood (Guivier et al., 2011). The authors suggested also that this migration participated in the reintroduction of PUUV in hedge network. Here, even if Croix-Scaille belongs to a large area of

forest, it is a spruce forest, a less favourable habitat for bank voles. Then, the stations 2 and 5 could be assimilated to the hedge network of the study of Guivier (Guivier et al., 2011). The station 5 belong to a large area with spruce and the station 2 to a smaller area surrounded by broad-leaves trees and this difference may explain slight differences in genetic diversity of PUUV and dynamics population of bank voles between these two stations. The station 2 was more easily concerned by migration explaining less extinction of rodent population than in station 5 with a high genetic diversity of PUUV.

Several hypothesis should be formulated to explain the reason why only sites in our study with high genetic viral diversity and unsustainable settlement of rodents were associated with human cases. Sauvage et al. (2007) have hypothesized that the vole demographic pattern affects the PUUV dynamics, allowing in the cyclic case the human contamination which would be prevented in stable vole populations. By modelisation, the authors showed that a high proportion of chronically infected animals excreting low levels of virus did not cause a sufficient environmental contamination to have human infections. In contrary, with an unstable dynamics population, environmental contamination should reach a level compatible with human infection. Our field results were consistent with this model and complemented these finding with viral aspects. In Croix-Scaille, infection of one rodent by different kind of viral variant or by a viral variant not present in the original population of the rodent should lead to an infection less controlled by its immune system with more important viral excretion. Few studies have explored the effect of small genetic variations as seen in microevolution on virus phenotype but it seems that few differences could change deeply virus phenotype. The sequences of wild type PUUV and Vero E6 cell-cultured variants of PUUV showed only one different position of the non-coding sequence of the virus whereas replicative properties of the both viruses were different (Lundkvist et al., 1997). Another study *in vivo* (Sironen et al., 2008) highlighted the fixation of one silent mutation during *in vivo* transmission suggesting an advantage in viral transmission.

The recent discovery of NE cases far outside the reported area for NE distribution in France (Reynes et al., 2015) emphasizes the need for a better knowledge of the mechanisms leading to human infections. It is now clear that there is several keys factors explaining the existence of endemic area: environment, bank voles and virus. Surprisingly, the influence of PUUV diversity in such system is less studied than the others components. Assessment of PUUV distribution and diversity in France, and the impact of this diversity on rodent infection should be now considered.

References

- Augot, D., Sauvage, F., Boue, F., Bouloy, M., Artois, M., Demerson, J.M., Combes, B., Coudrier, D., Zeller, H., Cliquet, F., Pontier, D., 2008. Spatial and temporal patterning of bank vole demography and the epidemiology of the Puumala hantavirus in northeastern France. *Epidemiol. Infect.* 136, 1638–1643. <https://doi.org/10.1017/S0950268808000423>
- Bailey, L.L., Simons, T.R., Pollock, K.H., 2004. Estimating detection probability parameters for plethodon salamanders using the robust capture-recapture design. *Journal of Wildlife Management* 68, 1–13. [https://doi.org/10.2193/0022-541X\(2004\)068\[0001:EDPPFP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2193/0022-541X(2004)068[0001:EDPPFP]2.0.CO;2)
- Burnham, K.P., Anderson, D.R., 2010. Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach, 2. ed. ed. Springer, New York, NY.
- Castel, G., Couteaudier, M., Sauvage, F., Pons, J.-B., Murri, S., Plyusnina, A., Pontier, D., Cosson, J.-F., Plyusnin, A., Marianneau, P., Tordo, N., 2015. Complete Genome and Phylogeny of Puumala Hantavirus Isolates Circulating in France. *Viruses* 7, 5476–5488. <https://doi.org/10.3390/v7102884>
- Cormack, R.M., 1964. Estimates of survival from the sighting of marked animals. *Biometrika* 51, 429–438. <https://doi.org/10.1093/biomet/51.3-4.429>
- Deter, J., Bryja, J., Chaval, Y., Galan, M., Henttonen, H., Laakkonen, J., Voutilainen, L., Vapalahti, O., Vaheri, A., Salvador, A.R., Morand, S., Cosson, J.-F., Charbonnel, N., 2008. Association between the DQA MHC class II gene and Puumala virus infection in *Myodes glareolus*, the bank vole. *Infect. Genet. Evol.* 8, 450–458. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2007.07.003>
- Escutenaire, S., Chalon, P., Verhagen, R., Heyman, P., Thomas, I., Karelle-Bui, L., Avsic-Zupanc, T., Lundkvist, A., Plyusnin, A., Pastoret, P., 2000. Spatial and temporal dynamics of Puumala hantavirus infection in red bank vole (*Clethrionomys glareolus*) populations in Belgium. *Virus Res.* 67, 91–107. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(00\)00136-2](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(00)00136-2)
- Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2010. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27, 221–224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
- Guivier, E., Galan, M., Chaval, Y., Xuéreb, A., Ribas Salvador, A., Poulle, M.-L., Voutilainen, L., Henttonen, H., Charbonnel, N., Cosson, J.F., 2011. Landscape genetics highlights the role of bank vole metapopulation dynamics in the epidemiology of Puumala hantavirus. *Mol. Ecol.* 20, 3569–3583. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05199.x>
- Guivier, E., Galan, M., Malé, P.-J.G., Kallio, E.R., Voutilainen, L., Henttonen, H., Olsson, G.E., Lundkvist, A., Tersago, K., Augot, D., Cosson, J.-F., Charbonnel, N., 2010. Associations between MHC genes and Puumala virus infection in *Myodes glareolus* are detected in wild populations, but not

- from experimental infection data. *J. Gen. Virol.* 91, 2507–2512.
<https://doi.org/10.1099/vir.0.021600-0>
- Jolly, G.M., 1965. Explicit estimates from capture-recapture data with both death and immigration-stochastic model. *Biometrika* 52, 225–248. <https://doi.org/10.1093/biomet/52.1-2.225>
- Kaukinen, P., Vaheri, A., Plyusnin, A., 2005. Hantavirus nucleocapsid protein: a multifunctional molecule with both housekeeping and ambassadorial duties. *Arch. Virol.* 150, 1693–1713.
<https://doi.org/10.1007/s00705-005-0555-4>
- Kendall, W.L., 2001. The robust design for capture-recapture studies: analysis using program MARK, in: Rebecca Field, Robert J. Warren, Henryk Okarma, Paul R. Sievert (Eds.), *Wildlife, Land and People: Priorities for the 21st Century*. The Wildlife Society, Bethesda, Maryland, pp. 357–360.
- Lee, H.W., Baek, L.J., Johnson, K.M., 1982. Isolation of Hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, from wild urban rats. *J. Infect. Dis.* 146, 638–644.
<https://doi.org/10.1093/infdis/146.5.638>
- Lefort, V., Longueville, J.-E., Gascuel, O., 2017. SMS: Smart Model Selection in PhyML. *Mol. Biol. Evol.* 34, 2422–2424. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx149>
- Lundkvist, A., Cheng, Y., Sjölander, K.B., Niklasson, B., Vaheri, A., Plyusnin, A., 1997. Cell culture adaptation of Puumala hantavirus changes the infectivity for its natural reservoir, *Clethrionomys glareolus*, and leads to accumulation of mutants with altered genomic RNA S segment. *J. Virol.* 71, 9515–9523.
- Lundkvist, A., Wiger, D., Hörling, J., Sjölander, K.B., Plyusnina, A., Mehl, R., Vaheri, A., Plyusnin, A., 1998. Isolation and characterization of Puumala hantavirus from Norway: evidence for a distinct phylogenetic sublineage. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 11), 2603–2614.
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-11-2603>
- Mazurkiewicz, M., Rajska-Jurgiel, E., 1998. Spatial behaviour and population dynamics of woodland rodents. *Acta Theriologica* 43, 137–161. <https://doi.org/10.4098/AT.arch.98-11>
- Monchatre-Leroy, E., Murri, S., Castel, G., Calavas, D., Boué, F., Hénau, V., Marianneau, P., 2018. First insights into Puumala orthohantavirus circulation in a rodent population in Alsace, France. *Zoonoses and Public Health* 65, 540–551. <https://doi.org/10.1111/zph.12464>
- Olsson, G.E., Leirs, H., Henttonen, H., 2010. Hantaviruses and their hosts in Europe: reservoirs here and there, but not everywhere? *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10, 549–561.
<https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0138>
- Olsson, G.E., White, N., Ahlm, C., Elgh, F., Verlemeyr, A.-C., Juto, P., Palo, R.T., 2002. Demographic factors associated with hantavirus infection in bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Emerging Infect. Dis.* 8, 924–929. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020037>

- Penalba, C., Lanoux, P., Halin, P., Le Guenno, B., 1995. [Hemorrhagic fever with renal syndrome]. *Rev Med Interne* 16, 229. [https://doi.org/10.1016/0248-8663\(96\)80700-4](https://doi.org/10.1016/0248-8663(96)80700-4)
- Plyusnin, A., Sironen, T., 2014. Evolution of hantaviruses: co-speciation with reservoir hosts for more than 100 MYR. *Virus Res.* 187, 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.01.008>
- Plyusnin, A., Vapalahti, O., Lehv  slaiho, H., Apekina, N., Mikhailova, T., Gavrilovskaya, I., Laakkonen, J., Niemimaa, J., Henttonen, H., Brummer-Korvenkontio, M., 1995. Genetic variation of wild Puumala viruses within the serotype, local rodent populations and individual animal. *Virus Res.* 38, 25–41. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(95\)00038-r](https://doi.org/10.1016/0168-1702(95)00038-r)
- Plyusnina, A., Razzauti, M., Sironen, T., Niemimaa, J., Vapalahti, O., Vaheri, A., Henttonen, H., Plyusnin, A., 2012. Analysis of complete Puumala virus genome, Finland. *Emerging Infect. Dis.* 18, 2070–2072. <https://doi.org/10.3201/eid1811.120747>
- Pollock, K.H., 1982. A Capture-Recapture Design Robust to Unequal Probability of Capture. *The Journal of Wildlife Management* 46, 752. <https://doi.org/10.2307/3808568>
- R Core Team 2016. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from URL <https://www.R-project.org/>.
- Razzauti, M., Plyusnina, A., Henttonen, H., Plyusnin, A., 2013. Microevolution of Puumala hantavirus during a Complete Population Cycle of Its Host, the Bank Vole (*Myodes glareolus*). *PLoS ONE* 8, e64447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064447>
- 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>
- Razzauti, M., Plyusnina, A., Sironen, T., Henttonen, H., Plyusnin, A., 2009. Analysis of Puumala hantavirus in a bank vole population in northern Finland: evidence for co-circulation of two genetic lineages and frequent reassortment between strains. *J. Gen. Virol.* 90, 1923–1931. <https://doi.org/10.1099/vir.0.011304-0>
- Reynes, J.-M., Dutrop, C.-M., Carli, D., Levast, M., Fontaine, N., Denoyel, G.-A., Philit, J.-B., 2015. Puumala hantavirus infection in Is  re: Geographic extension of this zoonosis in France. *Med Mal Infect* 45, 177–180. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2015.03.001>
- Rowe, J.E., St Jeor, S.C., Riolo, J., Otteson, E.W., Monroe, M.C., Henderson, W.W., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Nichol, S.T., 1995. Coexistence of several novel hantaviruses in rodents indigenous to North America. *Virology* 213, 122–130. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1552>
- Sauvage, F., Langlais, M., Pontier, D., 2007. Predicting the emergence of human hantavirus disease using a combination of viral dynamics and rodent demographic patterns. *Epidemiol. Infect.*

- 135, 46–56. <https://doi.org/10.1017/S0950268806006595>
- Sauvage, F., Penalba, C., Vuillaume, P., Boue, F., Coudrier, D., Pontier, D., Artois, M., 2002. Puumala hantavirus infection in humans and in the reservoir host, Ardennes region, France. *Emerging Infect. Dis.* 8, 1509–1511. <https://doi.org/10.3201/eid0812.010518>
- Schönrich, G., Rang, A., Lütke, N., Raftery, M.J., Charbonnel, N., Ulrich, R.G., 2008. Hantavirus-induced immunity in rodent reservoirs and humans. *Immunol. Rev.* 225, 163–189. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00694.x>
- Seber, G.A.F., 1965. A note on the multiple-recapture census. *Biometrika* 52, 249–260. <https://doi.org/10.1093/biomet/52.1-2.249>
- Sironen, T., Kallio, E.R., Vaheri, A., Lundkvist, A., Plyusnin, A., 2008. Quasispecies dynamics and fixation of a synonymous mutation in hantavirus transmission. *J. Gen. Virol.* 89, 1309–1313. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83662-0>
- Streicker, D.G., Lemey, P., Velasco-Villa, A., Rupprecht, C.E., 2012. Rates of viral evolution are linked to host geography in bat rabies. *PLoS Pathog.* 8, e1002720. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002720>
- Vaheri, A., Henttonen, H., Voutilainen, L., Mustonen, J., Sironen, T., Vapalahti, O., 2013a. Hantavirus infections in Europe and their impact on public health. *Rev. Med. Virol.* 23, 35–49. <https://doi.org/10.1002/rmv.1722>
- Vaheri, A., Strandin, T., Hepojoki, J., Sironen, T., Henttonen, H., Mäkelä, S., Mustonen, J., 2013b. Uncovering the mysteries of hantavirus infections. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 539–550.
- Wahlström, M., Bäck, A.T., Lundkvist, Å., Niemimaa, J., Razzauti, M., Sironen, T., Karlsson, M., Tonteri, E., Voutilainen, L., Henttonen, H., 2015. Life-long shedding of Puumala hantavirus in wild bank voles (*Myodes glareolus*). *Journal of General Virology* 96, 1238–1247. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000076>
- White, G.C., Burnham, K.P., 1999. Program MARK: survival estimation from populations of marked animals. *Bird Study* 46, S120–S139. <https://doi.org/10.1080/00063659909477239>
- Xu, X., Severson, W., Villegas, N., Schmaljohn, C.S., Jonsson, C.B., 2002. The RNA binding domain of the hantaan virus N protein maps to a central, conserved region. *J. Virol.* 76, 3301–3308. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.7.3301-3308.2002>

Supporting Information

Table 1. Survival and seniority probabilities models selection

Models	AICc	$\Delta AICc$	W_i	np
Survival rates				
φ (station) p (t)	395,91	0,00	0,70	13
φ (.) p (t)	398,02	2,11	0,25	10
φ (station) p (station)	403,44	7,54	0,02	8
φ (station) p (.)	403,98	8,07	0,01	5
φ (t) p (.)	404,96	9,05	0,01	10
φ (.) p (.)	405,08	9,17	0,01	2
φ (t) p (t)	406,15	10,24	0,00	17
φ (t) p (station)	407,83	11,92	0,00	13
φ (.) p (station)	408,11	12,20	0,00	5
φ (station*t) p (station)	420,64	24,73	0,00	37
φ (station*t) p (.)	422,12	26,22	0,00	35
φ (station) p (station*t)	426,12	30,22	0,00	40
φ (.) p (station*t)	426,55	30,64	0,00	37
φ (station*t) p (t)	427,16	31,25	0,00	42
φ (t) p (station*t)	436,36	40,45	0,00	44
φ (station*t) p (station*t)	440,68	44,78	0,00	50
Seniority probabilities				
Υ (station) p (t)	379,25	0,00	0,81	13
Υ (.) p (t)	382,25	3,01	0,18	10
Υ (t) p (.)	390,39	11,14	0,00	10
Υ (t) p (t)	390,79	11,55	0,00	17

$\Upsilon(t) p(\text{station})$	392,56	13,31	0,00	13
$\Upsilon(\text{station}^*t) p(t)$	401,30	22,06	0,00	41
$\Upsilon(\text{station}^*t) p(.)$	401,33	22,09	0,00	35
$\Upsilon(\text{station}) p(\text{station})$	402,34	23,09	0,00	8
$\Upsilon(\text{station}^*t) p(\text{station})$	402,38	23,13	0,00	37
$\Upsilon(\text{station}) p(.)$	403,01	23,77	0,00	5
$\Upsilon(.) p(.)$	405,20	25,95	0,00	2
$\Upsilon(.) p(\text{station})$	407,46	28,21	0,00	5
$\Upsilon(\text{station}) p(\text{station}^*t)$	408,77	29,53	0,00	40
$\Upsilon(.) p(\text{station}^*t)$	410,45	31,20	0,00	37
$\Upsilon(t) p(\text{station}^*t)$	415,92	36,68	0,00	44
$\Upsilon(\text{station}^*t) p(\text{station}^*t)$	421,41	42,17	0,00	52

Notes: The number of parameters including the intercept and the error term is np; Akaike's information criterion corrected for small sample size is AICc; differences in AICc with the most parsimonious model are ΔAICc , and Akaike weights are W_i .

Table 2. Estimated demographic parameters of bank voles by the four stations studied.

Station	Estimate	SE	Lower	Upper
Survival rates				
sf2	0,231	0,076	0,115	0,410
sf3	0,160	0,057	0,077	0,303
sf4	0,315	0,079	0,183	0,485
sf5	0,094	0,085	0,015	0,421
Seniority probabilities				
sf2	0,186	0,055	0,100	0,319
sf3	0,134	0,043	0,070	0,241
sf4	0,267	0,060	0,166	0,399
sf5	0,071	0,063	0,012	0,329

Chapitre 3 – Epidémiologie spatiale et temporelle des néphropathies épidémiques et de la séroprévalence au virus Puumala chez les rongeurs hôtes : identification des principaux facteurs de risque environnementaux en Europe par revue bibliographique.

L'étude précédente issue du suivi sur dix ans des variants de PUUV dans les Ardennes soulève l'importance de l'environnement sur la séroprévalence des rongeurs et l'épidémiologie des NE soit par son influence sur la dynamique de population des rongeurs, soit par son influence sur la survie du virus dans l'environnement. En effet, la survie du virus dans le milieu extérieur varie en fonction des conditions environnementales. Plusieurs études ont ainsi montré que PUUV est sensible à la chaleur, à l'humidité et aux rayons ultra-violets (Kallio et al., 2006 ; Kraus et al., 2005), ce qui peut impacter la transmission indirecte au sein de la population de rongeurs ou à l'Homme. L'environnement apparaît donc comme un paramètre important de l'épidémiologie de l'infection à PUUV chez son réservoir et l'Homme.

Le troisième volet de la thèse a consisté à effectuer une revue des études sur l'influence des facteurs environnementaux sur l'incidence des NE, d'une part, et sur la séroprévalence du PUUV chez les rongeurs d'autre part, en discriminant les effets liés à la dynamique de population des rongeurs et à la persistance du virus dans l'environnement. Une telle synthèse de la littérature englobant les facteurs d'influence d'infection chez l'Homme et le rongeur en fonction des différentes voies de transmission ; directe via la dynamique de population des rongeurs et indirecte via la survie du virus dans l'environnement et la dynamique de population de rongeurs, n'avait pas encore été réalisée à notre connaissance. Cet état des lieux exhaustif des connaissances avait pour objectif d'inventorier les différentes approches méthodologiques mises en œuvre dans ces études et d'identifier les principaux facteurs d'influence de l'infection de l'Homme et des rongeurs par PUUV, afin de les comparer.

Pour ce faire, une revue systématique a été réalisée dans Scopus et Pubmed avec les mots clefs « hantavirus », « Europe » et « environnement ». Sur les 236 résumés identifiés, ont été sélectionnés 28 articles portant sur PUUV dans divers pays d'Europe.

Cette analyse a révélé en premier lieu la diversité des approches expérimentales. Les échelles de temps considérées allaient de quelques jours à quatre ans pour les études portant sur la séroprévalence des rongeurs et d'un à 23 ans pour celles sur les cas de NE. La même variabilité a été constatée pour les échelles spatiales avec d'un à 40 sites de capture dans les études sur la séroprévalence des rongeurs et des régions de moins de 100km² à plus de 200 000 km² pour les études sur les cas humains.

Pour la revue, les facteurs environnementaux ont été regroupés en trois groupes d'influence : climat, disponibilité alimentaire et configuration du paysage. Au sein de chaque groupe, les variables explicatives testées étaient multiples. Ainsi, pour estimer la disponibilité alimentaire pour les rongeurs, 11 variables différentes ont été utilisées. Ces variables représentaient la disponibilité alimentaire à des saisons différentes (fruits secs pour l'hiver et végétaux pour la belle saison), en tenant compte des

variations saisonnière pour certaines (production végétale via le niveau de photosynthèse) et annuelle pour d'autres (volume de glands et de faines) ou à partir de proxy (via le pourcentage de couverture du sol par certaines essences végétales d'intérêt pour les rongeurs). De même, les variables « séroprévalence » et « nombre de cas de NE » n'étaient pas calculées de la même manière entre les différentes études. Le nombre de cas humains était déterminé sur une année entière ou sur les 12 premières semaines de l'année. Concernant la séroprévalence des rongeurs, les méthodologies de terrain sont diverses, la population sensible nécessaire au calcul de la séroprévalence est estimée soit en index de capture, soit en nombre total de captures ou en nombre de captures à l'hectare. Les échelles spatiales sont beaucoup plus petites et plus précises pour les rongeurs que pour les humains dont la localisation géographique du lieu de contamination est plus incertaine. De plus, pour les incidences humaines, les études prennent en compte des entités administratives qui ne sont pas forcément homogènes en termes de conditions environnementales et d'épidémiologie de NE. Enfin, les échelles de temps sont aussi beaucoup plus petites pour les rongeurs que pour l'Homme, compte tenu de la difficulté plus importante de réalisation des études sur le terrain ciblant les rongeurs. Cette durée courte, qui ne couvre pas l'ensemble d'un cycle de pullulation de rongeurs soulève des questions sur la variation éventuelle de l'effet des variables environnementales sur l'infection des rongeurs en fonction des phases du cycle.

L'hétérogénéité des méthodologies rend la comparaison des résultats entre études difficile à interpréter particulièrement pour les facteurs présentant des influences diverses en fonction des lieux, des saisons, des années (par exemple, la pluie et les indices de structuration du paysage). Certains facteurs ont été identifiés comme ayant un effet sur le nombre de cas de NE et la séroprévalence de rongeurs dans plusieurs études, c'est le cas de la disponibilité alimentaire et la température de l'hiver précédent. Le nombre de cas de NE et la séroprévalence de rongeurs augmentent avec la disponibilité alimentaire. Les influences sont opposées pour la température de l'hiver précédent qui a un lien positif avec le nombre de cas humains et un lien négatif avec la séroprévalence, ce qui suggère des mécanismes d'influence sous-jacents différents : via la dynamique de rongeurs pour les cas de NE et via la survie virale pour la séroprévalence. D'autres facteurs (pluie, indices de structuration du paysage, densité et composition du couvert végétal, taille des particules du sol) ont été identifiés comme pouvant également jouer un rôle mais leurs effets varient fortement entre études où ces facteurs n'ont été testés qu'à une seule reprise.

Ce travail de revue laisse entrevoir la complexité des liens entre environnement, épidémiologie de l'infection à PUUV chez les rongeurs et épidémiologie des NE chez l'Homme. Un même facteur environnemental peut avoir des influences opposées sur la séroprévalence des rongeurs en fonction d'un effet considéré soit via la survie du virus en milieu extérieur (par exemple, favorisé par un climat froid) soit via l'abondance des rongeurs (favorisé par un hiver doux). A cela s'ajoute la complexité d'interprétation du lien entre séroprévalence des rongeurs et incidence humaine quand un même facteur tel que la température de l'hiver les influence de manière opposée. Enfin, l'acquisition de connaissances sur les facteurs conditionnant la dynamique à long terme des populations de rongeurs et sur les facteurs de survie du virus dans l'environnement apparaît importante pour bien comprendre les mécanismes en jeu et leur part respective dans l'infection à PUUV des rongeurs et de l'Homme.

Publication 3 :

Les résultats de l'étude ont été publiés dans la revue « Transboundary and Emerging diseases »

Monchatre-Leroy E., Crespin L., Boué F., Marianneau P., Calavas D. and Hénaux V. 2017 Spatial and Temporal Epidemiology of Nephropathia Epidemica Incidence and Hantavirus Seroprevalence in Rodent Hosts: Identification of the Main Environmental Factors in Europe. *Transboundary emerging diseases*. 2017 Aug;64(4):1210-1228.

Article 3

Spatial and temporal epidemiology of nephropathia epidemica incidence and hantavirus seroprevalence in rodent hosts: identification of the main environmental factors in Europe

Title: Spatial and temporal epidemiology of nephropathia epidemica incidence and hantavirus seroprevalence in rodent hosts: identification of the main environmental factors in Europe

Short title: Epidemiology of nephropathia epidemica incidence and hantavirus seroprevalence in rodent hosts

Authors

E. Monchatre-Leroy¹, L. Crespin², F. Boué¹, P. Marianneau³, D. Calavas⁴, V. Hénau⁴

¹ ANSES, Laboratoire de la rage et de la faune sauvage, Nancy, 54220, France

² INRA, UR346 d'Epidémiologie Animale, F63122 Saint Genès Champanelle, Université de Lyon, F-69000, Lyon; Université Lyon 1; CNRS, UMR5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, F-69622, Villeurbanne, France.

³ ANSES, Unité de virologie, Laboratoire de Lyon, Lyon, 69364, France

⁴ ANSES, Unité d'épidémiologie, Laboratoire de Lyon, Lyon, 69364, France

Correspondence

E. Monchatre-Leroy - ANSES, Laboratoire de la rage et de la faune sauvage
CS 40009 - Domaine de Pixérécourt - 54220 Malzéville, France

Tel.: +33 3 83 29 89 50

Fax: +33 3 83 29 89 58

E-mail: elodie.monchatre-leroy@anses.fr

Keywords

Puumala virus, hantavirus, Europe, environment, epidemiology

Summary

In Europe, the increasing number of nephropathia epidemica (NE) infections in humans, caused by Puumala virus carried by bank voles (*Myodes glareolus*), has triggered studies of environmental factors driving these infections. NE infections have been shown to occur in specific geographical areas characterized by environmental factors that influence the distribution and dynamics of host populations and virus persistence in the soil. Here, we review the influence of environmental conditions (including climate factors, food availability and habitat conditions) with respect to incidence in humans and seroprevalence in rodents, considering both direct and indirect transmission pathways. For each type of environmental factor, results and discrepancies between studies are presented and examined in light of biological hypotheses. Overall, food availability and temperature appear to be the main drivers of host seroprevalence and NE incidence, but data quality and statistical approaches varied greatly among studies. We highlight the issues that now need to be addressed and suggest improvements for study design in regard to the current knowledge on hantavirus epidemiology.

INTRODUCTION

Hantaviruses are worldwide, rodent-borne, zoonotic pathogens that have caused an increasing number of clinically apparent human infections in Europe over the last 10 years (Heyman et al., 2011). The major hantavirus in Western Europe is the Puumala virus (PUUV) (Heyman et al., 2011), which is carried by bank voles (*Myodes glareolus*). Infection in humans causes a mild form of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) called nephropathia epidemica (NE). Three other hantaviruses have been reported in Europe: Dobrava virus (DOBV), Tula virus (TULV) and Seoul virus (SEOV). DOBV is carried by yellow-necked mice (*Apodemus flavicollis*) and infection in humans causes a more severe form of HFRS (Klempa et al., 2013). TULV is less studied because it is considered non-pathogenic to humans (Schlegel et al., 2012), except in particular cases such as immunocompromised patients (Zelená et al., 2013 but see Reynes et al., 2015). Its hosts are *Microtus* rodents, in particular the common vole (*M. arvalis*). SEOV has caused a limited number of human infections in Western Europe (Dupinay et al., 2014); this hantavirus is carried by rats (*Rattus* sp.) which are synanthropic, and SEOV ecology is entirely determined by human activities.

Hantavirus infection in humans occurs indirectly through inhalation of aerosolized excreta of infected rodents. Viral transmission between rodents is direct via biting, grooming, shared nesting, etc. or indirect, via the environment (Kallio et al., 2006). Rodents develop chronic infections, but clinical signs have never been reported (Bernshtein et al., 1999). However, previous studies have documented tissue pathologies in infected hosts (Lyubsky et al., 1996; Netski et al., 1999) or reported a delay in maturation in infected female hosts (Telfer et al., 2005). In addition, recent studies have suggested that hantaviruses decrease the probability of survival of their hosts (Luis et al., 2012; Tersago et al., 2012).

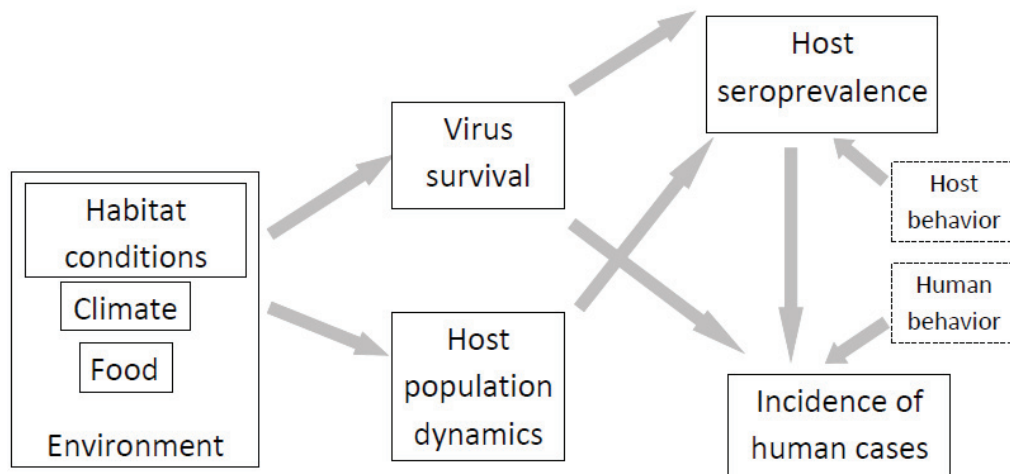
NE incidence has striking temporal and geographical variations (Heyman et al., 2012) with three- to four-year cycles in northern Europe and a more irregular pattern in southern Europe (Heyman et al., 2009). Accordingly, the last epidemics occurred in 2010 in Germany and France, whereas in Norway, Finland and Sweden, no major outbreak has been observed since 2008 (Heyman et al., 2011). Human incidence varies among countries: 12 cases per 100, 000 inhabitants were reported between 2005 and 2010 in Luxembourg compared with 566 cases per 100, 000 inhabitants in Finland for the same period (Heyman et al., 2011).

In each country, endemic regions are generally forested areas where rodent hosts live. The relationship between rodent density, hantavirus seroprevalence in animals and incidence in humans is complex. Tremendous fluctuations in abundance of wild rodent populations occur both seasonally and annually (Crespin et al., 2002), depending on climate and environmental conditions (Andreo et al., 2009; Davis et al., 2005), and have been suggested to play an important role in the cycle of the virus seroprevalence in the rodent reservoir (Niklasson et al., 1995). A reservoir is commonly defined as one or more epidemiologically connected populations or environments in which the pathogen can be permanently maintained and from which infection is transmitted to the defined target population (Haydon et al., 2002). The frequency of PUUV infection in the rodent reservoir is correlated with rodent population density in several studies (Clement et al., 2009; Escutenaire et al., 2000) but is not correlated in others studies (Sauvage et al., 2002; Thoma et al., 2014). Moreover, although several studies have reported a link between rodent abundance (or density) and incidence in humans (Dobly et al., 2012; Haredasht

et al., 2011; Heyman et al., 2009; Reusken et al., 2013; Tersago et al., 2008), others have not (Augot et al., 2008; Linard et al., 2007b; Sauvage et al., 2002). Due to the short lifespan of rodents, the variation in PUUV prevalence in bank voles has short-term effects on the number of human infections (Kallio et al., 2009); however, another study showed that the presence of infected rodents does not automatically lead to cases of human infection (Augot et al., 2008). Finally, it is still unclear whether rodent populations alone can maintain the virus, or if the habitat (Kallio et al., 2006; Sinclair et al., 2008) is a necessary component of the reservoir, especially when rodent abundance is very low (Sauvage et al., 2003).

NE infections have been shown to occur in specific areas characterized by environmental factors that influence the distribution and dynamics of host populations and virus persistence in the soil (Figure 1). These conditions may change over time, altering the dynamics of bank vole populations, PUUV infections and the risk for humans. Spatially mapping these factors would help to predict current spatiotemporal dynamics of epidemics and future changes in the distribution of NE risk. Spatial epidemiology is the study of the causes and consequences of spatial variation in disease risk or incidence. Its methodology is based on the hypothesis that disease occurrence or diffusion is limited to specific areas, characterized by specific geographical attributes, due to spatial variation in the biological or physical conditions that influence the distribution of pathogens, vectors and/or hosts (Ostfeld et al., 2005). In addition to ecological data acquired directly in the field, spatial epidemiology benefits from the routine acquisition of satellite remote-sensing environmental data at very small temporal and spatial scales, and the development of more user-friendly geographic information systems (GIS) to display and analyze these raw data. In particular, this approach has been increasingly used to understand vector-borne disease ecology (Graham et al., 2004). Combining climate factors (such as rain, wind or temperature) with satellite-acquired data describing the environment (such as vegetation type, ground temperature or soil moisture) in GIS makes it possible to characterize vector habitats and assess the distribution of vector species at different areas and times. For example, this approach has been applied to predict the risk of transmission of malaria by *Anopheles* sp., tick-borne encephalitis by *Ixodes* sp., and trypanosomiasis by *Glossina* sp. (Kalluri et al., 2007).

To date, reviews on PUUV epidemiology have focused on describing (1) the current knowledge of country-specific triggers of human infections in France, Germany and Belgium (Heyman et al., 2012), (2) the association between the occurrence of human PUUV infections in Europe and climate variability (Roda Gracia et al., 2015) or reservoir, virus and anthropogenic risk factors (Reusken et al., 2013), or (3) the factors affecting prevalence in rodent populations (Khalil et al., 2014a). Here, we conducted a comprehensive review of the influence of environmental conditions (climate factors, food availability and habitat conditions) with respect to NE incidence and rodent seroprevalence, considering both direct and indirect (through virus survival outside the host) transmission pathways. This review highlights the main drivers of both NE incidence and host seroprevalence, but also underlines the difficulty in comparing results given the heterogeneity in data quality and statistical approaches among studies. We examine these results in terms of risk prediction and highlight the issues that future research needs to address.



METHODS

We searched Pubmed and Scopus with the following string: hantavirus AND Europe AND environment. Retrieved abstracts were read by the same person, and inclusion/exclusion criteria (described below) were applied to identify the final set of articles for full-text reading. The initial set of selected articles included all publications in English describing original research on spatial and temporal determinants of hantavirus infection in rodents. We focused on PUUV responsible of NE. No articles on DOBV and TULV were identified. We excluded studies on SEOV, which is carried by synanthropic hosts, because conditions promoting SEOV infections in both rodents and humans may well be very different from hantaviruses carried by wild rodents. The selection was narrowed down to studies documenting host seroprevalence and/or NE incidence. Studies using only seroprevalence in humans (without clinical signs) as an indicator of infection were excluded because long-term persistence (20 years or more) of IgG antibody response hinders the study of the impact of environmental conditions on NE incidence (Niklasson et al., 1990). Additional relevant studies identified in the reference lists of selected articles were included if the inclusion and exclusion criteria were met.

Selected articles were analyzed to identify the role and relative importance (when possible) of environmental factors influencing the epidemiology of PUUV. In this paper, “environment” was taken to mean the biotic and abiotic factors surrounding an organism or a population. Consequently, this term included all the factors that have an impact on survival and multiplication of the hosts or/and pathogen. Three main drivers, summarizing the environment, were investigated to examine the results reported in the literature on the impact of the environment on PUUV epidemiology: food availability, climate conditions (temperature or precipitation measured at different seasons and with different time lags) and habitat conditions (land cover or habitat fragmentation, type of vegetation, and properties of the soil). To be sure that no article was missed, supplementary researches with food availability, climate or habitat instead of environment in the string “Hantavirus and Europe and environment” were done. We explored the relationships between each explanatory variable — connected to rodent host population dynamics (food availability, climate conditions and habitat) or survival of virus outside the host (Figure 1) — and host seroprevalence or NE incidence (dependent variables).

RESULTS

Literature search

A total of 236 abstracts were identified in the two databases, among which 28 articles were selected after applying the inclusion and exclusion criteria. Selected papers included field, statistical and mathematical modeling studies (Table 1). Twelve articles involved Belgium, four described studies conducted in France (including one reporting results from both France and Belgium), five in Germany, five in Sweden, two in Finland (including one reporting results from both Finland and Belgium) and one in Belgium, France, Finland, Netherlands and Sweden. There was high heterogeneity among studies regarding time and geographical scales. Field studies included 1 to 40 trapping sites and monitoring varied from three days to four years. Studies on PUUV infection in humans were based on NE incidence data collected for 1 to 23 years in areas ranging from less than 100 km² to more than 200 000 km².

Food availability

Several studies (n=19) analyzed the impact of food availability in PUUV-bank vole relationships (Table 2), hypothesizing that food availability, through its impact on rodent population abundance, influences hantavirus seroprevalence in rodents (five articles) and, in turn, the numbers of human cases (11twelve articles). It is of interest to note that indirect approaches were generally used to assess the role of food availability *sensu lato* on host seroprevalence or NE incidence.

Host seroprevalence

First, several authors carried out an inventory of all plant species (not only those eaten by voles) in a given radius surrounding each trap and investigated the association of plant species abundance (vegetation index) with the seroprevalence of captured voles. Heyman et al. (2009) found no clear association whereas Olsson et al. (2005) reported a positive association between the density of some plant species and host seroprevalence. The comparison between the two studies was difficult because the plant families and number of species included in the two studies were different: tree density, understory vegetation, grasses and mosses with particular attention to wild blackberry (*Rubus fruticosus*) in the first study versus spruce (*Picea* sp.), tree lichens and bilberry (*Vaccinium* sp.) in the second study. Moreover, the use of exhaustive inventories of plant species makes it difficult to determine the effects of plant species as cover providers (thereby decreasing predation) or as food providers. The former effect is linked to the habitat and is further described below (see “Habitat conditions”).

In contrast with these studies, Thoma et al. (2014) focused on only one plant, beech (*Fagus sylvatica*), and used the percent of area covered by this species as an indirect measure of the importance of this resource, whose hard fruit was known to be consumed by bank voles. This indicator failed to predict rodent seroprevalence but its relevance is controversial because it was based on the presence of only one plant species among all those consumed by bank voles (Quéré and Le Louarn, 2011) and therefore did not represent the entire diet of bank voles (hard fruits account for about 40% of the rodent diet in spring in Poland (Wereszczynska and Nowakowski, 2004).

Secondly, to assess food availability other authors used the normalized difference vegetation index (NDVI), which measures the photosynthetic activity of the vegetation and thus is considered as an indicator of the quantity of green vegetation. NDVI is computed as:

$$\text{NDVI} = (\text{IR} - \text{R}) / (\text{IR} + \text{R}),$$

where IR and R are the reflectance values in the infrared and visible (red) wavelengths, respectively, as measured by satellites. Thus, NDVI is related to the proportion of photosynthetically absorbed radiation (IR-R) normalized to the sum of the infrared (IR) and red (R) light bands. High values of NDVI indicate an important amount of green vegetation. On the one hand, several studies reported a positive correlation between NDVI measured at a given date or month and the number of animals trapped annually (Linard et al., 2007b) and annual seroprevalence in rodents (Tersago et al., 2008). On the other hand, Linard et al. (2007b) found no effect of NDVI on annual seroprevalence in rodents. Therefore, the link between seroprevalence and food availability as assessed by NDVI has not been clearly established. However, in Linard et al. (2007b) and Tersago et al., (2008), NDVI values were extracted from a satellite image acquired on a single day (3 July 2001) that did not match the dates of trapping sessions from which the seroprevalence of rodents was estimated (several capture sessions in 2004 and 2005). Given that NDVI values change with the season and between years (Petorelli et al., 2005), the relevance of investigating the link between only one value of NDVI and annual rodent seroprevalence is questionable.

NE incidence

As for host seroprevalence, indirect measures of single plant species were used to estimate the importance of food availability in connection to NE incidence: percent of area covered by beech (Piechotowski et al., 2008; Reil et al., 2015a Schwarz et al., 2009) or by spruce (*Piceas abis*) (Zeimes et al., 2012). Three studies (Piechotowski et al., 2008; Schwarz et al., 2009; Zeimes et al., 2012) reported a positive association with NE incidence; no association was found in the study of Reil et al. (2015a). However, selecting a single plant species among all those consumed by bank voles hinders the identification of the underlying causes of the observed association (food versus shelter effect) (Schwartz et al., 2009; Zeimes et al., 2012).

Other studies used instead reflectance measured by satellites. Two studies found a positive association between NDVI and annual NE incidence (Linard et al., 2007b; Viel et al., 2011). In connection with NDVI, the reflectance of different wavelengths measured by satellite, has allowed the expression of other indices, such as the normalized difference water index (NDWI), which measures the water content of leaves and is thus considered as an indicator of the quality of vegetation. Barrios et al. (2013) observed a positive association between the NE risk derived from annual incidence and mean NDWI of the previous year. In the same study, NE risk was positively correlated to the cumulative and maximal values of the enhanced vegetation index (EVI; an optimized index derived from NDVI) over the course of the growing season (Barrios et al., 2013). Likewise, an increase in annual NE incidence in Wallonia, Belgium, during 2005-2008, occurred in a context of a gradual increase in the length of the growing season (LGS), *i.e.* the annual period of photosynthetic activity, calculated from EVI or NDVI (Barrios et al., 2010), suggesting that the amount of vegetation positively affects human infections in the French Ardennes and southern Belgium. More recently Zeimes et al. (2015) assessed the impact of food availability on NE risk in different ecological regions defined according to two climate characteristics (mean annual temperature and the annual temperature range). The association

between NE risk and EVI differed markedly between ecoregions. For some ecoregions including a part of the French Ardennes and a large part of Belgium, a negative association was found between NE risk and EVI. In contrast, a positive association was found in some ecoregions including Finland and a large part of Sweden, suggesting that mechanisms underlying the impact of food availability differ geographically. These results are difficult to compare with those of Barrios et al. (2013) who used data on NE risk at the whole Belgium scale (which includes three ecoregions) and besides worked with cumulative and maximal values of EVI.

Finally, to quantify food availability, a few authors estimated directly the “mast production”, *i.e.* the quantity of seeds produced by beech (*F. sylvatica*) or/and oak (*Quercus robur* and *Q. petraea*). A positive association was systematically found between NE incidence and mast production estimated from the year before (Clement et al., 2009; Haredasht et al., 2011; Haredasht et al., 2013; Piechotowski et al., 2008; Reil et al., 2015a; Reil et al. 2015b; Schwarz et al., 2009; Tersago et al., 2009;). This indicator reflects only food availability regardless of shelter, but, again, does not take into account the entire rodent diet.

In conclusion, NDVI (or related indices) is a quantitative indicator of green vegetation and therefore may more accurately reflect food availability for bank voles than an inventory of plant species or the cover afforded by only one plant species. However, NDVI cannot assess the production of seeds available during winter. A variable combining NDVI and mast production would likely better reflect food availability for bank voles.

Climate conditions

Several studies (n= 16) analyzed the impact of weather on host seroprevalence and NE incidence (Table 3).

Host seroprevalence

A negative association was found between host seroprevalence and temperature of previous autumn or winter (Linard et al., 2007b; Tersago et al., 2008) or mean annual temperature (Thoma et al., 2014). This negative association echoes an experiment that documented longer periods of virus persistence outside the host with colder temperatures (Kallio et al. (2006). The survival of the virus would therefore be one element in explaining the seroprevalence of rodents.

Results are less conclusive for precipitation. Relationships between precipitation and host seroprevalence are difficult to compare because studies did not consider precipitation during the same season. A two-year study (Linard et al., 2007b) found no significant association between host seroprevalence and the average daily precipitation during the previous autumn (odds ratio (OR) = 0.99; p-value = 0.1 calculated from parameter estimates for logistic regression) while there was a significant one with the average daily maximum temperature of the previous winter (OR = 0.81; p-value < 0.001). Tersago et al. (2008) showed a positive association between host seroprevalence in 2005 and the average precipitation in the previous spring; however, only univariate analyses were conducted, preventing the comparison with other factors.

NE incidence

For temperature and NE incidence, two strong associations had been repeatedly reported (Table 3). First, in four studies, there was a positive relationship between yearly NE incidence and the summer temperatures (mean daily temperatures from June to August) recorded two years before (Barrios et al., 2013; Clement et al., 2009; Reil et al., 2015b; Tersago et al., 2009). It was suggested that temperatures at the onset of tree bud formation influence mast production and thus food availability two years later, with a concurrent positive effect on rodent populations and PUUV incidence. Second, in four papers, the temperature of the previous autumn or winter was positively correlated with annual NE incidence (Haredasht et al., 2013; Piechotowski et al., 2008; Schwarz et al., 2009; Tersago et al., 2009). In agreement with this correlation, Petterson et al. (2008) reported that a large NE outbreak occurred in 2007 in Sweden following a winter with particularly mild temperatures, little snow and hard ice cover. This correlation was attributed to higher survival of bank voles during mild winters, allowing earlier reproduction in spring, a larger population susceptible to infection and thus a larger number of infected rodents. However, this hypothesis conflicts with the findings that host seroprevalence is negatively related to temperature of previous autumn or winter (cf previous paragraph) highlighting that main driver of rodent's infection seem different from those of human's infection.

Several studies failed to find any association between NE incidence and precipitation measured during different seasons for up to three years prior to the detection of NE cases (Clement et al., 2009; Linard et al., 2007b; Tersago et al., 2009; Viel et al., 2011), despite a monitoring period ranging from three to 15 years (Table 3). In contrast, a long-term study (Khalil et al., 2014b with data from 1990 to 2012) found a positive association between the number of rainy days during winter (December-March) and annual NE incidence (from July to June year +1). Zeimes et al. (2015) also found a positive association between NE risk and annual precipitation in some ecoregions covering France, Belgium, Sweden and Finland. This positive association was attributed either to the better survival of the virus outside the host in a wet environment (Zeimes et al., 2015) or to the incursion of rodents into human dwellings in search of food and shelter due to adverse weather (Khalil et al., 2014b).

The role of snow was explored in studies conducted in Sweden. The exceptionally low snowfall in December 2006 was followed by an unexpectedly large outbreak of NE cases in Västerbotten County in 2007 (Pettersson et al., 2008). The authors hypothesized that the lack of snow forced bank voles to seek refuge and food in barns, increasing human exposure. This hypothesis was however not confirmed in another study using data from another region in Sweden for the 1991-1998 period: there was no association between snow depth or duration of snow cover and annual NE cases (Zeimes et al., 2012). The discrepancy between these results can be attributed to the differences in the ecoregions involved in each study (Zeimes et al., 2015). There are few studies on the role of snow in more southern countries. One exception concluded that snow cover had a positive impact on the predicted probability of infection in humans in the two ecoregions that included France (Zeimes et al., 2015)

Habitat conditions

In addition to dynamic variables, static factors such as landscape, type of vegetation and soil properties were investigated in relation to host seroprevalence and NE incidence (14 studies in Table 4).

Host seroprevalence

In forest habitats, voles prefer areas with a dense understory that provides protection against predators (Escutenaire et al., 2002; Heyman et al., 2009). Although a density-dependent transmission rate of hantavirus in the rodent reservoir has been suggested (Clement et al., 2009), the expected relationship between host seroprevalence and density of the understory is not clear. Thus, although the number of captures was significantly higher in areas with dense ground vegetation (such as shrub layer cover) (Escutenaire et al., 2002), seasonal or annual host seroprevalence in dense ground vegetation was not significantly different from other habitats (Escutenaire et al., 2002; Thoma et al., 2014). In contrast, deadwood layer coverage, via the protection it provides, led to higher rodent density and was positively associated with seasonal or annual seroprevalence (Olsson et al., 2005; Thoma et al., 2014).

There was a negative association between annual or seasonal host seroprevalence and less attractive environments for rodents, such as herbs (Thoma et al., 2014), pines (Olsson et al., 2005, or 25-30 year-old forests (Voutilainen et al., 2012).

Mixed results were found about the association between habitat fragmentation and host seroprevalence due to the very different fragmentation measures used. There was no association between a contiguity index (assessing the spatial connectedness of cells within a patch) and host seroprevalence (Linard et al., 2007b). In another study of population genetics based on ten sites (Guivier et al., 2011), sites with high genetic diversity and low genetic isolation (thus sites in continuous forests) appeared to show stronger PUUV prevalence than sites with low genetic diversity and high genetic isolation exposed to more genetic drift (sites in hedge networks, i.e. fragmented landscapes). In their publication, Guivier et al. (2011) also suggested that this PUUV pattern followed a source-sink dynamics model, as defined by Pulliam (1988), between forests and hedge networks, with the sites in large continuous forest constituting the source compartment. Finally, Dobly et al. (2012) showed lower seroprevalence in a fragmented site surrounded by a low-quality environment for rodents. This result should nonetheless be taken with caution because the study design did not distinguish between the relative influence of fragmentation and habitat quality.

NE incidence

Annual NE incidence was linked to vegetation land cover classes; the most significant positive risk factor was the preeminence of a broad-leaved forest (Barrios et al., 2012; Zeimes et al., 2015) or the volume of spruce in northern countries (Zeimes et al., 2012).

As previously seen with findings relating to host seroprevalence, results are less conclusive for fragmentation index. There was no association between NE incidence and a contiguity index in a study in Belgium (Linard et al., 2007b) while there was a positive association in a study in Sweden (Zeimes et al., 2012). In the study about ecoregions (Zeimes et al., 2015), a positive association was found in both Sweden and Belgium.

Indirect transmission through virus survival outside the host

Host seroprevalence

Virus survival was considered in most articles on host seroprevalence (seven out of nine). Most studies (n=8) investigating the effect of viral survival on host seroprevalence suggested that variation in PUUV survival in the soil was due to climate factors (Table 3).

Accordingly and in favor of the hypothesis of indirect transmission, rodent seroprevalence was found to increase with cold winter and summer temperatures (Linard et al., 2007b; Tersago et al., 2008), low mean annual temperature (Dobly et al., 2012; Thoma et al., 2014), spring precipitations (Tersago et al., 2008), or habitat humidity (Dobly et al., 2012; Verhagen et al., 1986). Sauvage et al. (2002) reported higher seroprevalence in north-facing than in south-facing slopes probably due to the higher humidity in the north-facing slopes, which are less exposed to the sun. Annual solar radiation was negatively associated with host seroprevalence in Thoma et al. (2014), suggesting inactivation of hantavirus by UV irradiation.

To our knowledge, no study investigated the impact of UV irradiation on PUUV persistence; but, the Hantaan virus (a rodent-borne hantavirus that circulates in Asia; Hardestam et al., 2007) is inactivated by UV radiation in experimental conditions (Kraus et al., 2005). In addition, the association between forest habitat fragmentation and host seroprevalence (Guivier et al., 2011) may be related to high variation in UV radiation, humidity and temperature in fragmented environments that may alter conditions required for virus survival.

Only one study (Linard et al., 2007b) considered the impact of the biological and physical characteristics of the soil but no association was found between the proportion of thin particles in Belgium and annual host seroprevalence.

NE incidence

Although human contamination is exclusively indirect, most studies on NE incidence (10 out of 14) attributed the influence of environmental or climate factors on NE incidence to their impact on host population dynamics only, not taking into account the potential role of virus survival in the habitat. By modeling the impact of habitat (monthly carrying capacity for voles) and climate factors (average monthly precipitation three months before and average current monthly temperature) on both host population dynamics and virus persistence outside the host, Haredasht et al. (2011) predicted monthly NE incidence observed in Belgium. This model demonstrates the importance of considering the association between environmental factors and virus survival outside the host to estimate NE incidence. This model also predicted a negative influence of average monthly temperature on NE incidence of the same month, due to lower PUUV survival in high-temperature soil. Another model (Zeimes et al., 2015) showed a positive association between NE risk and soil humidity and a negative association with maximum summer temperatures in ecoregions spanning France and Belgium. These results clearly suggest an increase in human risk with improved virus survival. However, in other ecoregions spanning Finland and a large part of Sweden, results were reversed, with a positive association between NE risk and maximum temperature found in summer and a negative association found between NE risk and soil humidity. Thus, viral survival seemed to be lower in ecoregions spanning Finland and Sweden, although the authors did not provide clear explanation for the contradictory results between the ecoregions.

The current lack of methods to detect hantaviruses outside the host and the interactions among the environmental drivers of hantavirus persistence in the soil make it challenging to investigate these effects in the field. The impact of the biological and physical characteristics of the soil on virus survival has rarely been considered in field studies (Table 2). There was a positive association between the proportion of thin particles and NE incidence (Linard et al., 2007b). In contrast, mean grain size was

not correlated with annual NE incidence (Zeimes et al., 2012). Moreover, although snow depth (as an indicator of cold temperatures, high humidity and protection against UV) is expected to enhance virus survival in soil, there was a negative association with annual NE cases in Zeimes et al. (2012). This negative association was suggested to reflect the influence of snow depth on host abundance; snow depth in Sweden is known to increase the bank vole population by providing shelter against predators and harsh weather (Pettersson et al., 2008; Zeimes et al., 2012).

DISCUSSION

Spatial epidemiology promotes a better understanding of PUUV distribution by identifying the factors that affect the dynamics of disease infection in rodents and humans. The articles selected in this review investigated associations between two dependent variables (rodent host seroprevalence and NE incidence) and several factors, including food availability, habitat characteristics (land cover or habitat fragmentation) or climate factors (temperature or precipitation or snow at different seasons and with different time lags) considering both direct and indirect (through virus survival outside the host) transmission pathways.

This review gave strong support that food availability and temperature of previous autumn/winter influence both NE incidence and host seroprevalence. NE incidence was positively associated with these two drivers whereas host seroprevalence was positively associated with food availability and negatively associated with temperature. More specifically, although not observed in all studies, NDVI (or NDVI-based food availability indices) appears to positively influence host seroprevalence and NE at different spatial and temporal scales, regardless of the type of statistical analysis, highlighting the robustness of this result. In contrast, results on the relationship between NE incidence and/or host seroprevalence and other independent variables (e.g. precipitation) appear less robust. More work is clearly needed to evaluate the robustness of these relationships.

Beyond the large difference in statistical methodology found among studies in the literature, two major points contributed to this heterogeneity in results:

(1) Multiplicity of independent and dependent variables

Several definitions, more or less related, have been used by different authors to compute the dependent variables investigated in this review (i.e., rodent host seroprevalence and NE incidence) and the risk factors associated with them.

First, there was a high number of independent variables used to describe a given risk factor. For instance, the review of results on the influence of food availability on PUUV infection in rodents illustrated that the strength of the association depends strongly on the choice of the independent variable. Overall, our review showed that no less than 11 different variables were used for assessing food availability (Table 2) and they were all indirect and/or incomplete measures of the bank vole diet. The same issue was raised in studies investigating the effect of landscape fragmentation or habitat characteristics (Guivier et al., 2011; Linard et al., 2007b; Zeimes et al., 2012). This large variability in independent variables makes it difficult to compare findings among studies and then to draw general conclusions on PUUV epidemiology. More integrative studies, designed to investigate multi-factorial

scenarios instead of single-factor hypotheses (and therefore potentially including several environmental variables) certainly should help alleviate this difficulty in the future (Hansson 1998).

Second, most studies used annual NE incidence but — again — calculated it in different ways. In general, NE incidence was calculated as the total number of human cases per calendar year (Barrios et al., 2010; Clement et al., 2009; Haredasht et al., 2013; Pettersson et al., 2008; Schwarz et al., 2009; Tersago et al., 2009) or as the number of human cases in the first 12 weeks of each year as an indicator of annual incidence for comparison with year 2015 for which only data for the first 12 weeks were available (Reil et al., 2015b). Only one study out of 16 (Khalil et al., 2014b) used the number of human cases from July in year t to June in year $t+1$. However, given the importance of seasonality in rodent population dynamics, we suggest that future surveys linking NE incidence and PUUV prevalence determine incidence season by season, or at least distinguish between rodent breeding and non-breeding periods.

Third, field methods were generally very heterogeneous, with marked differences in design among studies, e.g., in number of traps or in frequency and in duration of trapping sessions, etc. Then, host populations at risk and consequently seroprevalence were derived from diverse sources, e.g., a trapping index (Haredasht et al., 2013; Heyman et al., 2009; Olsson et al., 2005; Thoma et al., 2014), the total number of captured bank voles (Escutenaire et al., 2002; Linard et al., 2007b; Voutilainen et al., 2012) or the number of captured bank voles per hectare (Dobly et al., 2012; Tersago et al., 2008). For seroprevalence, the use of trapping indices to estimate abundance (population at risk) has been severely criticized in the small rodent ecology literature, because trapping indices rely on several, generally untested, strong assumptions to be meaningful (Nichols 1986; Williams et al., 2002). More specifically, the comparison of trapping indices at different trapping sessions requires that the probability of capture among sessions remain constant, a highly unlikely hypothesis in small rodent populations (Crespin et al., 2008). Therefore, for the sake of statistics, capture-mark-recapture models (Lebreton et al., 1992) that allow proper estimation of rodent abundance (and thus of populations at risk), because they explicitly include the modeling of this probability of capture, should be more frequently employed in future studies of rodent seroprevalence (Jenelle et al., 2007; Tersago et al., 2012).

(2) Temporal and geographical scales

There was great heterogeneity in the temporal and spatial scales at which all studies were conducted. For instance, the duration of most studies ($n=15$) on NE incidence varied from 5 to 23 years, except one of 1 year (Reil et al., 2015b). Also, studies ($n=11$) linking environmental factors and host seroprevalence typically lasted less than four years. Given that rodent population abundance is known to be much variable (Davis et al., 2005) and, at least in some parts of Europe (e.g., Fennoscandia), to undergo multi-annual population cycles (Ims et al., 2008), longer studies are needed to investigate the impact of environmental factors on host seroprevalence with sufficient variability in rodent population demography. Further, environmental factors on either NE incidence or PUUV seroprevalence were studied on large (continent scale: Zeimes et al., 2015) and small (habitat scale: Dobly et al., 2012; Escutenaire et al., 2002) areas. More specifically, most studies dealing with host seroprevalence at the rodent habitat scale used small trapping designs, whereas Boutin (1990), although in a different context (a review of food supplementation experiments in vertebrates), highlighted the need for a

large spatial scale to be able to track a statistically meaningful proportion of the vole population. Thus, we encourage researchers to monitor bank vole populations at larger spatial and temporal scales than usually done.

Concerning NE incidence, three critical points on spatial scales can be raised. First, because the exact places where humans are infected are usually not known, most studies on NE incidence used instead the place of residence of patients (except Zeimes et al., 2012). However, some case-control studies for NE indicated that infection did not occur in the vicinity of homes, but were linked with activities practiced in the forest (Crowcroft et al., 1999; Van Loock et al., 1999). Therefore, using environmental factors assessed at a local scale (around the place of residence) may lead to misinterpretations because patient residence areas may be far away from the areas where transmission occurs. Studies investigating risk factors of NE incidence thus require a relatively large spatial scale to evaluate the environmental conditions comprehensively over the study area (e.g. Barrios et al., 2010; Barrios et al., 2013; Zeimes et al., 2015). Secondly, most studies were conducted at one spatial scale only ($n = 25$). However, two studies (Barrios et al., 2012; Zeimes et al., 2015) show that the geographical scale alters the relationships between environmental factors and NE incidence. This scale-dependence of biological processes has long been recognized in both geography and ecology (Marceau et al., 1999): some factors are known to have consistent and robust scaling relationships, whereas others are known to behave erratically in response to changing scales (Wu et al., 2004). Considering only one spatial scale when investigating a biological process, such as PUUV epidemiology, may thus lead to overlook some aspects that link PUUV distributions in humans and rodents with environmental factors. Third, most studies investigated relationships between environmental factors and NE incidence within artificial administrative entities, such as municipalities (Barrios et al., 2012), cantons (Viel et al., 2011), counties (Khalil et al., 2014b; Pettersson et al., 2008; Thomas et al., 2009), states (Piechotowski et al., 2008; Schwarz et al., 2009) or countries (Clement et al., 2009; Tersago et al., 2008) ($n = 14$ out of 16 articles about NE incidence). Nevertheless, Zeimes et al. (2015) recently explored the links between NE risk and environmental factors at the continent scale, using seven “natural” climate-based ecoregions that did not correspond to the six countries under concern (a given country could spread over two or three eco-regions). As expected, some ecoregions showed opposite relationships between NE risk and environmental factors, which further underlines the importance of using meaningful spatial units and not artificial administrative entities to evaluate links between NE incidence and environmental factor. In ecological studies of infectious diseases, the choice of spatial unit is frequently dictated by the availability of data; however, more biologically relevant criteria must be included to fully understand the spatial variation of NE incidence (see Arsenault et al., 2013).

In conclusion, environmental factors affect PUUV distribution in human and rodent hosts at several spatial scales. Although some environmental factors have the same effect regardless of the study scale, others vary from region to region and at large scales (Zeimes et al., 2015). Therefore, we encourage future studies to cover several spatial scales for a better understanding of PUUV epidemiology.

Development of knowledge

The present review indicates that most studies investigate the relationships between environmental factors and host seroprevalence or NE incidence, assuming an impact via host population dynamics. Climate clearly has an effect on rodent population dynamics through its impact on winter survival, reproductive success, and population abundance (Haredasht et al., 2013; Linard et al., 2007b; Puceck

et al., 1993). More broadly, the environment has an impact on population dynamics as shown by the differences among the various European regions. However, the mechanisms underlying the links between bank vole population size, PUUV seroprevalence in the host and NE incidence are still not well understood and these mechanisms may vary among region. This gap in our knowledge calls for long-term demographic studies of bank vole populations coupled with monitoring of NE incidence on appropriate time and space scales.

Besides environmental drivers, other factors have been suggested to account for the dynamics of PUUV prevalence in wild bank vole populations, particularly those related to the infection cycle in individual rodents. For example, we expected the number of recently infected voles to be an important driver of hantavirus incidence in rodents because newly infected individuals shed high amounts of virus, unlike chronically infected ones (Bernshtein et al., 1999; Sauvage et al., 2007). However, this hypothesis has recently been challenged by Voutilainen et al. (2015) who found that PUUV shedding in naturally infected bank voles is much longer than one month in the wild. If this finding is confirmed by other studies, current models explaining spatial variation of NE incidence (e.g., Sauvage et al., 2007) must be revised to incorporate this new aspect of transmission dynamics among rodents and, in turn, from rodents to humans. Further investigations are now needed to elucidate the links between excretion and transmission in the PUUV epidemiological system.

Third, although human behavior is potentially an important risk factor for hantavirus infection (Linard et al., 2007a) and although several aspects of rodent behavior, e.g., rodent dispersion, intraspecific aggressive behavior among weaned adults and search of food and shelter, are involved to some degree in PUUV transmission (Pettersson et al., 2008; Escutenaire et al., 2002; Deter et al., 2008), few studies have directly investigated the impact of either rodent behavior or human behavior on PUUV epidemiology (Escutenaire et al., 2002; Linard et al., 2007a). This type of “one-health” approach (Gibbs, 2014) calls for more integrative investigations including host behavior and rodent demographics, as well as social sciences to incorporate human behavior.

Finally, another area to explore is the role of the environment on host seroprevalence and NE incidence due to environmental persistence of virus. Indeed, *in vitro* experiments demonstrated the capacity of Hantaan virus to persist outside the host, depending on temperature and humidity conditions. *In vivo* experiments further demonstrated that animal contamination is possible from the environment and that the duration of virulence outside the hosts increases in wet and cold environments (Kallio et al., 2006). Virus survival in the habitat has typically been assumed to explain hantavirus persistence when the infection rate decreases in the rodent population. Accordingly, Sauvage et al. (2003), using mathematical modeling, effectively pointed out the important role of indirect transmission in rodent populations, especially during low-density periods. The quantification of the rate of viral contamination of soil through bank vole feces, urine and oropharyngeal secretions is needed to evaluate habitat contamination by rodents; yet, there is still a lack of methods to detect hantaviruses in soils. The analysis of the effect of humidity, pH or composition of the upper layer of soil on PUUV persistence, and the evaluation of the relative importance of indirect contamination in rodents are prerequisites to understanding the role of the environment as a component of the reservoir or a source of contamination.

Conclusion

Here, we reviewed and compiled the current knowledge on the key environmental drivers of PUUV infection in rodents and humans. Food availability and current and previous year temperatures appear to be important factors influencing PUUV prevalence and/or NE incidence; further investigations need to quantify the relative importance of these environmental factors and identify the secondary drivers of infection. Furthermore, to enhance our understanding of PUUV transmission (among rodents and from rodents to humans) and thus of NE risk, we encourage future studies to carry out longer field studies, to consider geographical and temporal scales carefully and to investigate the impact of both rodents' and humans' behavior. In the future, models of risk integrating knowledge on spatial and temporal environmental factors in PUUV transmission can also be used for exploring the consequences of climate change and habitat modification on the emergence of hantaviruses.

Acknowledgments

We wish to thank Coup de Puce-Expansion for their professional editing services by a native English speaker.

References

- Andreo, V., M. Lima, C. Provencal, J. Priotto and J. Polop, 2009: Population dynamics of two rodent species in agro-ecosystems of central Argentina: Intra-specific competition, land-use, and climate effects. *Popul. Ecol.*, 51, 297-306.
- Arsenault, J., P. Michel, O. Berke, A. Ravel and P. Gosselin, 2013: How to choose geographical units in ecological studies: Proposal and application to campylobacteriosis. *Spatial Spatio-temporal Epidemiol.*, 7, 11-24.
- Augot, D., F. Sauvage, F. Boue, M. Bouloy, M. Artois, J. M. Demerson, B. Combes, D. Coudrier, H. Zeller, F. Cliquet and D. Pontier, 2008: Spatial and temporal patterning of bank vole demography and the epidemiology of the Puumala hantavirus in northeastern France. *Epidemiol. Infect.*, 136, 1638-1643.
- Barrios, J. M., W. W. Verstraeten, P. Maes, J. M. Aerts, J. Farifteh and P. Coppin, 2012: Using the gravity model to estimate the spatial spread of vector-borne diseases. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 9, 4346-4364.
- Barrios, J. M., W. W. Verstraeten, P. Maes, J. M. Aerts, J. Farifteh and P. F. Coppin, 2013: Seasonal vegetation variables and their impact on the spatio-temporal patterns of nephropathia epidemica and Lyme borreliosis in Belgium. *Appl. Geogr.*, 45, 230-240.
- Barrios, J. M., W. W. Verstraeten, P. Maes, J. Clement, J. M. Aerts, S. A. Haredasht, J. Wambacq, K. Lagrou, G. Ducoffre, M. van Ranst, D. Berckmans and P. Coppin, 2010: Satellite derived forest phenology and its relation with nephropathia epidemica in Belgium. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 7, 2486-2500.
- Bernshtein, A. D., N. S. Apekina, T. V. Mikhailova, Y. A. Myasnikov, L. A. Khlyap, Y. S. Korotkov and I. N. Gavrilovskaya, 1999: Dynamics of Puumala hantavirus infection in naturally infected bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Arch. Virol.*, 144, 2415-2428.

- Boutin, S., 1990: Food supplementation experiments with terrestrial vertebrates: patterns, problems, and the future. *Can. J. Zool.*, 68, 203-220.
- Clement, J., J. Vercauteren, W. W. Verstraeten, G. Ducoffre, J. M. Barrios, A. M. Vandamme, P. Maes and M. Van Ranst, 2009: Relating increasing hantavirus incidences to the changing climate: The mast connection. *Int. J. Health Geogr.*, 8:1.
- Crespin, L., R. Verhagen, N. C. Stenseth, N. G. Yoccoz, A. C. Prévot-Julliard and J. D. Lebreton, 2002: Survival in fluctuating bank vole populations: Seasonal and yearly variations. *Oikos*, 98, 467-479.
- Crespin, L., R. Choquet, M. Lima, J. Merritt and R. Pradel, 2008: Is heterogeneity of catchability in capture-recapture studies a mere sampling artifact or a biologically relevant feature of the population? *Popul. Ecol.*, 50, 247-256.
- Crowcroft, N. S., A. Infuso, D. Lief, B. Le Guenno, J. C. Desenclos, F. Van Loock and J. Clé Ment, 1999: Risk factors for human hantavirus infection: Franco-Belgian collaborative case-control study during 1995-6 epidemic. *Brit. Med. J.*, 318, 1737-1738.
- Davis, S., E. Calvet and H. Leirs, 2005: Fluctuating rodent populations and risk to humans from rodent-borne zoonoses. *Vector Borne Zoon. Dis.*, 5, 305-314.
- Deter, J., Y. Chaval, M. Galan, B. Gauffre, S. Morand, H. Henttonen, J. Laakkonen, L. Voutilainen, N. Charbonnel and J. F. Cosson, 2008: Kinship, dispersal and hantavirus transmission in bank and common voles. *Arch. Virol.*, 153, 435-444.
- Dobly, A., C. Yzard, C. Cochez, G. Ducoffre, M. Aerts, S. Roels and P. Heyman, 2012: Spatiotemporal dynamics of Puumala hantavirus in suburban reservoir rodent populations. *J. Vector Ecol.*, 37, 276-283.
- Dupinay, T., K. C. Pounder, F. Ayral, M. H. Laaberki, D. A. Marston, S. Lacote, C. Rey, F. Barbet, K. Voller, N. Nazaret, M. Artois, P. Marianneau, J. Lachuer, A. R. Fooks, M. Pepin, C. Legras-Lachuer and L. M. McElhinney, 2014: Detection and genetic characterization of Seoul virus from commensal brown rats in France. *Virol. J.*, 11, 32.
- Escutenaire, S., P. Chalon, F. De Jaegere, L. Karelle-Bui, G. Mees, B. Brochier, F. Rozenfeld and P. P. Pastoret, 2002: Behavioral, physiologic, and habitat influences on the dynamics of Puumala virus infection in bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Emerg. Infect. Dis.*, 8, 930-936.
- Escutenaire, S., P. Chalon, R. Verhagen, P. Heyman, I. Thomas, L. Karelle-Bui, T. Avsic-Zupanc, A. Lundkvist, A. Plyusnin and P. Pastoret, 2000: Spatial and temporal dynamics of Puumala hantavirus infection in red bank vole (*Clethrionomys glareolus*) populations in Belgium. *Virus Res.*, 67, 91-107.
- Gibbs, E. P. J., 2014: The evolution of one health: A decade of progress and challenges for the future. *Vet. Rec.*, 174, 85-91.
- Graham, A. J., P. M. Atkinson and F. M. Danson, 2004: Spatial analysis for epidemiology. *Acta Trop.*, 91, 219-225.
- Guivier, E., M. Galan, Y. Chaval, A. Xuereb, A. Ribas Salvador, M. L. Pouille, L. Voutilainen, H. Henttonen, N. Charbonnel and J. F. Cosson, 2011: Landscape genetics highlights the role of bank vole metapopulation dynamics in the epidemiology of Puumala hantavirus. *Mol. Ecol.*, 20, 3569-3583.
- Hansson, L., 1998: Mast seeding and population dynamics of rodents: One factor is not enough *Oikos*, 82, 591-594.

- Hardestam, J., M. Simon, K. O. Hedlund, A. Vaheri, J. Klingström and Å. Lundkvist, 2007: Ex vivo stability of the rodent-borne Hantaan virus in comparison to that of arthropod-borne members of the Bunyaviridae family. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 2547-2551.
- Haredasht, S. A., J. M. Barrios, P. Maes, W. W. Verstraeten, J. Clement, G. Ducoffre, K. Lagrou, M. V. Ranst, P. Coppin, D. Berckmans and J. M. Aerts, 2011: A dynamic data-based model describing nephropathia epidemica in Belgium *Biosyst. Engineer.*, 109, 77-89.
- Haredasht, S. A., C. J. Taylor, P. Maes, W. W. Verstraeten, J. Clement, M. Barrios, K. Lagrou, M. Van Ranst, P. Coppin, D. Berckmans and J. M. Aerts, 2013: Model-based prediction of Nephropathia epidemica outbreaks based on climatological and vegetation data and bank vole population dynamics. *Zoon. Public Health*, 60, 461-477.
- Haydon, D. T., S. Cleaveland, L. H. Taylor and M. K. Laurenson, 2002: Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg. Infect. Dis.*, 8, 1468-1473.
- Heyman, P., C. S. Ceianu, I. Christova, N. Tordo, M. Beersma, M. Joao Alves, A. Lundkvist, M. Hukic, A. Papa, A. Tenorio, H. Zelena, S. Essbauer, I. Visontai, I. Golovljova, J. Connell, L. Nicoletti, M. van Esbroeck, S. Gjeruldsen Dudman, S. W. Aberle, T. Avsic-Zupanc, G. Korukluoglu, A. Nowakowska, B. Klempa, R. G. Ulrich, S. Bino, O. Engler, M. Opp and A. Vaheri, 2011: A five-year perspective on the situation of haemorrhagic fever with renal syndrome and status of the hantavirus reservoirs in Europe, 2005-2010. *Eurosurveillance*, 16, 1-6.
- Heyman, P., R. V. Mele, L. Smajlovic, A. Dobly, C. Cochez and C. Vandenvelde, 2009: Association between habitat and prevalence of hantavirus infections in bank voles (*Myodes glareolus*) and wood mice (*apodemus sylvaticus*). *Vector-Borne Zoon. Dis.*, 9, 141-146.
- Heyman, P., B. R. Thoma, J. L. Marié, C. Cochez and S. S. Essbauer, 2012: In search for factors that drive hantavirus epidemics. *Front. Physiol.*, 3, 1-23.
- Ims, R. A., J. A. Henden and S. T. Killengreen, 2008: Collapsing population cycles. *Trends Ecol. Evol.*, 23, 79-86.
- Jennelle, C. S., E. G. Cooch, M. J. Conroy and J. C. Senar, 2007: State-specific detection probabilities and disease prevalence. *Ecol. Appl.*, 17, 154-167.
- Kallio, E. R., M. Begon, H. Henttonen, E. Koskela, T. Mappes, A. Vaheri and O. Vapalahti, 2009: Cyclic hantavirus epidemics in humans - Predicted by rodent host dynamics. *Epidemics*, 1, 101-107.
- Kallio, E. R., J. Klingström, E. Gustafsson, T. Manni, A. Vaheri, H. Henttonen, O. Vapalahti and Å. Lundkvist, 2006: Prolonged survival of Puumala hantavirus outside the host: Evidence for indirect transmission via the environment. *J. Gen. Virol.*, 87, 2127-2134.
- Kalluri, S., P. Gilruth, D. Rogers and M. Szczur, 2007: Surveillance of arthropod vector-borne infectious diseases using remote sensing techniques: A review. *PLoS Pathogens*, 3, 1361-1371.
- Khalil, H., B. Hornfeldt, M. Evander, M. Magnusson, G. Olsson and F. Ecke, 2014a: Dynamics and drivers of hantavirus prevalence in rodent populations. *Vector Borne Zoon. Dis.*, 14, 537-551.
- Khalil, H., G. Olsson, F. Ecke, M. Evander, M. Hjertqvist, M. Magnusson, M. O. Löfvenius and B. Hörnfeldt, 2014b: The importance of bank vole density and rainy winters in predicting nephropathia epidemica incidence in northern Sweden. *PloS ONE*, 9(11), e111663.
- Klempa, B., T. Avsic-Zupanc, J. Clement, T. K. Dzagurova, H. Henttonen, P. Heyman, F. Jakab, D. H. Kruger, P. Maes, A. Papa, E. A. Tkachenko, R. G. Ulrich, O. Vapalahti and A. Vaheri, 2013: Complex evolution and epidemiology of Dobrava-Belgrade hantavirus: Definition of genotypes and their characteristics. *Arch. Virol.*, 158, 521-529.

- Kraus, A. A., C. Priemer, H. Heider, D. H. Kruger and R. Ulrich, 2005: Inactivation of Hantaan virus-containing samples for subsequent investigations outside biosafety level 3 facilities. *Intervirology*, 48, 255-261.
- Lebreton, J. D., K. P. Burnham, J. Clobert and D. R. Anderson, 1992: Modeling survival and testing biological hypotheses using marked animals: a unified approach with case studies. *Ecol. Monogr.*, 62, 67-118.
- Linard, C., P. Lamarque, P. Heyman, G. Ducoffre, V. Luyasu, K. Tersago, S. O. Vanwambeke and E. F. Lambin, 2007a: Determinants of the geographic distribution of Puumala virus and Lyme borreliosis infections in Belgium. *Int. J. Health Geogr.*, 6, 15.
- Linard, C., K. Tersago, H. Leirs and E. F. Lambin, 2007b: Environmental conditions and Puumala virus transmission in Belgium. *Int. J. Health Geogr.*, 6, 55.
- Luis, A. D., R. J. Douglass, P. J. Hudson, J. N. Mills and O. N. Bjornstad, 2012: Sin Nombre hantavirus decreases survival of male deer mice. *Oecologia*, 169, 431-439.
- Lyubsky, S., I. Gavrilovskaya, B. Luft and E. Mackow, 1996: Histopathology of *Peromyscus leucopus* naturally infected with pathogenic NY-1 hantaviruses: pathologic markers of HPS viral infection in mice. *Lab. invest.*, 74, 627-633.
- Marceau, D. J., 1999: The scale issue in social and natural sciences. *Can. J. Remote Sens.*, 25, 347-356.
- Mazurkiewicz, M., 1994: Factors influencing the distribution of the bank vole in forest habitats. *Acta Theriol.*, 39, 113-126.
- Netski, D., B. H. Thran and S. C. St Jeor, 1999: Sin Nombre virus pathogenesis in *Peromyscus maniculatus*. *J. Viro.*, 73, 585-591.
- Nichols, J. D., 1986: On the use of enumeration estimators for interspecific comparisons, with comments on a "trappability" estimator. *J. Mammal.*, 67, 590-593.
- Niklasson, B., B. Hornfeldt, A. Lundkvist, S. Bjorsten and J. Leduc, 1995: Temporal dynamics of Puumala virus antibody prevalence in voles and of nephropathia epidemica incidence in humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 53, 134-140.
- Niklasson, B., E. Tkachenko, A. P. Ivanov, G. van der Groen, D. Wiger, H. K. Andersen, J. LeDuc, T. Kjelsson and K. Nystrom, 1990: Haemorrhagic fever with renal syndrome: evaluation of ELISA for detection of Puumala-virus-specific IgG and IgM. *Res. Virol.*, 141, 637-648.
- Olsson, G. E., N. White, J. Hjaltén and C. Ahlm, 2005: Habitat factors associated with bank voles (*Clethrionomys glareolus*) and concomitant hantavirus in northern Sweden. *Vector Borne Zoon. Dis.*, 5, 315-323.
- Ostfeld, R. S., G. E. Glass and F. Keesing, 2005: Spatial epidemiology: An emerging (or re-emerging) discipline. *Trends Ecol. Evol.*, 20, 328-336.
- Pettersson, L., J. Boman, P. Juto, M. Evander and C. Ahlm, 2008: Outbreak of Puumala virus infection, Sweden. *Emerg. Infect. Dis.*, 14, 808-810.
- Pettorelli, N., J. O. Vik, A. Mysterud, J. M. Gaillard, C. J. Tucker and N. C. Stenseth, 2005: Using the satellite-derived NDVI to assess ecological responses to environmental change. *Trends Ecol. Evol.*, 20, 503-510.
- Piechotowski, I., S. O. Brockmann, C. Schwarz, C. H. Winter, U. Ranft and G. Pfaff, 2008: Emergence of hantavirus in South Germany: rodents, climate and human infections. *Parasitol. Res.*, 103 Suppl 1, S131-137.
- Pucek, Z., W. Jedrzejewski, B. Jedrzejewska and M. Pucek, 1993: Rodent population dynamics in a primeval deciduous forest (Bialowieza National Park) in relation to weather, seed crop, and predation. *Acta Theriol.*, 38, 199-232.

- Pulliam, H. R., 1988: Sources, sinks and population regulation. *Am. Nat.*, 132, 652-661.
- Quere, J. P. and H. Le Louarn, 2011: *Les rongeurs de France. Faunistique et biologie* 3è ed.. Editions Quae, Versailles.
- Reil, D., C. Imholt, J. A. Eccard and J. Jacob, 2015a: Beech fructification and bank vole population dynamics - Combined analyses of promoters of human puumala virus infections in Germany. *PLoS ONE*, 10.
- Reil, D., C. Imholt, S. Drewes, R. G. Ulrich, J. A. Eccard and J. Jacob, 2015b: Environmental conditions in favor of hantavirus outbreak in 2015 in Germany ? *Zoon. Public Health*, published on line ahead of print
- Reusken, C., B. L. Haagmans, M. A. Muller, C. Gutierrez, G. Godeke, B. Meyer, D. Muth, V. S. Raj, L. Smits-De Vries, V. M. Corman, J. F. Drexler, S. L. Smits, Y. El Tahir, R. de Sousa, J. van Beek, N. Nowotny, K. van Maanen, E. Hidalgo-Hermoso, B. J. Bosch, P. J. Rottier, A. Osterhaus, C. Gortazar Schmidt, C. Drosten and M. P. G. Koopmans, 2013: Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralising serum antibodies in dromedary camels: a comparative serological study. *The Lancet*, issue, 1-7.
- Reynes, J.M., D. Carli, N. Boukezia, M. Debruyne and S. Herti, 2015: Tula hantavirus infection in a hospitalised patient, France, June 2015. *Euro Surveill.*, 20(50).
- Roda Gracia, J., B. Schumann and A. Seidler, 2015: Climate variability and the occurrence of human Puumala hantavirus infections in Europe: A systematic review. *Zoon. Public Health*, 62, 465-478.
- Sauvage, F., M. Langlais and D. Pontier, 2007: Predicting the emergence of human hantavirus disease using a combination of viral dynamics and rodent demographic patterns. *Epidemiol. Infect.*, 135, 46-56.
- Sauvage, F., M. Langlais, N. G. Yoccoz and D. Pontier, 2003: Modelling hantavirus in fluctuating populations of bank voles: The role of indirect transmission on virus persistence. *J. Anim. Ecol.*, 72, 1-13.
- Sauvage, F., C. Penalba, P. Vuillaume, F. Boue, D. Coudrier, D. Pontier and M. Artois, 2002: Puumala hantavirus infection in humans and in the reservoir host, Ardennes region, France. *Emerg. Infect. Dis.*, 8, 1509-1511.
- Schlegel, M., E. Kindler, S. S. Essbauer, R. Wolf, J. Thiel, M. H. Groschup, G. Heckel, R. M. Oehme and R. G. Ulrich, 2012: Tula virus infections in the Eurasian water vole in central Europe. *Vector-Borne Zoon. Dis.*, 12, 503-513.
- Schwarz, A. C., U. Ranft, I. Piechotowski, J. E. Childs and S. O. Brockmann, 2009: Risk factors for human infection with Puumala virus, southwestern Germany. *Emerg. Infect. Dis.*, 15, 1032-1039.
- Sinclair, R., S. A. Boone, D. Greenberg, P. Keim and C. P. Gerba, 2008: Persistence of category A select agents in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 555-563.
- Telfer, S., M. Bennett, K. Bown, D. Carslake, R. Cavanagh, S. Hazel, T. Jones and M. Begon, 2005: Infection with cowpox virus decreases female maturation rates in wild populations of woodland rodents. *Oikos*, 109, 317-322.
- Tersago, K., L. Crespin, R. Verhagen and H. Leirs, 2012: Impact of Puumala virus infection on maturation and survival in bank voles: a capture-mark-recapture analysis *J. Wildl. Dis.*, 48, 148-156.
- Tersago, K., A. Schreurs, C. Linard, R. Verhagen, S. Van Dongen and H. Leirs, 2008: Population, environmental, and community effects on local bank vole (*Myodes glareolus*) Puumala virus infection in an area with low human incidence. *Vector-Borne Zoon. Dis.*, 8, 235-244.

- Tersago, K., R. Verhagen, A. Servais, P. Heyman, G. Ducoffre and H. Leirs, 2009: Hantavirus disease (nephropathia epidemica) in Belgium: effects of tree seed production and climate. *Epidemiol. Infect.*, 137, 250-256.
- Thoma, B. R., J. Muller, C. Bassler, E. Georgi, A. Osterberg, S. Schex, C. Bottomley and S. S. Essbauer, 2014: Identification of factors influencing the Puumala virus seroprevalence within its reservoir in a montane forest environment. *Viruses*, 6, 3944-3967.
- Thomas Palo, R., 2009: Time series analysis performed on nephropathia epidemica in humans of Northern Sweden in relation to bank vole population dynamic and the NAO index. *Zoon. Public Health*, 56, 150-156.
- Van Loock, F., I. Thomas, J. Clement, S. Ghooos and P. Colson, 1999: A case-control study after a hantavirus infection outbreak in the south of Belgium: Who is at risk? *Clin. Infect. Dis.*, 28, 834-839.
- Verhagen, R., H. Leirs, E. Tkachenko and G. Van der Groen, 1986: Ecological and epidemiological data on Hantavirus in bank vole populations in Belgium. *Arch. Virol.*, 91, 193-205.
- Viel, J. F., A. Lefebvre, P. Marianneau, D. Joly, P. Giraudoux, E. Upegui, N. Tordo and B. Hoen, 2011: Environmental risk factors for haemorrhagic fever with renal syndrome in a French new epidemic area. *Epidemiol. Infect.*, 139, 867-874.
- Voutilainen, L., S. Savola, E. R. Kallio, J. Laakkonen, A. Vaheri, O. Vapalahti and H. Henttonen, 2012: Environmental change and disease dynamics: effects of intensive forest management on Puumala hantavirus infection in boreal bank vole populations. *PLoS ONE*, 7, e39452.
- Voutilainen, L., T. Sironen, E. Tonteri, A. Tuiskunen Back, M. Razzauti, M. Karlsson, M. Wahlstrom, J. Niemimaa, H. Henttonen and A. Lundkvist, 2015: Life-Long Shedding of Puumala Hantavirus in Wild Bank Voles (*Myodes glareolus*). *J. Gen. Virol.*, in press.
- Wereszczynska, A. M. and W. H. Nowakowski, 2004: What food allows bank voles to stay fit in Spring. *Elect. J. Pol. Agric. Univ.*, 7, 1-10.
- Williams, B. K., J. D. Nichols and M. J. Conroy, 2002 *Analysis and management of animal populations* Academic Press, London.
- Wu, J., 2004: Effects of changing scale on landscape pattern analysis: scaling relations. *Landscape Ecol.*, 19, 125-138.
- Zeimes, C. B., G. E. Olsson, C. Ahlm and S. O. Vanwambeke, 2012: Modelling zoonotic diseases in humans: comparison of methods for hantavirus in Sweden. *Int. J. Health Geogr.*, 11, 39.
- Zeimes, C. B., S. Quoilin, H. Henttonen, O. Lyytikainen, O. Vapalahti, J. M. Reynes, C. Reusken, A. N. Swart, K. Vainio, M. Hjertqvist and S. O. Vanwambeke, 2015: Landscape and regional environmental analysis of the spatial distribution of hantavirus human cases in europe. *Front. Public Health*, 3, 54.
- Zelená, H., J. Mrázek and T. Kuhn, 2013: Tula hantavirus infection in immunocompromised host, Czech Republic. *Emerg. Infect. Dis.*, 19, 1873-1876.

References	Dependent variable	Independent environmental variables investigated	Geographical and temporal scales	Methods
Verhagen et al., 1986	Host seroprevalence	Type of habitat : marsh or not	Once a month from August 1983 to November 1984 in 4 sites in the province of Antwerp in Belgium	Field study with CMR* survey and univariate Chi-square test or Student t-test
Escutenaire et al., 2002	Host seroprevalence	Habitat (types of vegetation)	From 1996 to 1999 twice a year in 4 sites in southern Belgium	Field study with CMR* survey and univariate Chi-square test, Pearson correlation or Student t-test
Sauvage et al., 2002	Host seroprevalence	Type of habitat : humidity	From 1997 to 1999 in 2 sites in the French Ardennes	Field study and univariate Chi-square test
Olsson et al., 2005	Host seroprevalence	Type of vegetation and habitat	In fall 1998 in seven pairs of location (one associated with human cases and one corresponding paired control location)	Principal component analysis
Linard et al., 2007b	Host seroprevalence/ NE** incidence	Food availability, climate and habitat (landscape configuration, type of soil)	From 2004 to 2005 once per year or once per season in 17 sites in northern and southern Belgium	Field study and multivariate logistic regression model for all factors
Pettersson et al., 2008	NE incidence	Climate	About an unexpected outbreak in 2007 in Västernorrland county (Sweden)	No statistical analysis, ascertainment
Piechotowski et al., 2008	NE incidence of 2007	Food availability and climate	About an outbreak in 2007 in South Germany	No statistical analysis
Tersago et al., 2008	Host seroprevalence	Food availability and climate	From August 2004 to September 2005 in 8 sites in eastern Belgium	Field study and univariate analysis by generalized linear model
Clement et al., 2009	NE incidence (annual)	Food availability and climate	From 1996 to 2007 in Belgium	Simple non-parametric univariate correlation analysis (Spearman)

Heyman et al., 2009	Host seroprevalence	Food availability/habitat (type of vegetation)	From 22 July 2001 to 25 July 2001 in 1 site in the center of Belgium	Field study and univariate non parametric statistics
Schwarz et al., 2009	NE incidence (annual)	Food availability, climate and habitat (type of vegetation)	From 2001 to 2007 in Baden-Württemberg	Multivariate Poisson regression model for all factors
Tersago et al., 2009	NE incidence (annual)	Food availability and climate	From 1997 to 2007 in Belgium	Univariate analysis and generalized linear model.
Thomas, 2009	NE incidence (annual)	Climate	Two time series in the county of Västernorrland: first from 1959 to 1975 and second, from 1985 to 2006.	Multivariate linear regression
Barrios et al., 2010	NE incidence (annual)	Food availability	From 2002 to 2007 in 2 sites in the French Ardennes and in 8 sites in Wallonia in Belgium	Univariate correlation coefficients
Guivier et al., 2011	Host seroprevalence	Habitat (landscape configuration)	In autumn 2008 in 10 sites in the French Ardennes	Field study and principal component analysis (PCA)
Haredasht et al., 2011	NE incidence (monthly)	Food availability and climate	From 1996 to 2008 in Belgium	Predictive mechanistic Susceptible-Infective-Removed (SIR) models
Viel et al., 2011	NE incidence	Food availability, climate and habitat (type of vegetation)	From 1999 to 2008 in Franche-Comté in France	Univariate and multivariate Bayesian regression analysis.
Barrios et al., 2012	NE incidence (annual) used to calculate risk	Habitat (type of vegetation and landscape configuration)	From 2000 to 2010 in Belgium	Tree-structured regression
Dobly et al., 2012	Host seroprevalence	Habitat (type of vegetation and landscape configuration)	From 2003 to 2005 in 3 sites along the southern border of Brussels	Univariate logistic regression and multiple regression model for all factors
Voutilainen et al., 2012	Host seroprevalence	Habitat (type of vegetation)	From June 2007 to September 2010 in 40 sites in northern Finland	Generalized Linear Mixed Modelling (Binomial error distribution and logit link function)

Zeimes et al., 2012	NE incidence	Food availability, climate and habitat (type of vegetation and landscape configuration)	About 212 human cases with location information in northern Sweden (4 counties) from 1991 to 1998	Univariate and multivariate regression, boosted regression tree, cross validated logistic regression and MaxEnt model
Barrios et al., 2013	NE incidence (annual) to calculate risk	Food availability and climate	From 2000 to 2010 in Belgium	Bayesian estimation of disease risk
Haredasht et al., 2013	NE incidence (annual)	Food availability and climate	From 2005 to 2009 in Belgium	Predictive mechanistic Susceptible-Infective-Removed (SIR) model and a dynamic linear regression model
Khalil et al., 2014b	NE incidence (annual)	Climate	From 1990 to 2012 in northern Sweden (4 counties)	Multiple regression model
Thoma et al., 2014	Host seroprevalence	Food availability, climate and habitat (type of vegetation)	From 2008 to 2010 in Bavarian Forest National Park in Germany	Multivariate generalized Linear Mixed Effects Model with all factors
Reil et al. 2015a	NE incidence (annual)	Food availability	From 2001 to 2012 in 7 German states (Bavaria, Brandenburg, Hesse, Lower Saxony, Mecklenburg-Western Pomerania, Saxony and Thuringia)	Generalized linear mixed model
Reil et al. 2015b	NE incidence in the first 12 weeks of year	Food availability and climate	From 2009 to 2015 in 6 federal states of Germany	Regression tree for association between weather and host density No statistical analysis to assess the influence of host density and beech fructification on NE incidence.
Zeimes et al. 2015	NE incidence used to build map of presences and absences	Food availability, climate and habitat (type of vegetation and landscape configuration)	From 2003 to 2012 in France, from 2000 to 2010 in Belgium, from 2008 to 2012 in Netherlands, from 1989 to 2012 in Norway, from 1991 to 1998 in Sweden and from 2004 to 2009 in Finland	Multilevel logistic regression Random intercepts and/or slopes models

*Capture-mark-recapture ** Nephropathia epidemica

Table 1: List of articles included in this review ordered chronologically and classified as dependent variables, independent variables investigated, methods, geographical and temporal scales

Dependent variable	Food availability	Key result	References
Host seroprevalence	Vegetation index VI (calculated by determining species especially wild blackberry (<i>Rubus fruticosus</i>) and density of trees, understory vegetation, and humidity of soil)	No clear association	Heyman et al., 2009
	NDVI* acquired in 03 July 2001	Positive association	Tersago et al., 2008
		No association	Linard et al., 2007b
	Availability of spruce, tree lichens and bilberry	Positive association	Olsson et al., 2005
	Beech coverage	No significant association	Thoma et al., 2014
Nephropathia epidemica incidence	NDVI* acquired in September 1999	Positive association (from 1999 to 2008)	Viel et al., 2011
	NDVI* acquired in 03 July 2001	No association	Linard et al., 2007b
	Land cover : beech forest	Positive association	Piechotowski et al., 2008
	Land cover: seed plant	Positive association	Piechotowski et al., 2008; Reil et al., 2015a; Schwarz et al., 2009
	Mast of beechnut previous year	Positive association	Schwarz et al., 2009; Piechotowski et al., 2008; Reil et al., 2015a ; Reil et al., 2015b
	Mean volume of spruce (<i>Picea abies</i>) per hectare in a 3-km radius around the dwelling (m ³ /ha)	Positive association	Zeimes et al., 2012
	Seed production (<i>Quercus robur</i> , <i>Q. petraea</i> and <i>Fagus sylvatica</i>) the year before	Positive association with high seed production of <i>Quercus</i> sp., <i>Fagus sylvaticus</i> or both	Clement et al., 2009; Haredasht et al., 2011; Haredasht et al., 2013; Tersago et al., 2009;
	Length of the growing season**	Concurrent increase from 2000 to 2008	
	Amplitude of EVI ** 2 years before	Positive influence	Barrios et al., 2010
	Annual ratio of [rate of increase of EVI**]/rate of decrease of EVI**] of the year before	Positive influence	

Remote Sensing of vegetation (RS): combination of Normalized Difference Water Index ^{**} , maximum EVI ^{**} of the year and cumulative EVI ^{**} of the year and the year before.	Correlation with NE risk	Barrios et al., 2013
Mean EVI	Positive association in Fennoscandian taiga and western European broadleaf Negative association in sarmatic mixed forest and southern temperate Atlantic	Zeimes et al., 2015
Number of green days per year	Positive association in western European broadleaf and southern temperate Atlantic Negative association in Fennoscandian taiga and scandinavian montane birch	Zeimes et al., 2015

* Normalized difference vegetation index

** NDVI-related indexes with EVI = Enhanced Vegetation index

Table 2: Synthesis of relationships between hantavirus infection in rodents or humans and food availability

Dependent variable	Climate factor	Key result	References
Host prevalence	Precipitation in previous spring	Positive association	Tersago et al., 2008
	Average temperature in previous winter and summer	Negative influence	
	Precipitation in previous autumn	Negative association or no association depending on the year	Linard et al., 2007b
	Maximal temperature in previous winter	Strong negative association	
	Mean annual temperature	Negative association	
	Mean annual solar radiation	Negative association	
Nephropathia epidemica incidence	Concomitant mean monthly temperature	No association (from 1999 to 2008)	Viel et al., 2011
	Concomitant mean monthly precipitations	No association (from 1999 to 2008)	
	Spring temperature above the long term	Positive association	Schwarz et al., 2009
	Minimum temperature n winter	Positive association for Fennoscandian taiga Negative association for samatic mixed forest, Scandinavian montane birch, western European broadleaf and southern temperate Atlantic No association for northern temperate Atlantic and Scandinavian coastal coniferous	
	Winter/Autumn temperature of year -1	Positive association	Schwarz et al., 2009; Pettersson et al., 2008; Piechotowski et al., 2008; Tersago et al., 2009; Clement et al., 2009;
		No association	Linard et al., 2007b
	Snow depth	Negative association	Pettersson et al., 2008; Zeimes et al., 2012
	Snow cover (%)	Positive association for samatic mixed forest, Scandinavian montane birch, northern temperate Atlantic, western European broadleaf and southern temperate Atlantic Negative association for Fennoscandian taiga	Zeimes et al., 2015

	No association for northern temperate Atlantic and Scandinavian coastal coniferous		
Monthly precipitations 3 months before	Negative influence		Haredasht et al., 2011
Concomitant average monthly temperature	Negative influence		
Maximum temperature in summer	Positive association for northern temperate Atlantic and Fennoscandian taiga Negative association for samatic mixed forest, Scandinavian, western European broadleaf and southern temperate Atlantic No association for Scandinavian montane birch and Scandinavian coastal coniferous		Zeimes et al., 2015
Summer temperature from year -3 to year -1	No association <u>except</u> positive association for year -2 and negative association for year -3		Clement et al., 2009
	No association <u>except</u> positive association for year -2		Tersago et al., 2009
Monthly or combination of monthly temperatures from year -3 to year of NE	Positive association for summer months of year -2, negative association for summer month of year -3 and positive association for April of the year		Clement et al., 2009
	Positive association for summer months of year -2 and year -3		Tersago et al., 2009
	Positive association for temperature in July of year -2		Reil et al., 2015b
Summer precipitations from year -3 to year -1	No association <u>except</u> positive association for year -3		Clement et al., 2009
	No association		Tersago et al., 2009
Monthly or combination of monthly precipitations from year -3 to year of NE	No association <u>except</u> positive association for July of year -3 and negative association for April of year		Clement et al., 2009
	No association <u>except</u> positive association for July of year -3		Tersago et al., 2009
Autumn temperature from year -3 to year -1	No association <u>except</u> positive association for year -1		Tersago et al., 2009
Mean spring temperature from year -1 to year	Negative association with spring temperature of year -1		Clement et al., 2009

Mean spring precipitations from year -1 to year	No association	Clement et al., 2009
Annual precipitations	Positive association for Fennoscandian taiga, samatic mixed forest, northern temperate Atlantic and western European broadleaf Negative association for Scandinavian montane birch No association for southern temperate Atlantic and Scandinavian coastal coniferous	Zeimes et al., 2015
Precipitation during the previous spring	No association	Linard et al., 2007b
Mean autumn precipitations of year -1	No association	Clement et al., 2009; Linard et al., 2007b
Mean winter precipitations of year -1	No association	Clement et al., 2009; Linard et al., 2007b
Concomitant number of rainy winter days	Positive association	Khalil et al., 2014b
Mean autumn precipitations from year -3 to year -1	No association	Tersago et al., 2009
Combination of GDD** of spring and autumn from year -2 to year and GDD** of summer of year -2 to year -1	Correlation with NE risk	Barrios et al., 2013
Monthly air temperature 4, 5 and 10 months before	Positive association	Haredasht et al., 2013
North Atlantic Oscillation index	No association	Haredasht et al., 2013,
North Atlantic Oscillation index from year-2 to year	No association	Thomas et al., 2009

* NE = Nephropathia epidemica ** GDD = Growing degree days is an indicator of heat accumulation computed for each season from hourly temperature

Table 3: Synthesis of relationship between hantavirus infection in rodents or humans and climate factors

Dependent variable	Environmental factor	Key result	References
Host Prevalence	Habitat fragmentation	Higher prevalence when fragmentation is lower	Dobly et al., 2012; Guivier et al., 2011
		Effect of the landscape structure not visible	Linard et al., 2007b
	Deciduous patch area size	Positive association	Tersago et al., 2008
	Proportion of thin particles in soil	No significant association	Linard et al., 2007b
	Presence of marsh habitat	Positive association	Verhagen et al., 1986
	Humidity	Positive association	Dobly et al., 2012; Sauvage et al., 2002;
	Home range overlap in rodents	Positive association	Escutenaire et al., 2002
	Dense ground vegetation	No significant association	
	Managed forest with 25-30 years from plantation after clear cutting (to compare with forest with 4-8, 10-15 years from plantation and forest older than 100 years)	Positive association with the probability of infection in bank vole	Voutilainen et al., 2012
	Availability of Scots pine	Negative association	Olsson et al., 2005
-Nephropathia epidemica incidence	Fallen wood and tree stumps	Positive association	
	Deadwood layer coverage	Positive association	Thoma et al., 2014
	Herb layer coverage	Negative association	
	Shrub layer coverage	No significant association	
	Number of patches of forests in a 3-km radius around the dwelling	No association (univariate analysis)	Zeimes et al., 2012
	Mean shape index of forests in a 3-km radius around the dwelling		

Mean Euclidian nearest-neighbor distance between patches of forest in a 3-km radius around the dwelling	
Majority of grain size of the soil	
Mean volume of pines per hectares in a 3-km radius around the dwelling (m3/ha)	Positive association (univariate analysis)
area of peat bogs in a 3-km radius around the dwelling	Negative association (univariate analysis)
Mean contiguity index of forest in a 3-km radius around the dwelling	Positive association (multivariate analysis)
Area of forest on a 3-km radius around the dwelling (m ²)	
Maximum distance to forest in a 3-km radius around the dwelling (m)	
Proportion of thin particles in soil	Positive association
Area of forest patch	Positive association
Proximity index, contiguity index, core area index	No association
Coniferous forest (%)	Positive association for Scandinavian montane birch and northern temperate Atlantic
	Negative association for Fennoscandian taiga and southern temperate Atlantic
	No association for samatic mixed forest and Scandinavian coastal coniferous and western European broadleaf and
Cover of mixed forest	No association
Cover of Coniferous forest	No association
Cover of grassland	No association

Linard et al., 2007b

Zeimes et al., 2015

Viel et al., 2011

Cover of broadleaf forest	No association	
Elevation	No association	Viel et al., 2011; Zeimes et al., 2012
Broad leaved forest cover	Higher NE incidence in areas where broad leaved forest cover exceeds 21% of the surface area	Barrios et al., 2012
Broadleaved forest (%)	Positive association for samatic mixed forest, Scandinavian coastal coniferous, western European broadleaf and southern temperate Atlantic Negative association for Fennoscandian taiga and northern temperate Atlantic No association for Scandinavian montane birch	Zeimes et al., 2015
Mixed forest (%)	Positive association for Fennoscandian taiga, samatic mixed forest, northern temperate Atlantic , western European broadleaf and southern temperate Atlantic No association for Scandinavian montane birch and Scandinavian coastal coniferous	Zeimes et al., 2015
Contiguity of forest (relative units)	Positive association for Fennoscandian taiga, western European broadleaf and southern temperate Atlantic No association for samatic mixed forest, Scandinavian montane birch, northern temperate Atlantic and Scandinavian coastal coniferous	Zeimes et al., 2015

Table 4: Synthesis of relationships between hantavirus infection in rodents or humans and habitat conditions

Chapitre 4 – Facteurs de risques d’infection des populations de rongeurs de la région des Ardennes par le virus Puumala à partir de modèles basés sur l’incidence et la séroprévalence

La contamination indirecte de l’Homme se produit à partir d’un environnement contaminé par les déjections des rongeurs infectés, ce qui place l’évaluation de l’importance du nombre de rongeurs infectés comme élément central dans l’estimation du risque de NE. Les facteurs environnementaux qui impactent l’infection des rongeurs via la survie du virus dans l’environnement ou via la dynamique de population des rongeurs vont donc aussi influencer le nombre de cas de NE.

La revue sur l’épidémiologie spatiale et temporelle des cas de NE et de la séroprévalence chez les rongeurs hôtes a montré les effets variés des différents facteurs environnementaux sur l’infection de l’Homme et des rongeurs mais pointe cependant quelques difficultés d’interprétation liées à la méthodologie employée. Dans la très grande majorité des études, la mesure de l’infection des rongeurs est basée sur l’estimation de la séroprévalence. Cette variable présente cependant une faiblesse liée à la très longue présence des anticorps chez les rongeurs ayant séroconverti (Voutilainen et al., 2015) rendant impossible la détermination de la date de l’infection. D’autre part, les jeunes peuvent être protégés de l’infection par des anticorps maternels non différenciables des anticorps post-infection et qui peuvent persister au moins 80 jours (Kallio et al., 2006b). Or, à partir de 30 jours, un jeune rongeur est morphologiquement comparable aux adultes (Quere et Le Louarn, 2011), ce qui conduira à surestimer la séroprévalence en comptabilisant à tort comme séroprévalents des jeunes avec des anticorps maternels. Ce biais peut toutefois être affranchi en utilisant le ratio de séroconversion, calculé comme le nombre de rongeurs ayant séroconverti au cours du mois compris entre deux sessions de capture (Voutilainen et al., 2016). Ce ratio ne comptabilise pas les individus présentant des anticorps maternels et permet de situer le moment de l’infection à un mois près.

Le quatrième volet de la thèse a été d’utiliser le nombre de rongeurs incidents, mesure de l’infection plus précise sur le nombre de rongeurs infectés et sur le moment de leur infection et d’évaluer les effets de l’environnement susceptibles d’influer cette mesure de l’infection. L’hypothèse était qu’une plus importante disponibilité alimentaire augmenterait le nombre d’infections aux deux saisons du fait de son influence positive sur la dynamique de population. De plus, les facteurs météorologiques étaient supposés avoir une influence sur le nombre de rongeurs incidents mais sans présupposer du sens, compte-tenu des deux possibilités d’influences, soit via la dynamique de population, soit via la survie du virus en milieu extérieur. Les effets des facteurs environnementaux ont aussi été étudiés sur le nombre de rongeurs prévalents pour permettre de vérifier si la précision liée à l’utilisation de l’incidence se traduisait par des mises en évidence d’influences supplémentaires ou différentes de celles trouvée en utilisant le nombre de rongeurs prévalents.

Pour remplir cet objectif, les données de dix ans de capture par CMR sur trois sites dans les Ardennes ont été utilisées. Le protocole a été identique sur les trois sites de 2000 à 2009 avec cinq sessions de capture par an en avril, juin, juillet, septembre et octobre au cours de trois nuits consécutives. Pour chaque individu capturé, il y a eu identification individuelle, détermination de son sexe et de son

espèce, pesée et prélèvement sanguin. Les trois sites comprenaient chacun 49 pièges répartis de manière régulière (en grille).

L'incidence a été calculée entre deux sessions de capture comme le ratio du nombre d'individus ayant séroconverti dans cet intervalle de temps sur le nombre d'individus sensibles, c'est-à-dire séronégatifs lors de la capture. La prévalence a été calculée à chaque session comme le ratio du nombre de rongeurs séropositifs sur le nombre d'individus capturés. Les modalités précises de calcul sont décrites dans Monchâtre-Leroy et al., à soumettre. Les effets de l'environnement sur la séroprévalence et sur l'incidence des rongeurs ont été évalués. Les variables explicatives environnementales sont la température, les précipitations et la biodisponibilité alimentaire approximée par le NDVI (Normalized Difference Vegetation Index) (Pettorelli et al., 2005) qui est la mesure de l'activité photosynthétique de la végétation. A partir de données journalières pour la météorologie et bi mensuelles pour le NDVI, les variables environnementales ont été calculées pour deux saisons : au « printemps » (d'avril à juillet) qui correspond à la phase croissante du cycle des rongeurs et à l'« automne » (d'août à octobre) qui correspond à la phase décroissante du cycle des rongeurs. Toutes ces variables étant fortement corrélées, elles ont été utilisées sous forme de dimensions définies par analyse en composantes principales (ACP). Ce modèle de régression a été spécifié avec une matrice de corrélation autorégressive d'ordre 1, afin de prendre en compte le fait que la variable dépendante (séroprévalence ou incidence) mesurée à un temps t va dépendre de sa valeur au temps $t-1$.

En ce qui concerne les analyses sur la séroprévalence au printemps, les résultats ont seulement montré une influence du site de capture. Pour l'automne, le modèle a montré une influence positive sur la séroprévalence des dimensions relatives à la disponibilité alimentaire de l'automne d'une part et au climat de l'année, d'autre part, avec un effet positif de la disponibilité alimentaire et de la température du printemps et de l'automne et un effet négatif du volume de précipitations en automne. Nos résultats suggèrent que la séroprévalence est favorisée par un climat sec et chaud, ce qui est à l'inverse de ce qui a été mis en évidence dans deux autres études ayant des variables comparables aux nôtres (Thoma et al., 2014 ; Tersago et al., 2008). De même, l'association négative entre séroprévalence et température à l'hiver précédent (Tersago et al., 2008; Linard et al., 2007 ; Thoma et al., 2014) n'est pas retrouvée dans notre étude.

La différence de résultats entre ces études et la nôtre s'explique, d'une part, par la variabilité des effets des facteurs environnementaux entre régions et la surface des zones d'étude : les études de Linard et al., 2007 et Tersago et al., 2008 couvrent 14-17 sites répartis sur toute la Belgique et celle de Thoma et al., 2014 a été réalisée dans différents sites du Sud Est de l'Allemagne. Il a été en effet montré qu'un même facteur avait une influence différente sur le nombre de cas de NE dans différentes régions écologiques, définies par le climat, les ressources en eau et la biodiversité (Zeimes et al., 2015). Il est tout à fait possible que cette variabilité de l'influence des facteurs sur l'infection humaine s'applique aussi à la séroprévalence des rongeurs. Par ailleurs, l'influence d'un facteur sur la séroprévalence à une large échelle spatiale peut cacher des influences plus diverses du même facteur sur des sites beaucoup plus restreints comme le nôtre. Cette hypothèse est cohérente avec l'étude de Zeimes (Zeimes et al., 2015) qui met en évidence l'importance de l'échelle spatiale, certains facteurs ayant toujours la même influence sur un très large espace alors que d'autres ont une influence différente en fonction des lieux considérés.

Outre la différence de sites, d'échelle spatiale, les trois études (Tersago et al., 2008; Linard et al., 2007; Thoma et al., 2014) diffèrent de la nôtre du fait de l'échelle temporelle. Notre étude est basée sur un suivi de trois sites sur dix ans, cinq fois par an alors que les autres études s'intéressent à de nombreux sites (entre 14 et 23 sites) sur un temps court (trois ans maximum), une ou deux fois par an. De même que pour l'échelle spatiale, les associations mises en évidence sur dix ans peuvent différer de celles étudiées sur une période plus courte. Enfin, dans notre étude, la température de l'hiver précédent est incluse dans une dimension qui comprend aussi d'autres variables, dont les influences opposées peuvent dissimuler une influence de la température hivernale sur la séroprévalence.

Pour conclure sur la séroprévalence, notre étude suggère que, dans les Ardennes, le lien entre séroprévalence et environnement se fait via la dynamique des rongeurs, qui est plus importante si le climat et la disponibilité alimentaire sont favorables ; la survie accrue du virus dans l'environnement lorsque la température extérieure est froide ne semble pas un processus particulièrement important dans l'infection des rongeurs par PUUV dans cette région.

Les résultats concernant l'incidence sont très différents. Le modèle a montré une influence positive sur l'incidence du « printemps » de la dimension relative à la disponibilité alimentaire au printemps et au climat l'hiver précédent. Ces résultats rejoignent en partie les résultats des études de séroprévalence (Tersago et al., 2008; Linard et al., 2007; Thoma et al., 2014). L'interprétation biologique de ces résultats suggère un effet via la dynamique de population qui est favorisée par une température de l'hiver plus douce favorisant la survie hivernale des rongeurs et la disponibilité alimentaire au printemps permettant une reproduction printanière plus efficace. L'impact positif de la pluie peut s'expliquer par une survie plus longue du virus en milieu humide ou par le comportement de regroupement des rongeurs du fait de la pluie, ces deux processus favorisant la contamination. Le modèle concernant l'incidence à « l'automne » a mis en évidence l'effet du site uniquement, mais ces résultats sont à interpréter avec précautions : il est très probable que cela résulte d'un manque de puissance statistique car le nombre d'individus incidents à cette saison est très peu élevé.

Notre étude est la première à notre connaissance à avoir évalué les facteurs influençant l'infection saisonnière des rongeurs. L'analyse de l'impact du climat et de la disponibilité alimentaire sur l'incidence, d'une part, et la prévalence, d'autre part, des rongeurs montre l'importance de bien définir la variable d'intérêt et la signification biologique associée. L'incidence, qui mesure le nombre de rongeurs contaminés au cours d'un laps de temps court, permet d'identifier les facteurs de risque de cette contamination à un moment donné. Ceci n'est pas le cas de la séroprévalence qui à un moment donné est le résultat de l'accumulation des rongeurs contaminés dans toutes les périodes précédentes. Cependant, la précision de l'incidence nécessite un suivi régulier des populations ce qui est contraignant d'un point de vue logistique et qui peut constituer un frein à son utilisation.

Publication 4 :

Les résultats de l'étude seront publiés sous le titre ;

E. Monchatre-Leroy, F. Sauvage, F. Boué, D. Augot, P. Marianneau, V. Hénaux, L. Crespin. Risk factors of Puumala orthohantavirus infection in a rodent population in northern France predicted from incidence and seroprevalence models

Article 4

**Risk factors of Puumala
orthohantavirus infection in a rodent
population in northern France
predicted from incidence and
seroprevalence models**

Risk factors of Puumala orthohantavirus infection in a rodent population in northern France predicted from incidence and seroprevalence models

E. Monchatre-Leroy¹, F. Sauvage², F. Boué³, D. Augot⁴, P. Marianneau⁵, V. Hénau⁶, L. Crespin^{2, 7}

¹ Anses, Laboratoire de la rage et de la faune sauvage, Nancy, 54220, France

² UMR–CNRS 5558 Biométrie et Biologie évolutive, Université C. Bernard Lyon-1, Villeurbanne, France

³ Anses, Laboratoire de la rage et de la faune sauvage, unité SEEpIAS, Nancy, 54220, France

⁴ Usc VECPAR, AE 4688, UFR Cap Santé, Université Champagne-Ardenne, UFR Pharmacie, Anses, Reims, France.

⁵ Université de Lyon, Anses, Laboratoire de Lyon, unité de virologie, Lyon, 69364, France

⁶ Université de Lyon, Anses, Laboratoire de Lyon, unité Epidémiologie et appui à la surveillance (EAS), Lyon, 69364, France

⁷ Université Clermont Auvergne, INRA, VetAgro Sup, UMR EPIA Epidémiologie des maladies animales et zoonotiques, 63122, Saint-Genès-Champanelle, France

Abstract (200 words)

Faced with the difficulty of measuring pathogens transmission, epidemiological studies in wildlife frequently rely on cross-sectional seroprevalence. Yet, seropositivity indicates an exposition to a pathogen at some unknown time, limiting assessment of seasonal infection risks. Longitudinal studies, based on multiple samplings of the same individuals over an extended period allow to measure time-dependent incidence rates, and thus reduce such issues. The objective of this study was to assess risk of Puumala orthohantavirus infection in rodents estimated from seroprevalence data (as commonly used in previous studies) and incidence rates. Puumala orthohantavirus is a zoonotic pathogen that has caused an increasing number of cases of nephropathia epidemica in humans in Europe. This study investigated the impact of environmental variables on both PUUV incidence rates and seroprevalence in bank vole populations, monitored over ten years at three different sites in Northern France. This study highlighted the overall effect of the environment on rodent contamination. Yet, in spring, while only site impacted prevalence, meteorological conditions of previous winter and food availability in spring were found to be important drivers of incidence. In contrary, in autumn, while meteorological conditions of the year and food availability in autumn impacted prevalence, only site was found significant for incidence. Besides, our results from incidence data, which are more precise to evaluate the moment of exposure and contamination, suggested different mechanisms of PUUV risk between spring and autumn corresponding to different phases of the cycle of rodent population.

Keywords (6)

Epidemiology, seroprevalence, incidence, bank voles, Puumala virus, environment, multistate capture-mark-recapture

Introduction

Zoonotic emerging infectious diseases are mainly caused by pathogens from wildlife (Jones et al., 2008; Karesh et al., 2012). The surveillance of pathogens circulating in wildlife and the understanding of risk factors for wildlife infection are essential to prevent human diseases burden. Yet, epidemiological studies of wildlife systems are limited by the difficulty to observe and collect data on animal interactions in wildlife and imperfect detection of cases (Craft et al., 2011). Facing these issues, epidemiological studies frequently rely on cross-sectional seroprevalence data. However, seropositivity is only the result of an exposition of an animal to a pathogen at some time in the past (Cleaveland et al., 2007). Using serological data from short-term and one-shot case studies (as they are often conducted for wildlife) is then not sufficient to estimate the moment of the contamination and then evaluate risk factors of infection. In domestic animals, a recent study highlighted that imperfect detection of cases in logistic or zero-inflated Poisson models increased the probability of identifying false risk factors (Combelles et al., 2019). Other issues with imperfect detection of cases is the confusion of risk factors of disease occurrence and risk factors of disease detection for disease with heterogeneous spatial distribution (Vergne et al., 2014) and biases in estimates of the survival probability of individuals in different infection states and the probabilities of infection and recovery (Benhaïem et al., 2018). To deal with this imperfect detection of cases, some authors (e.g. McCallum 2000; Hazel et al., 2000) have recommended repeated monitoring of susceptible animals in longitudinal serology studies of wildlife. Accordingly, a recent study has demonstrated that combining repeated test results from individuals sampled multiple times over an extended period have indeed improved detection of *Mycobacterium bovis* detection in badgers (Buzdugan et al., 2017). By this way, multistate capture-mark-recapture (CMR) protocol, combined to systematic sampling of captured individuals, provide an important tool to estimate epidemiological parameters in wildlife (Craft et al., 2011).

Wild rodents are the reservoir of orthohantaviruses. These viruses are zoonotic pathogens that have caused an increasing number of clinically apparent human infections in Europe over the last ten years (Heyman et al., 2011). The most prevalent orthohantavirus in Western Europe is Puumala virus (PUUV), whose reservoir is the bank vole (*Myodes glareolus*), a wide-spread rodent in Western Europe. Viral transmission between rodents may occur through direct contact (biting, grooming, shared

nesting, etc.) or via the environment (Kallio et al., 2006a). Rodents develop chronic infections, but clinical symptoms have never been reported (Bernshtein et al., 1999). However, previous studies have documented tissue pathologies in infected hosts (Lyubsky et al., 1996, Netski et al., 1999) and recent papers have suggested that orthohantaviruses decrease the probability of survival of their hosts (Tersago et al., 2012, Luis et al., 2012). Humans are contaminated indirectly, through inhalation of aerosolized excreta of infected bank voles, and usually develop a mild form of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) called nephropathia epidemica (NE).

In order to predict and help preventing human infections, several studies have modelled NE risk considering different factors related to bank vole population dynamic, virus survival in environment and human behavior (Monchatre-Leroy et al., 2017). However, assessing NE risk is complex because of the multiplicity of risk factors and the joint effect of some factors on both rodent and human infections. Thus, food availability, in particular increasing abundance of beech (*Fagus sylvaticus*) mast or other plants, which can be estimated by the measure of the photosynthetic activity of the vegetation (called NDVI for normalized difference vegetation index (Pettorelli et al., 2005)), boosts winter survival and thus the abundance of bank voles in spring (Schwarz et al., 2009; Piechotowski et al., 2008; Reil et al., 2015; Drewes et al., 2017; Swart et al., 2017). Second, meteorological conditions, especially temperature and precipitation, were shown to act on rodent population dynamics and virus survival in the environment (Linard et al., 2007; Pettersson et al., 2008; Piechotowski et al., 2008; Tersago et al., 2008; Clement et al., 2009; Tersago et al., 2009; Palo et al., 2009; Schwarz et al., 2009; Viel et al., 2011; Haredasht et al., 2011; Zeimes et al., 2012; Barrios et al., 2013; Haredasht et al., 2013; Thoma et al., 2014; Reil et al., 2015; Zeimes et al., 2015; Swart et al., 2017). In turn, dense rodent populations and prolonged PUUV survival in the environment foster rodent infections and, at last, human exposure.

As the number of NE cases has been found to be related to prevalence of infection in the reservoir host (Drewes et al. 2017; Tersago et al. 2011; Voutilainen et al. 2016; Swart et al., 2017), some studies took an interest in identifying and quantifying the relative influence of potential risk factors on rodent seroprevalence (reviewed in Monchatre-Leroy et al., 2017). However, using PUUV seroprevalence as an indicator of rodent infection has a couple of weaknesses. First, both a recently infected case and a never infected few-week-old bank vole (protected by maternal antibodies that may last for about two months and half; Kallio et al. 2006b) will provide a positive result to serological testing. A second potential bias arises from the life-long persistence of PUUV antibodies in previously-infected bank voles (Voutilainen et al., 2015). In consequence, the association between seroprevalence and infection calculated at a given time is confused by the uncertain time since rodent exposure and infection to PUUV. To solve that issue, a previous study introduced seroconversion of bank voles in addition to

seroprevalence (Voutilainen et al., 2016) to characterize PUUV transmission dynamics depending on season and cycle of bank vole population. Seroconversion history data, which require multiple captures of individual rodents and PUUV testing, allow theoretically, on the one hand, discriminating recently-infected rodents from both young bank voles protected by maternal antibodies and individuals with life-long immunity from a past infection and, on the other hand, estimating the probability of infection or incidence, which is a more precise indicator of infection risk in rodents than seroprevalence. Then, the aim of the study was to assess the impact of environmental variables on the incidence and on the seroprevalence of PUUV infection in bank vole populations monitored over ten years at four different sites in Northern France with CMR approach.

Methods

Bank voles data

Rodents were trapped from 2000 to 2009 in four sites (referred as sites A, B, C, and D hereafter) located in the Ardennes “*département*”, in NorthEastern France. Sites A and B, two-km away, were located in the South of the department and sites C and D (five-km distant) were about 30 km to the North. Rodent trapping was conducted five times per year (typically sessions occurred in April, June, July, September and October) (for further details, see in Augot et al. 2008). Regarding data from the site D, the number of sessions per year with trapped animals were fewer (only two years with captures at all sessions) than the other sites (more than five years with capture at all sessions) (Table 1). No animal were trapped during three years in site D in comparison with only one year in sites B and C, and no year in site A. The maximum number of captures in site D was 64 in 2005, more than 100 in site C for two years (maximum: 310), in site A for six years (maximum: 278) and in site B for three years (maximum: 242). Because of the limited number of captures, the site D was excluded from the analysis.

The trapping grid was based on 49 live traps (7×7 Ugglan Live Trap) spaced at 12.5 m intervals. For each session, traps were set for three consecutive nights and were baited with pieces of carrots and sunflower seeds. Trapped rodents were individually marked by toe-clipping and released at their original site of capture after collecting a blood sample from the retro-orbital sinus and identifying the species. All rodents were weighed and sexed. All the procedures were carried out according to EC Directive 86/609/CEE and the French transposition of this directive, décret 2001-486 of June 2001 that were in force during the experimentation. Other rodent species were caught in the field, e.g. *Apodemus sp.* but only data from bank voles were included in the analysis given that it is the only reservoir species for PUUV.

		Site A	Site B	Site C	Site D
2000	Session 1	19	2	0	0
	Session 2	17	19	4	0
	Session 3	42	29	10	0
	Session 4	32	9	5	0
	Session 5	8	1	0	0
2001	Session 1	34	5	8	0
	Session 2	22	40	13	1
	Session 3	38	46	23	16
	Session 4	36	46	8	12
	Session 5	31	35	4	5
2002	Session 1	4	5	1	0
	Session 2	28	9	14	1
	Session 3	30	10	34	2
	Session 4	26	4	33	0
	Session 5	14	1	32	0
2003	Session 1	12	0	9	0
	Session 2	48	61	16	2
	Session 3	73	87	22	32
	Session 4	91	64	2	14
	Session 5	54	30	12	10
2004	Session 1	0	2	0	0
	Session 2	0	3	0	0
	Session 3	7	5	0	0
	Session 4	14	6	0	0
	Session 5	4	0	0	0
2005	Session 1	8	15	34	3
	Session 2	42	61	98	14
	Session 3	58	45	74	23
	Session 4	67	44	62	17
	Session 5	0	22	42	7
2006	Session 1	1	1	0	0
	Session 2	9	1	0	0
	Session 3	17	5	0	0
	Session 4	10	1	0	0
	Session 5	1	0	2	0
2007	Session 1	2	0	0	0
	Session 2	37	22	14	1
	Session 3	47	34	17	13
	Session 4	16	13	9	3
	Session 5	17	4	10	3
2008	Session 1	0	2	6	1
	Session 2	9	12	27	5
	Session 3	27	8	43	12
	Session 4	17	5	3	2
	Session 5	8	3	9	4
2009	Session 1	4	0	0	1
	Session 2	21	0	5	3
	Session 3	45	22	24	8
	Session 4	21	5	6	0

Session 5	6	3	13	6
-----------	---	---	----	---

Table 1: Number of captures of bank voles per year, session and site

PUUV data seroprevalence and incidence

Sera were tested by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) on PUUV and Hantaan virus antigen (Augot et al., 2006). Seroprevalence was calculated as the proportion of seropositive rodents (PUUV+) among all individuals captured during a given trapping session:

$Pr_t = \frac{\text{Number of seroprevalent individuals at } t}{\text{Number of sensitive individuals at } t}$. All individuals weighting less than 14 g, considered as young individuals still protected by maternal antibodies, were excluded for calculating seroprevalence values.

Incidence rates (IR) between two successive sessions were calculated as the ratio of incident (seroconverted) individuals among sensitive individuals:

$IR_{t \text{ to } t+1} = \frac{\text{Number of incident individuals between } t \text{ and } t+1}{(\text{Number of sensitive individuals at } t + \text{Number of sensitive individuals at } t+1)/2}$. Decision rules to identify incident and sensitive individuals, depending on the weight of rodents and their serological histories, are described in Fig.1.

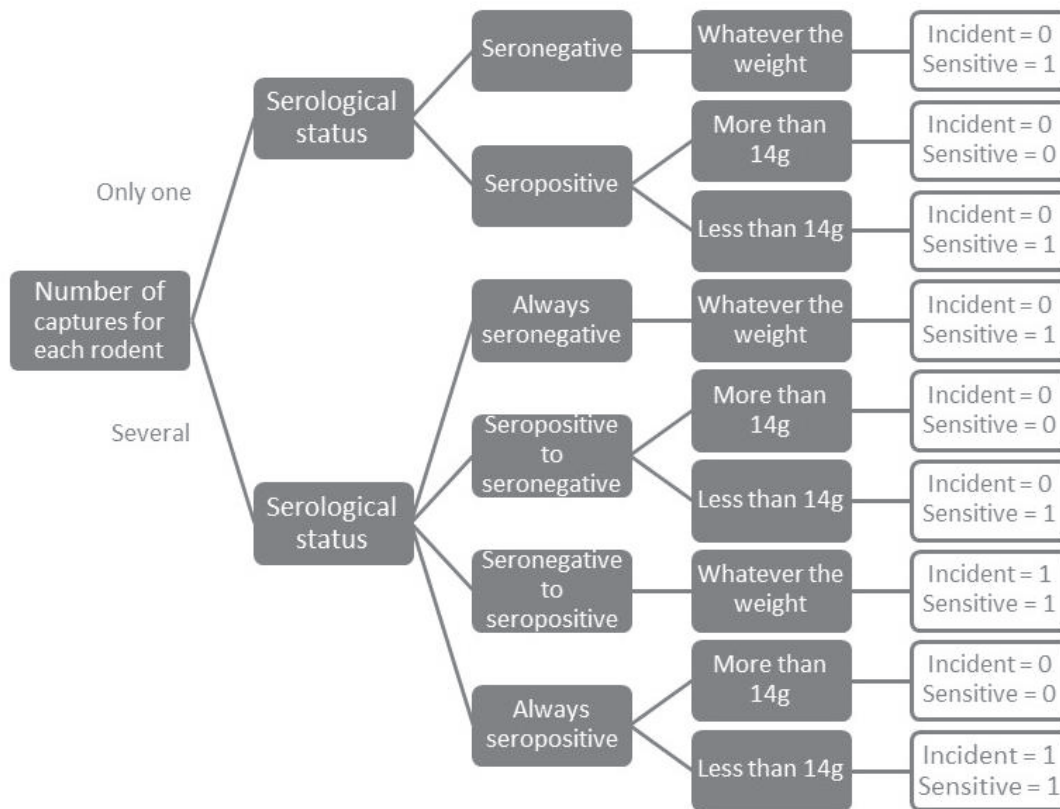


Figure 1. Decision rules to identify incident and sensitive individuals among captured bank voles. Incident cases are all rodents that became infected during the study period. A seropositive result in a rodent weighting less than 14 g (and then considered as a juvenile) was assumed to arise from maternal antibodies.

A review of the literature showed that the relationships between incidence rate or seroprevalence and environmental covariates depends on the season (Monchatre-Leroy et al. 2017); therefore, we decided to split the CMR data in two seasons: “spring” that included the three sessions from April to July (August in 2000) and “autumn” with the two sessions from September (the 29th and 30th of August in 2001 and 2003 respectively) to October. Likewise, seroprevalence and incidence rate were grouped into these two seasons (Fig. 2).

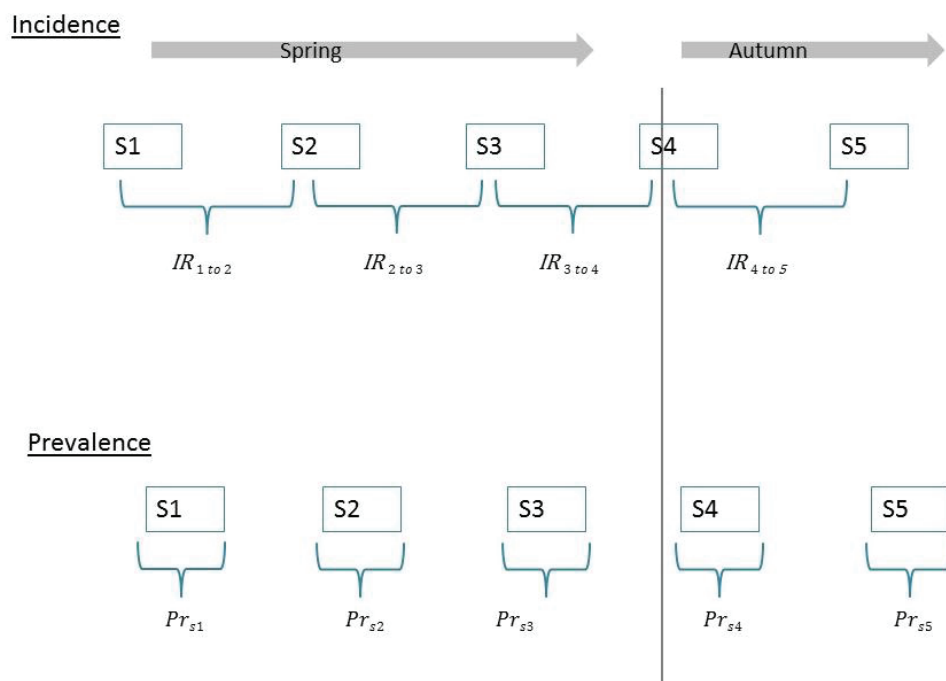


Figure 2. Scheme of calculation of prevalence and incidence in spring and autumn

Environmental data

We gathered data on environmental variables reported in the literature as risk factors of rodent infection (reviewed in Monchatre-Leroy et al., 2017). Normalized Difference Vegetation Index (NDVI) data were acquired from the Global Agriculture Monitoring (GLAM) project (<https://ipad.fas.usda.gov/glam.htm>). Data were provided with a spatial resolution of 250 meters using a 16-day compositing period. The French national meteorological Institute (Météo France) provided daily temperature and precipitation data from 1998 for sites A and B from one meteorological station for both sites, and the French national forest Institute (ONF) provided these data for site C from

his private station. Minimum and maximum daily temperatures and daily cumulative rainfall were available from each meteorological station. Because correlation was strong between minimum and maximum daily temperatures in each meteorological station (Pearson correlation: 0.94, p -value < 2.10⁻¹⁶), only maximum daily temperatures were used. The variables were measured during the previous winter (from November to December), spring (from April to July) and autumn (from September to October). We also calculated mean annual maximum temperature value two years before (“Temp_{Y-2}”) as it may be considered an indicator of seed production during the year preceding (see Clement et al. 2009). Variables for the spring analyses included NDVI (“NDVI_w”, “NDVI_s”), temperatures (“temp_w”, “temp_s”) and rainfall (“rain_w”, “rain_s”) of previous winter and spring, and temperature two years before (“Temp_{Y-2}”). Variables for the autumn analyses included NDVI (“NDVI_s”, “NDVI_a”), temperatures (“temp_s”, “temp_a”) and rainfall (“rain_s”, “rain_a”) of spring and autumn (Table 2).

Variables	Method of calculation
temp_s	Average of daily maximum temperatures from April to July
rain_s	Cumulative rainfall from April to July
NDVI_s	Average of NVDI values from April to July
temp_a	Average of daily maximum temperatures from August to October
rain_a	Cumulative rainfall from August to October
NDVI_a	Average of NVDI values from August to October
temp_w	Average of daily maximum temperatures during the previous November-January period
rain_w	Cumulative rainfall during the previous November-January period
NDVI_w	Average of NVDI values during the previous November-January period
temp_{N-2}	Average daily maximum temperatures from June to August 2 years before

Table 2: Description of independent variables used in the modelling of seasonal incidence or prevalence during 2000-2009.

Statistical analyses

Environmental covariates

Evaluation of correlations among covariates underlined strong multicollinearities between two or more variables (correlations and partial correlations assessed with package `ppcor` in R (R Development Core Team, 2018)): among variables for the spring analysis, there was a correlation structure between rain_w , temp_w and temp_s (correlations and partial correlations significant with $p < 0.05$). Among variables for the autumn analysis, there was a correlation between temp_a , temp_s , NDVI_a and rain_s (correlations and partial correlations significant with $p < 0.05$). To alleviate this difficulty, new variables were defined using a Principal Component Analysis (PCA, Package `FactoMineR`) in R. Based on eigenvalues decrease, we kept the two first dimensions for the analysis with the spring variables and the three first ones for the analysis with the autumn variables. Selected dimensions explained respectively 65.5% of the

variance in the spring variables (Fig. supp1, Table supp 1) and 85.2% of the variance in the autumn variables (Fig. supp1, Table sup 2).

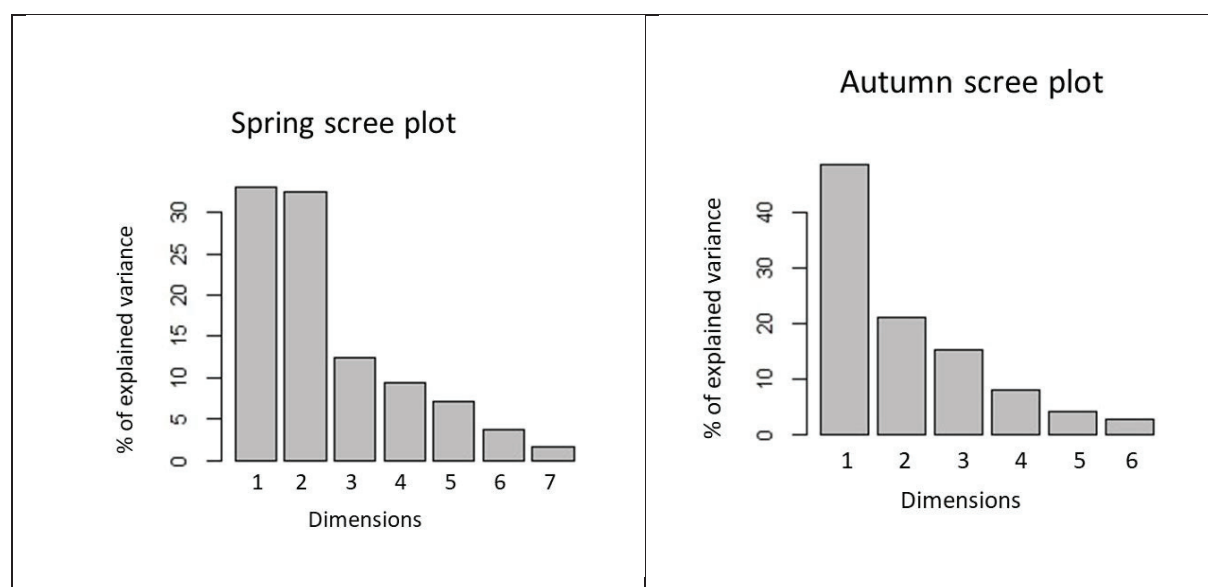


Figure supp1: Percentage of variance explained for each dimension of PCA in spring (A) and autumn (B)

	dimension 1	dimension 2
Variance	2.31	2.28
% of variance	33.00	32.53
Cumulative % of variance	33.00	65.53

Table supp 1: Eigenvalues of PCA of a dataset with NDVIs, NDVI_w, temp_s, temp_w, rain_s, rain_w, and temp_{N-2}

	dimension 1	dimension 2	dimension 3
Variance	2.92	1.27	0.92
% of variance	48.63	21.24	15.29
Cumulative % of variance	48.63	69.87	85.16

Table supp 2: Eigenvalues of PCA of a dataset with NDVIs, NDVI_a, temp_s, temp_a, rain_s and rain_a

To interpret each dimension, we considered the variables with the highest contribution (i.e. highest squared cosine ($\cos^2$) values (Abdi and Williams, 2010). For the PCA on spring variables, meteorological data (both temperatures and rainfall) in spring (from April to July) contributed most to dimension 1, and meteorological data during the previous winter (from November to December) and the NDVI in spring contributed most to dimension 2 (Table 4A). Similarly, for the PCA on autumn variables,

meteorological data in both spring and autumn contributed most to dimension 1, NDVI in autumn to dimension 2 and NDVI in spring to dimension 3 (Table 4B).

Variables	dimension 1			dimension 2		
	cos ²	correlation	P value	cos ²	correlation	P value
NDVI_s	0.05	/	ns	0.50	0.71	<0.001
NDVI_w	0.09	/	ns	0.48	0.70	<0.001
temp_s	0.69	0.83	<0.001	0.01	/	ns
temp_w	0.27	0.52	0.001	0.60	0.77	<0.001
rain_s	0.56	-0.74	<0.001	0.05	/	ns
rain_w	0.18	-0.42	0.02	0.63	0.80	<0.001
temp_{N-2}	0.47	0.68	<0.001	0.01	/	ns
Biological significance	Meteorological conditions in spring			Meteorological conditions of previous winter and food availability in spring		

cos²: quality of variables projection on each dimension, ns: not significant

NDVI_s: average of NVDI values from April to July / NDVI_w: average of NVDI values during the previous November-January period / temp_s: average of daily maximum temperatures from April to July / temp_w: average of daily maximum temperatures during the previous November-January period / rain_s: cumulative rainfall from April to July / rain_w: cumulative rainfall during the previous November-January period / temp_{N-2}: average daily maximum temperatures from June to August 2 years before

Table 3A: Contribution of variables to selected dimensions in the PCA for the spring analysis

	dimension 1			dimension 2			dimension 3		
	cos ²	correlation	P value	cos ²	correlation	P value	cos ²	correlation	P value
NDVI_s	0.10	/	ns	0.14	0.37	0.05	0.75	0.87	<0.001
NDVI_a	0.30	0.54	0.002	0.55	0.74	<0.001	0.04	/	ns
temp_s	0.56	0.75	<0.001	0.25	-0.49	0.01	0.07	/	ns
temp_a	0.83	0.91	<0.001	0.00	/	ns	0.02	/	ns
rain_s	0.70	-0.83	<0.001	0.08	/	ns	0.06	/	ns
rain_a	0.43	-0.65	<0.001	0.26	0.51	0.05	0.00	/	ns
Biological significance	Meteorological conditions of the year			Food availability in autumn			Food availability in spring		

cos²: quality of variables projection on each dimension, ns: not significant

NDVI_s: average of NVDI values from April to July / NDVI_a: average of NVDI values from August to October / temp_s: average of daily maximum temperatures from April to July / temp_a: average of daily maximum temperatures from August to October / rain_s: cumulative rainfall from April to July / rain_a: cumulative rainfall from August to October

Table 3B: Contribution of variables to selected dimensions in the PCA for the autumn analysis

GEE models

The numbers of incident and prevalent rodents per session were modelled as count variables using Generalized Estimating Equations (GEE) models with a log link and Poisson error (Liang and Zeger 1986; Zeger et al., 1988). GEE models are statistical models particularly suitable to deal with correlation in the data, as expected in package “*mmggee*” (Ristl et al., 2019) in the R software program (R core team, 2018) our data set between counts within season and site.

A limitation of GEE models is that their performances decreased much if the number of panels is too small (see below) and a standard rule of thumb is to use at least 30 panels (Hardin and Hilbe 2003: 132; even 40 for randomized clustered trials according to Li and Redden (2015)). The number of panels in our data sets was either 28 (incidence at spring) or 29 (prevalence at spring and autumn). So we decided to compute all standard errors from the best model using the Kauermann and Carroll (2001)’s correction for small samples. However this small sample correction is not currently implemented in PROC GENMOD, the SAS procedure designed to run «classic» GEE models, i.e. using asymptotic estimators, estimated by the method of moments as proposed by Liang and Zeger (1986). Thus we had to use another procedure, PROC GLIMMIX that made use of a different estimation method, i.e. residual pseudo-likelihood, to be able to work out the Kauermann and Carroll (2001)’s correction. As already reported by other authors facing the very same problem (McNeish and Stapleton 2016; McNeish and Harring 2017), estimates from PROC GENMOD and PROC GLIMMIX before the correction were however nearly identical.

Except for the analysis on incidence in autumn, full GEE models included the logarithm of the number of sensitive rodents (calculated as described in Fig.2) as an offset, factors site (*site*), time intervals (*ti*) for incidence or trapping session (*session*) for seroprevalence, the two or three first principal components (*dim1*, *dim2* and *dim3*) as continuous covariates, and all two-way interactions between site and principal components (*dim1*site*, *dim2*site* and *dim3*site*). Besides, to deal with the fact that the numbers of incident (or seropositive) rodents may not be independent between time intervals (or sessions) within a given year, we used an exchangeable process or an autoregressive process of first order as working correlation matrix. To make a choice between an exchangeable and an autoregressive process of first order as the working correlation matrix, we worked out the autocorrelation function of the Pearson residuals from the full model with an independence structure correlation (function *acf* from R package “stats”).

For the analysis on incidence in autumn, we used a Poisson regression model because there was only one observation by year and site. The data were sparse however and it was not possible to estimate site-specific slopes for the environmental covariates *dim1* and *dim2* for sites A and B, so we included

a common slope for sites A and B and a specific slope for site C plus site-specific slopes for *dim3* in the full model.

We carried out a backward model selection based on the generalized score test, which is known to be conservative (Guo et al., 2005). Model selection was carried out using package “mmmgee” (Ristl et al., 2019) in the R software program (R core team, 2018). At each step, the term with the highest p-value is removed on the next step until all effects remaining in the model were significant at the 5% level.

All estimates are displayed with a 95% confidence interval constructed from t-quantiles as recommended by several authors for GEE estimates (Pan and Wall 2002; Teerenstra et al., 2010; Li and Redden 2015). For each analysis, the fit of the best model was assessed graphically with randomized quantile residuals (Dunn and Smyth 1996).

Results

Seroprevalent and incident rodents

The number of captures was very different between years, seasons and sites (Table 1). Very few animals were trapped in years 2004 and 2006 while years 2001, 2003 and 2005 were years with many captures in all sites. Captures were more regular in site A (seven years with captures in all sessions) than in sites B and C (five years with captures in all seasons). Most captures were made in site A (n = 1174) in comparison with site C (n=748) and site B (n=827).

There were more seroprevalent rodents than incident ones (Table 5). There was no or only one incident rodent in site C for six years (2000, 2001, 2003, 2006, 2007 and 2009) and in sites A and B for seven years (2000, 2002, 2004, 2006, 2007, 2008 and 2009). Seroprevalent rodents were trapped every year in each site except in 2006 for all sites, in 2000 for site A and in 2009 for site B.

		Number of incident individuals / number of sensitive individuals				Number of prevalent individuals / number of negative individuals				
		April-June interval	June-July interval	July-September interval	September-October interval	April session	June session	July session	September session	October session
2000	Site C	0/1.5	1/5	0/4.5	0/1	nc	1/3	3/7	3/2	nc
	Site A	0/18	0/29.5	0/37	0/20	0/19	0/17	0/42	0/32	0/8
	Site B	0/10	0/21	0/16.5	0/5	0/2	1/18	1/24	0/9	0/1
2001	Site C	0/4	0/10	1/10.5	0/4	4/4	9/4	7/16	3/5	1/3
	Site A	2/25	7/25	3/27	1/29	4/30	2/20	6/30	6/30	3/28
	Site B	0/14.5	4/28.5	3/29	2/23	3/2	13/27	16/30	16/28	17/18

2002	Site C	0/3	1/13.5	1/21.5	2/23.5	0/1	9/5	12/22	12/21	6/26
	Site A	0/13.5	1/26.5	0/27	0/20	2/2	3/25	2/28	0/26	0/14
	Site B	0/3	0/5.5	1/4.5	0/1.5	4/1	4/5	4/6	1/3	1/0
2003	Site C	1/4	0/9.5	0/7.5	0/4.5	7/2	10/6	9/13	0/2	5/7
	Site A	1/20.5	9/46.5	3/62.5	1/56	8/4	11/37	17/56	22/69	11/43
	Site B	0/19	5/57	9/59.5	3/30	nc	22/38	11/76	21/42	13/17
2004	Site C	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
	Site A	nc	0/3	0/9.5	0/8.5	nc	nc	1/6	1/13	0/4
	Site B	0/2	0/3.5	0/5.5	0/3	0/2	1/2	0/5	0/6	nc
2005	Site C	0/41.5	2/60	1/53	3/42.5	17/17	32/64	20/54	10/52	9/33
	Site A	0/17.5	1/35	1/47	0/26.5	2/6	13/29	17/41	14/53	Nc
	Site B	1/20.5	1/29	2/25.5	0/19	6/9	29/32	19/26	19/25	9/13
2006	Site C	nc	nc	nc	0/1	nc	nc	nc	nc	0/2
	Site A	0/5	0/13	0/13.5	0/5.5	0/1	0/9	0/17	0/10	0/1
	Site B	0/1	0/3	0/3	0/0.5	0/1	0/1	0/5	0/1	nc
2007	Site C	0/6.5	1/15.5	0/13.5	0/9	nc	1/13	1/16	0/9	0/10
	Site A	0/19.5	0/42	0/31	0/16	0/2	2/35	0/47	1/15	0/17
	Site B	0/9	1/24	0/20.5	0/7	nc	4/18	3/31	0/13	0/4
2008	Site C	0/13.5	3/25.5	1/15.5	0/2	0/6	6/21	13/30	2/1	6/3
	Site A	0/4.5	0/19	0/23	0/12.5	nc	0/9	0/27	0/17	0/8
	Site B	0/5.5	1/7	0/3.5	0/3	1/1	2/10	4/4	2/3	0/3
2009	Site C	0/0.5	0/9.5	0/11	0/8.5	nc	4/1	6/18	2/4	0/13
	Site A	0/12.5	0/33	1/32.5	0/13	0/4	0/21	1/44	1/20	0/6
	Site B	nc	0/11	1/14	0/2	nc	nc	0/22	0/5	0/3

nc: not calculated because of lack of capture / names of sites are in accordance with Augot et al., 2008

Table 5: Seasonal seroprevalence and incidence estimates per year and trapping site

Model selection and estimates from best model

Model selection results for each analysis are described in Tables 6, 7 and 8. From traditional plots of residuals (Fig. supp2), there was no hint for any data set that best model did not fit the data.

Spring models

The autocorrelation function did not show a decrease in the correlation among observations between lag 1 (consecutive observations) and lag 2 (observations separated by a two-time lag) but instead a relatively constant correlation (see Table 7). This suggested an exchangeable working correlation matrix. The correlation estimate from best model was high indeed (0.70). Best model included a single variable *site* (Table 6). Seroprevalence estimate was the highest at site C (0.31 [0.25; 0.40]) and was statistically different from that at site A (0.10 [0.04; 0.23] $p=0.01$) but not from seroprevalence estimate at site B (0.23 [0.14; 0.39] $p=0.29$). The difference in seroprevalence estimates between sites A and B was marginally significant ($p=0.08$).

The autocorrelation function showed a strong decrease in the correlation among observations between lags 1 and 2 (see table 7). This pattern suggested then an autoregressive process of first order

as the working correlation matrix. The corresponding correlation estimate from best model was rather small (0.31). Best model included environmental variable *dim2* and factor *session*. Spring incidence increased (0.27 [0.003; 0.53]) with environmental covariate *dim2* that in turn increased with spring NDVI, rainfall and temperature of previous winter. Incidence varied during spring season. Incidence estimate was at its lowest level in April-June (0.014 [0.006; 0.03]), increased significantly to a maximum in June-July (0.055 [0.04; 0.08] $p=0.0006$) and then decreased slightly in July-September (0.039 [0.02; 0.07] $p=0.048$). The difference in incidence estimates between June-July and Jul-September was not statistically significant ($p=0.26$).

Full model in spring: <i>site*dim1 + site*dim2 + ti or session</i>				
Step from full model (full model = step 0)	Incidence		Prevalence	
	Removed variable	p-value	Removed variable	p-value
Step 1	<i>site*dim1</i>	0.85	<i>site*dim2</i>	0.54
Step 2	<i>site*dim2</i>	0.47	<i>dim2</i>	0.23
Step 3	<i>site</i>	0.31	<i>session</i>	0.25
Step 4	<i>dim1</i>	0.37	<i>site*dim1</i>	0.18
Step 5			<i>dim1</i>	0.10
	Best model: <i>dim2 + ti</i> p-value of test score for <i>dim2</i> : 0.06 p-value of test score for <i>ti</i> : 0.04		Best model: <i>Site</i> p-value of test score for <i>Site</i> : 0.02	

p-values of the chi-square of the generalized robust score test; *ti* time interval between two trapping sessions for incidence model; *dim1*, *dim2*: first and second principal component on the environmental covariates.

Table 6: Model selection for the spring analysis.

Autocorrelation\Lags	0	1	2
Prevalence	1.000	0.430	0.460
Incidence	1.000	0.167	0.010

Table 7: Autocorrelation functions for prevalence and incidence in the spring analysis (three observations for each combination of site and year).

Autumn models

The correlation estimate from best model was small (0.36). Best model included environmental variables *dim1* and *dim2* as well as factor *site* (Table 8). Seroprevalence increased (with regression coefficients of 0.68 [0.28; 1.08] and 0.29 [0.09; 0.49]) for environmental covariate *dim1* and covariate *dim2*, respectively). Covariate *dim1* increased when spring and autumn temperature increased and when spring rain decreased. Covariate *dim2* increased with autumn NDVI. Seroprevalence estimate was the highest at site C (0.80 [0.31; 2.05]) and the lowest at site A (0.04 [0.02; 0.09] $p=0.0006$). The

seroprevalence estimate at site B (0.11 [0.05; 0.22]) was statistically different from the seroprevalence estimate at sites A and C (respectively $p=0.0121$ and $p<0.0001$).

About incidence, there were 29 observations. Best model included only factor *site* (Table 8). Incidence estimate was the lowest at site A (0.01 [0.002; 0.03] and was statistically different from that at site B (0.05 [0.03; 0.37] $p=0.04$) and site C (0.05 [0.04; 0.36] $p=0.04$). The difference in incidence estimates between sites B and C was not significant ($p=0.97$).

	Full model in autumn: <i>siteAB_C*dim1 + siteAB_C*dim2 + site*dim3</i>		Full model in autumn: <i>site*dim1 + site*dim2 + site*dim3 + session</i>	
	Incidence		Prevalence	
Step from full model (full model = step 0)	Removed variable	p-value (likelihood ratio test)	Removed variable	p-value (generalized robust score test)
Step 1	<i>siteAB_C*dim2</i>	0.77	<i>session</i>	0.96
Step 2	<i>siteAB_C*dim1</i>	0.08	<i>site*dim2</i>	0.54
Step 3	<i>site*dim3</i>	0.26	<i>site*dim3</i>	0.39
Step 4	<i>dim3</i>	0.72	<i>dim3</i>	0.96
Step 5	<i>dim2</i>	0.34	<i>site*dim1</i>	0.07
Step 6	<i>dim1</i>	0.43		
	Best model: <i>site</i> p-value of <i>site</i> : 0.04		Best model: <i>site + dim1 + dim2</i> p-value of test score for <i>site</i> : 0.001 p-value of test score for <i>dim1</i> : 0.005 p-value of test score for <i>dim2</i> : 0.008	

ti: time interval between two trapping sessions for incidence model and at each session for prevalence model; *dim1*, *dim2* and *dim3* first, second and third principal component on the environmental covariates; *siteAB_C* denotes a factor with only two levels, one for site C and the other one for both sites A and B.

Table 8: Model selection for the autumn analysis

Discussion

Our study assessed the impact of environmental variables on PUUV incidence and seroprevalence in bank vole populations, monitored over ten years at three different sites in Northern France. In spring, while only site impacted prevalence, meteorological conditions of previous winter and food availability in spring were found to be important drivers of incidence. In contrary, in autumn, while meteorological conditions of the year and food availability in autumn impacted prevalence, only site was found significant for incidence. Ours is the first study to use incidence measures to estimate the effect of environmental variables on PUUV rodent infection. Only one study used seroconversion rate very similar with our incidence (Voutilainen et al., 2016) to assess PUUV infection depending on intra and interannual cyclic phase of host density and not on environmental variables. As it could be expected, results of the influence of environmental variables differed markedly when incidence was considered

instead of seroprevalence. These results are consistent with the fact that incidence and seroprevalence are not representative of the same phenomena. Because antibodies remain life-long in infected bank voles, seroprevalence is a measure of cumulative infection over an extended period of time. Accordingly, there was a strong correlation between seroprevalence measures between sessions because all rodents identified as seropositive in one session were still positive in next sessions. In contrast, incidence is more representative of immediate contamination by PUUV. Thus, the number of incident rodent was linked to the number of infected rodent at last session (i.e., correlation structure decreased with time) because the latter were the source of the contamination of the incident rodents.

Study limits

In our study, the numbers of incident and prevalent rodents were estimated several times per season at each site and thus these counts were correlated. GEE models are designed to deal with correlated data and to yield a robust estimate of the variance/covariance matrix, using the modified sandwich variance estimator that has the advantage of being consistent even if the working correlation matrix has been misspecified (Liang and Zeger 1986; Hardin and Hilbe 2003). Unfortunately, this estimator has been shown to underestimate the variance in analysis based on small data set and thus to lead to liberal Wald-type test results (Paik 1988; Feng et al., 1996; Lu et al., 2007). In consequence, corrections of the modified sandwich variance estimator or other estimators (e.g. jackknife or clustered bootstrap) have been proposed to improve the performances of GEE with small samples (e.g. Paik 1988; Lipsitz et al., 1990; Kauermann and Carroll 2001; ManCl and DeRouen 2001; Pan 2001; Morel et al., 2003; Wang and Long 2010; Chen et al., 2013; Gosho et al., 2014; Paul and Zhang 2014; McNeish and Stapleton 2016). However, the performance of these estimators applied to correct for small samples have not been investigated and compared (McNeish and Stapleton 2016). Indeed, most studies presented numeric simulations to compare a handle of corrections of the modified sandwich variance estimator (Pan and Wall 2002; Lu et al., 2007; Teerenstra et al., 2010; Li and Redden 2015; McNeish and Haring 2017 but see a recent study by Wang et al. (2016) who compared eight corrections of the modified sandwich variance estimator). Besides, these comparisons have shown that many factors (number of panels, number of parameters in the model, variation in panel sample sizes, nature of response and predictor variables...) could impact the performances of GEE in small samples which hampers the choice of a correction for a specific data set.

In this context, we decided to make use of the corrections proposed to the modified sandwich variance by Kauermann and Carroll (2001), for two reasons. First, this correction has been extensively used in simulations and, for clustered randomized trials, it has been recommended in small samples for covariates varying at the cluster-level with a moderate cluster sample size variation (Lu et al., 2007; Teerenstra et al., 2010; Li and Redden 2015), which are characteristics shared by our three data sets.

Second, it has been shown that the Kauermann and Carroll (2001)'s correction performed satisfactorily with t-tests (see their figures 3 and 4) (Wang et al. 2016). Among other corrections, the ones proposed by Gosho et al (2014) or Morel et al. (2003) turned out to be conservative (Wang et al. 2016, McNeish and Harring 2017) for binary predictor variables. The correction from Mancl and DeRouen (2001) appeared also to overcorrect in a number of simulations (Fay and Graubard 2001; Wang and Long 2010; Li and Redden 2015). Finally, we have discarded other alternatives, e.g. the one from Pan (2001) or Wang and Long (2010) that require further assumptions difficult to test with the sparse data sets at hand.

Seroprevalence

Our study highlighted the effects of meteorological conditions and food availability on autumn seroprevalence. More specifically, rodent seroprevalence increased when spring and autumn temperature increased and spring rain decreased (i.e. when meteorological conditions were warm and dry) and when NDVI increased. In contrast, our results did not highlight an influence of climate conditions on spring seroprevalence (estimated in three trapping sessions from April to July). Our results appear to differ from findings of previous studies (Tersago et al., 2008; Linard et al., 2007; Thoma et al., 2014). Regarding the effect of temperature, negative associations were found between mean annual seroprevalence and mean annual temperature in Germany (Thoma et al., 2014), between seroprevalence in August-September and both summer temperature (Tersago et al., 2008 in Belgium) and temperature of the previous winter (Linard et al., 2007 in French Ardennes; Tersago et al., 2008). The effect of rain has been found to vary widely between studies: one study found a negative effect between seroprevalence assessed on a given date once or twice per year and the average of daily precipitation of the previous autumn (Linard et al., 2007); another study found a positive effect of spring rain on seroprevalence in August-September (Tersago et al., 2008). At last, studies using NDVI as a proxy for food availability showed contrasted results, with a positive (Linard et al., 2007) or no association (Tersago et al., 2008) between mean NDVI in July 2001 and seroprevalence in August-September 2004-2005.

This variability in findings between studies result from differences in both experimental design and statistical methods, which limits the comparison and interpretation of results. First, in contrast to previous studies which monitored sites during only two years with one or two trapping sessions each year, our results rely on a ten-year follow-up of rodent populations with five trapping sessions each year and should thus be more robust. Second, our study evaluated the influence of environmental drivers of seasonal seroprevalence at local scale, while previous studies monitored a larger number of sites (14-23 sites) distributed all over Belgium (Linard et al., 2007; Tersago et al., 2008) or within a large region of Germany (Thoma et al., 2014). Yet, variability in vegetation, rodent habitat and soil

characteristics alter the influence of meteorological conditions on seroprevalence; therefore, results from large scale studies could not be the same as those from small scale models. Accordingly, it has been previously shown that variables do not have the same effect across space, resulting in different hypotheses depending of the localization within the region (Zeimes et al., 2015). Lastly, while in our study Principal Component Analysis was used to deal with multicollinearity among environmental variables, no information was provided in other study regarding the existence and influence of multicollinearity among variables. The delay in measurement between environmental variables and seroprevalence values is also critical. Our study used NDVI means calculated during the same period over which rodents were sampled. In contrast, in other studies (Linard et al. 2007, Tersago et al. 2008), a single value of NDVI by site was used to evaluate the impact of seroprevalence of rodents trapped at least three years later; the large time lag between these measures of seroprevalence and NDVI make these results biologically questionable.

The positive influence of warm and dry meteorological conditions and of food availability on autumn seroprevalence, observed in our study, suggests that autumn seroprevalence was related to the dynamics of the rodent population (and was less in relation with virus survival in the environment). Indeed, several studies underlined the influence of meteorological conditions on bank vole density, and subsequently on seroprevalence as high rodent density may induce higher probabilities of contamination (Clement et al., 2009; Escutenaire et al., 2000). Thus, favorable spring and autumn temperatures result in extended breeding season (Pucek et al., 1993) and consequently in high population density which ultimately influences seroprevalence in autumn. In contrast, we found a negative effect of spring rain on autumn seroprevalence which may be explained by a decrease of rodent activity during rainy season (Selas et al., 2011) because of the loss of energy with wet fur (Terraube et al., 2017).

Surprisingly, our study found no impact of environmental variables on spring seroprevalence (our model revealed an effect of the site only). One explanation was to suppose that environment was not the main factor of contamination in spring. Another hypothesis is to consider that seroprevalence was not enough precise of the moment of infection and then, should fail to highlight impact of environment on rodent infection. But it was not consistent with seroprevalence in autumn impacted by environmental variables in our model. A last hypothesis may be that model of prevalence in autumn did not highlighted factors increasing rodent contamination but highlighted factors increasing density of rodent infected or not as infection did not cause diseases in rodents (Dubois et al., 2017). Indeed, if some factors were shared between rodent contamination and rodent density, others should be more specific of contamination as rodent behavior modulated by environment.

Our study did not underline an effect of winter temperatures on spring seroprevalence. This result contrasts with findings from previous short-term studies which found a higher seroprevalence when winter temperatures are unusually low (Linard et al., 2007; Tersago et al., 2008), explained by a better virus survival when temperatures are cold (Kallio et al., 2006a). Besides, it has been suggested that rodents have a better survival probability during mild winter (Haredasht et al., 2013; Schwarz et al., 2009; Tersago et al., 2009; Piechotowski et al., 2008), although some studies showed more contrasted results (Flowerdew et al., 2017; Johnsen et al., 2018; Stenseth et al., 2002). Yet, a higher rodent survival in winter increases rodent density in spring and then potentially the probability of contamination. These contrasted effects of winter temperatures on virus survival, on one hand, and rodent density, on the other hand, may explain the lack of association observed in our long-term study (due to a leveling of the effects between years).

Incidence

Our model highlighted that spring incidence increased with spring NDVI and both rainfall and temperature of previous winter. Different factors may explain this relation. A first hypothesis is an increase of incidence via a better survival of rodents in mild winters. Such an effect has been suggested by previous studies investigating the effect of winter temperature on the number of human cases (although no information was collected on incidence or prevalence in rodent populations) (Schwarz et al., 2009; Tersago et al., 2009). Secondly, the positive relation found in our study between rainfall and spring incidence in rodents align with a previous study that showed a better survival of virus during wet winters (Kallio et al., 2006b). At last, rainfall during winter may cause a change in rodents' behavior (i.e. less activity and more aggregation in nest; Terraube et al. 2017) (Wrobel et al., 2015) or increase food and shelter availability promoting the increase of rodent population and consequently the number of infected rodents (Linard et al., 2007; Khalil et al., 2017; Haredasht et al., 2013).

Our results showed that autumn incidence was primarily influenced by site, with no influence of climate or food availability. However, the lack of association between autumn incidence and environmental covariates should be interpreted cautiously because of the low number of incident rodents in our study in autumn that could have induced a lack of statistical power.

In conclusion, our study provides an assessment of the effects of the environment on seasonal PUUV contamination in bank voles, using two alternative indicators of rodent infection: incidence and prevalence. Incidence is more precise than seroprevalence to evaluate the moment of rodent contamination, but an accurate assessment of incidence requires a longitudinal monitoring with

repeated trapping sessions in several sites, which implies an investment in both human and financial resources. It still remains unclear whether rodent incidence instead of seroprevalence should be used in addition to environmental risk factors to predict human cases. This choice should be conditioned by the time course of PUUV excretion. Several experimental or model studies (Hardestam et al., 2008; Sauvage et al., 2007) considered PUUV main shedding during few weeks after infection and then, incidence should be a better indicator of the number of human cases via the amount of environmental contamination. In contrary, one field study (Voutilainen et al., 2015) highlighted longer period of PUUV excretion in wild naturally infected bank voles. In this case, seroprevalence is a good proxy of the risk of human exposure. Because hantaviruses diseases are considered as emerging in Europe, longitudinal studies with homogenized design among European countries are needed to improve the understanding of the impact environmental risk factors on rodent and human contamination in a context of accelerating environmental evolution.

Acknowledgements

We would like to thank Robin Ristl for his kind help with the R-package mmmgee and ONF for meteorological data of Croix-Scaille.

References

- Abdi, H., Williams, L.J., 2010. Principal component analysis: Principal component analysis. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics 2, 433–459. <https://doi.org/10.1002/wics.101>
- Augot, D., Muller, D., Demerson, J.M., Boué, F., Caillot, C., Cliquet, F., 2006. Dynamics of Puumala virus infection in bank voles in Ardennes department (France). Pathol. Biol. 54, 572–577. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2006.07.039>
- Augot, D., Sauvage, F., Boue, F., Bouloy, M., Artois, M., Demerson, J.M., Combes, B., Coudrier, D., Zeller, H., Cliquet, F., Pontier, D., 2008. Spatial and temporal patterning of bank vole demography and the epidemiology of the Puumala hantavirus in northeastern France. Epidemiol. Infect. 136, 1638–1643. <https://doi.org/10.1017/S0950268808000423>
- Barrios, J.M., Verstraeten, W.W., Maes, P., Aerts, J.M., Farifteh, J., Coppin, P., 2013. Relating land cover and spatial distribution of nephropathia epidemica and Lyme borreliosis in Belgium. Int J Environ Health Res 23, 132–154. <https://doi.org/10.1080/09603123.2012.708918>
- Benhaïem, S., Marescot, L., Hofer, H., East, M.L., Lebreton, J.-D., Kramer-Schadt, S., Gimenez, O., 2018. Robustness of Eco-Epidemiological Capture-Recapture Parameter Estimates to Variation in Infection State Uncertainty. Front Vet Sci 5, 197. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00197>
- Bernshtein, A.D., Apekina, N.S., Mikhailova, T.V., Myasnikov, Y.A., Khlyap, L.A., Korotkov, Y.S.,

- Gavrilovskaya, I.N., 1999. Dynamics of Puumala hantavirus infection in naturally infected bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Arch. Virol.* 144, 2415–2428.
- Buzdugan, S.N., Vergne, T., Grosbois, V., Delahay, R.J., Drewe, J.A., 2017. Inference of the infection status of individuals using longitudinal testing data from cryptic populations: Towards a probabilistic approach to diagnosis. *Sci Rep* 7, 1111. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00806-4>
- Cheng, G., Yu, Z., Huang, J.Z., 2013. The cluster bootstrap consistency in generalized estimating equations. *Journal of Multivariate Analysis* 115, 33–47. <https://doi.org/10.1016/j.jmva.2012.09.003>
- Clement, J., Vercauteren, J., Verstraeten, W.W., Ducoffre, G., Barrios, J.M., Vandamme, A.-M., Maes, P., Van Ranst, M., 2009. Relating increasing hantavirus incidences to the changing climate: the mast connection. *Int J Health Geogr* 8, 1. <https://doi.org/10.1186/1476-072X-8-1>
- Combelles, L., Corbiere, F., Calavas, D., Bronner, A., Hénau, V., Vergne, T., 2019. Impact of Imperfect Disease Detection on the Identification of Risk Factors in Veterinary Epidemiology. *Front Vet Sci* 6, 66. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00066>
- Craft, M.E., Caillaud, D., 2011. Network models: an underutilized tool in wildlife epidemiology? *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2011, 676949. <https://doi.org/10.1155/2011/676949>
- Drewes, S., Turni, H., Rosenfeld, U.M., Obiegala, A., Straková, P., Imholt, C., Glatthaar, E., Dressel, K., Pfeffer, M., Jacob, J., Wagner-Wiening, C., Ulrich, R.G., 2017. Reservoir-Driven Heterogeneous Distribution of Recorded Human Puumala virus Cases in South-West Germany. *Zoonoses Public Health* 64, 381–390. <https://doi.org/10.1111/zph.12319>
- Dubois, A., Castel, G., Murri, S., Pulido, C., Pons, J.-B., Benoit, L., Loiseau, A., Lakhdar, L., Galan, M., Charbonnel, N., Marianneau, P., 2017. Experimental infections of wild bank voles (*Myodes glareolus*) from nephropatia epidemica endemic and non-endemic regions revealed slight differences in Puumala virological course and immunological responses. *Virus Res.* 235, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.04.004>
- Dunn, P.K., Smyth, G.K., 1996. Randomized Quantile Residuals. *Journal of Computational and Graphical Statistics* 5, 236. <https://doi.org/10.2307/1390802>
- Escutenaire, S., Chalon, P., Verhagen, R., Heyman, P., Thomas, I., Karelle-Bui, L., Avsic-Zupanc, T., Lundkvist, A., Plyusnin, A., Pastoret, P., 2000. Spatial and temporal dynamics of Puumala hantavirus infection in red bank vole (*Clethrionomys glareolus*) populations in Belgium. *Virus Res.* 67, 91–107.
- Fay, M.P., Graubard, B.I., 2001. Small-sample adjustments for Wald-type tests using sandwich estimators. *Biometrics* 57, 1198–1206.
- Feng, Z., McLERRAN, D., Grizzle, J., 1996. A comparison of statistical methods for clustered data

- analysis with Gaussian error. *Statistics in Medicine* 15, 1793–1806.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0258\(19960830\)15:16<1793::AID-SIM332>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0258(19960830)15:16<1793::AID-SIM332>3.0.CO;2-2)
- Flowerdew, J.R., Amano, T., Sutherland, W.J., 2017. Strong “bottom-up” influences on small mammal populations: State-space model analyses from long-term studies. *Ecology and Evolution* 7, 1699–1711. <https://doi.org/10.1002/ece3.2725>
- Gosho, M., 2014. Robust Covariance Estimator for Small-Sample Adjustment in the Generalized Estimating Equations: A Simulation Study. *Science Journal of Applied Mathematics and Statistics* 2, 20. <https://doi.org/10.11648/j.sjams.20140201.13>
- Guo, X., Pan, W., Connett, J.E., Hannan, P.J., French, S.A., 2005. Small-sample performance of the robust score test and its modifications in generalized estimating equations. *Stat Med* 24, 3479–3495. <https://doi.org/10.1002/sim.2161>
- Hardestam, J., Karlsson, M., Falk, K.I., Olsson, G., Klingström, J., Lundkvist, A., 2008. Puumala hantavirus excretion kinetics in bank voles (*Myodes glareolus*). *Emerging Infect. Dis.* 14, 1209–1215. <https://doi.org/10.3201/eid1408.080221>
- Hardin, J.W., Hilbe, J.M., 2003. Generalized estimating equations, Chapman & Hall/CRC company, Boca Raton, 222 p.
- Haredasht, S.A., Barrios, J.M., Maes, P., Verstraeten, W.W., Clement, J., Ducoffre, G., Lagrou, K., Ranst, M.V., Coppin, P., Berckmans, D., Aerts, J.-M., 2011. A dynamic data-based model describing nephropathia epidemica in Belgium. *Biosystems Engineering* 109, 77–89. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2011.02.004>
- Haredasht, S.A., Taylor, C.J., Maes, P., Verstraeten, W.W., Clement, J., Barrios, M., Lagrou, K., Van Ranst, M., Coppin, P., Berckmans, D., Aerts, J.-M., 2013. Model-based prediction of nephropathia epidemica outbreaks based on climatological and vegetation data and bank vole population dynamics. *Zoonoses Public Health* 60, 461–477. <https://doi.org/10.1111/zph.12021>
- Hazel, S.M., Bennett, M., Chantrey, J., Bown, K., Cavanagh, R., Jones, T.R., Baxby, D., Begon, M., 2000. A longitudinal study of an endemic disease in its wildlife reservoir: cowpox and wild rodents. *Epidemiol. Infect.* 124, 551–562. <https://doi.org/10.1017/s0950268899003799>
- Heyman, P., Ceianu, C.S., Christova, I., Tordo, N., Beersma, M., João Alves, M., Lundkvist, A., Hukic, M., Papa, A., Tenorio, A., Zelená, H., Essbauer, S., Visontai, I., Golovljova, I., Connell, J., Nicoletti, L., Van Esbroeck, M., Gjeruldsen Dudman, S., Aberle, S.W., Avšič-Županc, T., Korukluoglu, G., Nowakowska, A., Klempa, B., Ulrich, R.G., Bino, S., Engler, O., Opp, M., Vaheri, A., 2011. A five-year perspective on the situation of haemorrhagic fever with renal syndrome and status of the hantavirus reservoirs in Europe, 2005-2010. *Euro Surveill.* 16. <https://doi.org/10.2807/ese.16.36.19961-en>

- Johnsen, K., Devineau, O., Andreassen, H.P., 2018. The Effects of Winter Climate and Intrinsic Factors on Survival of Cyclic Vole Populations in Southeastern Norway. *Annales Zoologici Fennici* 55, 173–185. <https://doi.org/10.5735/086.055.0604>
- 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>
- Kallio, E.R., Klingström, J., Gustafsson, E., Manni, T., Vaheri, A., Henttonen, H., Vapalahti, O., Lundkvist, A., 2006a. Prolonged survival of Puumala hantavirus outside the host: evidence for indirect transmission via the environment. *J. Gen. Virol.* 87, 2127–2134. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81643-0>
- Kallio, E.R., Poikonen, A., Vaheri, A., Vapalahti, O., Henttonen, H., Koskela, E., Mappes, T., 2006b. Maternal antibodies postpone hantavirus infection and enhance individual breeding success. *Proc. Biol. Sci.* 273, 2771–2776. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3645>
- Karesh, W.B., Dobson, A., Lloyd-Smith, J.O., Lubroth, J., Dixon, M.A., Bennett, M., Aldrich, S., Harrington, T., Formenty, P., Loh, E.H., Machalaba, C.C., Thomas, M.J., Heymann, D.L., 2012. Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. *Lancet* 380, 1936–1945. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61678-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61678-X)
- Kauermann, G., Carroll, R.J., 2001. A Note on the Efficiency of Sandwich Covariance Matrix Estimation. *Journal of the American Statistical Association* 96, 1387–1396. <https://doi.org/10.1198/016214501753382309>
- Khalil, H., Olsson, G., Magnusson, M., Evander, M., Hörnfeldt, B., Ecke, F., 2017. Spatial prediction and validation of zoonotic hazard through micro-habitat properties: where does Puumala hantavirus hole – up? *BMC Infectious Diseases* 17. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2618-1>
- Li, P., Redden, D.T., 2015. Small sample performance of bias-corrected sandwich estimators for cluster-randomized trials with binary outcomes: P. LI AND D. T. REDDEN. *Statistics in Medicine* 34, 281–296. <https://doi.org/10.1002/sim.6344>
- Liang, K.-Y., Zeger, S.L., 1986. Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika* 73, 13–22. <https://doi.org/10.1093/biomet/73.1.13>
- Linard, C., Tersago, K., Leirs, H., Lambin, E.F., 2007. Environmental conditions and Puumala virus transmission in Belgium. *Int J Health Geogr* 6, 55. <https://doi.org/10.1186/1476-072X-6-55>
- Lipsitz, S.R., Laird, N.M., Harrington, D.P., 1990. Using the jackknife to estimate the variance of regression estimators from repeated measures studies. *Communications in Statistics - Theory and Methods* 19, 821–845. <https://doi.org/10.1080/03610929008830234>
- Lu, B., Preisser, J.S., Qaqish, B.F., Suchindran, C., Bangdiwala, S.I., Wolfson, M., 2007. A comparison of two bias-corrected covariance estimators for generalized estimating equations. *Biometrics* 63,

- 935–941. <https://doi.org/10.1111/j.1541-0420.2007.00764.x>
- Luis, A.D., Douglass, R.J., Hudson, P.J., Mills, J.N., Bjørnstad, O.N., 2012. Sin Nombre hantavirus decreases survival of male deer mice. *Oecologia* 169, 431–439. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-2219-2>
- Lyubsky, S., Gavrilovskaya, I., Luft, B., Mackow, E., 1996. Histopathology of *Peromyscus leucopus* naturally infected with pathogenic NY-1 hantaviruses: pathologic markers of HPS viral infection in mice. *Lab. Invest.* 74, 627–633.
- MacCallum, H., 2000. Population parameters: estimation of ecological models, *Methods in ecology*. Blackwell Science, Oxford.
- Mancl, L.A., DeRouen, T.A., 2001. A covariance estimator for GEE with improved small-sample properties. *Biometrics* 57, 126–134.
- McNeish, D., Harring, J.R., 2017. Correcting Model Fit Criteria for Small Sample Latent Growth Models With Incomplete Data. *Educ Psychol Meas* 77, 990–1018. <https://doi.org/10.1177/0013164416661824>
- McNeish, D., Stapleton, L.M., 2016. Modeling Clustered Data with Very Few Clusters. *Multivariate Behav Res* 51, 495–518. <https://doi.org/10.1080/00273171.2016.1167008>
- Monchatre-Leroy, E., Crespin, L., Boué, F., Marianneau, P., Calavas, D., Hénau, V., 2017. Spatial and Temporal Epidemiology of Nephropathia Epidemica Incidence and Hantavirus Seroprevalence in Rodent Hosts: Identification of the Main Environmental Factors in Europe. *Transbound Emerg Dis* 64, 1210–1228. <https://doi.org/10.1111/tbed.12494>
- Morel, J.G., Bokossa, M.C., Neerchal, N.K., 2003. Small Sample Correction for the Variance of GEE Estimators. *Biometrical Journal* 45, 395–409. <https://doi.org/10.1002/bimj.200390021>
- Netski, D., Thran, B.H., St Jeor, S.C., 1999. Sin Nombre virus pathogenesis in *Peromyscus maniculatus*. *J. Virol.* 73, 585–591.
- Paik, M.C., 1988. Repeated measurement analysis for nonnormal data in small samples. *Communications in Statistics - Simulation and Computation* 17, 1155–1171. <https://doi.org/10.1080/03610918808812718>
- Palo, R.T., 2009. Time series analysis performed on nephropathia epidemica in humans of northern Sweden in relation to bank vole population dynamic and the NAO index. *Zoonoses Public Health* 56, 150–156. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01162.x>
- Pan, W., 2001. On the robust variance estimator in generalised estimating equations. *Biometrika* 88, 901–906. <https://doi.org/10.1093/biomet/88.3.901>
- Pan, W., Wall, M.M., 2002. Small-sample adjustments in using the sandwich variance estimator in generalized estimating equations. *Stat Med* 21, 1429–1441. <https://doi.org/10.1002/sim.1142>
- Paul, S., Zhang, X., 2014. Small sample GEE estimation of regression parameters for longitudinal data.

- Stat Med 33, 3869–3881. <https://doi.org/10.1002/sim.6198>
- Pettersson, L., Boman, J., Juto, P., Evander, M., Ahlm, C., 2008. Outbreak of Puumala virus infection, Sweden. *Emerging Infect. Dis.* 14, 808–810. <https://doi.org/10.3201/eid1405.071124>
- Pettorelli, N., Vik, J.O., Mysterud, A., Gaillard, J.-M., Tucker, C.J., Stenseth, N.C., 2005. Using the satellite-derived NDVI to assess ecological responses to environmental change. *Trends Ecol. Evol. (Amst.)* 20, 503–510. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.05.011>
- Piechotowski, I., Brockmann, S.O., Schwarz, C., Winter, C.H., Ranft, U., Pfaff, G., 2008. Emergence of hantavirus in South Germany: rodents, climate and human infections. *Parasitol. Res.* 103 Suppl 1, S131-137. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1055-8>
- Pucek, Z., Jędrzejewski, W., Jędrzejewska, B., Pucek, M., 1993. Rodent population dynamics in a primeval deciduous forest (Białowieża National Park) in relation to weather, seed crop, and predation. *Acta Theriologica* 38, 199–232. <https://doi.org/10.4098/AT.arch.93-18>
- Reil, D., Imholt, C., Eccard, J.A., Jacob, J., 2015. Beech Fructification and Bank Vole Population Dynamics - Combined Analyses of Promoters of Human Puumala Virus Infections in Germany. *PLOS ONE* 10, e0134124. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134124>
- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- Ristl, R., Hothorn, L., Ritz, C., Posch, M., 2019. Simultaneous inference for multiple marginal generalized estimating equation models. *Statistical Methods in Medical Research* 096228021987300. <https://doi.org/10.1177/0962280219873005>
- SAS Institute Inc. 2012. SAS/STAT Software, Version 9.4. Cary, NC.
- Sauvage, F., Langlais, M., Pontier, D., 2007. Predicting the emergence of human hantavirus disease using a combination of viral dynamics and rodent demographic patterns. *Epidemiol. Infect.* 135, 46–56. <https://doi.org/10.1017/S0950268806006595>
- Schwarz, A.C., Ranft, U., Piechotowski, I., Childs, J.E., Brockmann, S.O., 2009. Risk factors for human infection with Puumala virus, southwestern Germany. *Emerging Infect. Dis.* 15, 1032–1039. <https://doi.org/10.3201/eid1507.081413>
- Selås, V., Sonerud, G.A., Framstad, E., Kålås, J.A., Kobro, S., Pedersen, H.B., Spidsø, T.K., Wiig, Ø., 2011. Climate change in Norway: warm summers limit grouse reproduction. *Population Ecology* 53, 361–371. <https://doi.org/10.1007/s10144-010-0255-0>
- Stenseth, N.C., Vlljugrein, H., Jędrzejewski, W., Mysterud, A., Pucek, Z., 2002. Population dynamics of *Clethrionomys glareolus* and *Apodemus flavicollis*: seasonal components of density dependence and density independence. *Acta Theriologica* 47, 39–67. <https://doi.org/10.1007/BF03192479>
- Swart, A., Bekker, D.L., Maas, M., de Vries, A., Pijnacker, R., Reusken, C.B.E.M., van der Giessen, J.W.B.,

2017. Modelling human Puumala hantavirus infection in relation to bank vole abundance and masting intensity in the Netherlands. *Infection Ecology & Epidemiology* 7, 1287986. <https://doi.org/10.1080/20008686.2017.1287986>
- Teerenstra, S., Lu, B., Preisser, J.S., van Achterberg, T., Borm, G.F., 2010. Sample size considerations for GEE analyses of three-level cluster randomized trials. *Biometrics* 66, 1230–1237. <https://doi.org/10.1111/j.1541-0420.2009.01374.x>
- Terraube, J., Villers, A., Poudré, L., Varjonen, R., Korpimäki, E., 2017. Increased autumn rainfall disrupts predator-prey interactions in fragmented boreal forests. *Global Change Biology* 23, 1361–1373. <https://doi.org/10.1111/gcb.13408>
- Tersago, K., Crespin, L., Verhagen, R., Leirs, H., 2012. Impact of Puumala virus infection on maturation and survival in bank voles: a capture-mark-recapture analysis. *J. Wildl. Dis.* 48, 148–156. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-48.1.148>
- Tersago, K., Schreurs, A., Linard, C., Verhagen, R., Van Dongen, S., Leirs, H., 2008. Population, environmental, and community effects on local bank vole (*Myodes glareolus*) Puumala virus infection in an area with low human incidence. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8, 235–244. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0160>
- Tersago, K., Verhagen, R., Servais, A., Heyman, P., Ducoffre, G., Leirs, H., 2009. Hantavirus disease (nephropathia epidemica) in Belgium: effects of tree seed production and climate. *Epidemiol. Infect.* 137, 250–256. <https://doi.org/10.1017/S0950268808000940>
- Tersago, K., Verhagen, R., Vapalahti, O., Heyman, P., Ducoffre, G., Leirs, H., 2011. Hantavirus outbreak in Western Europe: reservoir host infection dynamics related to human disease patterns. *Epidemiol. Infect.* 139, 381–390. <https://doi.org/10.1017/S0950268810000956>
- Thoma, B.R., Müller, J., Bässler, C., Georgi, E., Osterberg, A., Schex, S., Bottomley, C., Essbauer, S.S., 2014. Identification of factors influencing the Puumala virus seroprevalence within its reservoir in a Montane Forest Environment. *Viruses* 6, 3944–3967. <https://doi.org/10.3390/v6103944>
- Vergne, T., Paul, M.C., Chaengprachak, W., Durand, B., Gilbert, M., Dufour, B., Roger, F., Kasemsuwan, S., Grosbois, V., 2014. Zero-inflated models for identifying disease risk factors when case detection is imperfect: application to highly pathogenic avian influenza H5N1 in Thailand. *Prev. Vet. Med.* 114, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.01.011>
- Viel, J.-F., Lefebvre, A., Marianneau, P., Joly, D., Giraudoux, P., Upegui, E., Tordo, N., Hoen, B., 2011. Environmental risk factors for haemorrhagic fever with renal syndrome in a French new epidemic area. *Epidemiol. Infect.* 139, 867–874. <https://doi.org/10.1017/S0950268810002062>
- Voutilainen, L., Kallio, E.R., Niemimaa, J., Vapalahti, O., Henttonen, H., 2016. Temporal dynamics of Puumala hantavirus infection in cyclic populations of bank voles. *Sci Rep* 6, 21323. <https://doi.org/10.1038/srep21323>

- Voutilainen, L., Sironen, T., Tonteri, E., Bäck, A.T., Razzauti, M., Karlsson, M., Wahlström, M., Niemimaa, J., Henttonen, H., Lundkvist, Å., 2015. Life-long shedding of Puumala hantavirus in wild bank voles (*Myodes glareolus*). *J. Gen. Virol.* 96, 1238–1247. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000076>
- Wang, M., Kong, L., Li, Z., Zhang, L., 2016. Covariance estimators for generalized estimating equations (GEE) in longitudinal analysis with small samples: Covariance estimators for generalized estimating equations (GEE) in longitudinal analysis with small samples. *Statistics in Medicine* 35, 1706–1721. <https://doi.org/10.1002/sim.6817>
- Wang, M., Long, Q., 2011. Modified robust variance estimator for generalized estimating equations with improved small-sample performance. *Stat Med* 30, 1278–1291. <https://doi.org/10.1002/sim.4150>
- Wróbel, A., Bogdziewicz, M., 2015. It is raining mice and voles: which weather conditions influence the activity of *Apodemus flavicollis* and *Myodes glareolus*? *European Journal of Wildlife Research* 61, 475–478. <https://doi.org/10.1007/s10344-014-0892-2>
- Zeger, S.L., Liang, K.Y., Albert, P.S., 1988. Models for longitudinal data: a generalized estimating equation approach. *Biometrics* 44, 1049–1060.
- Zeimes, C.B., Olsson, G.E., Ahlm, C., Vanwambeke, S.O., 2012. Modelling zoonotic diseases in humans: comparison of methods for hantavirus in Sweden. *Int J Health Geogr* 11, 39. <https://doi.org/10.1186/1476-072X-11-39>
- Zeimes, C.B., Quoilin, S., Henttonen, H., Lyytikäinen, O., Vapalahti, O., Reynes, J.-M., Reusken, C., Swart, A.N., Vainio, K., Hjertqvist, M., Vanwambeke, S.O., 2015. Landscape and regional environmental analysis of the spatial distribution of hantavirus human cases in europe. *Front Public Health* 3, 54. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2015.00054>

Discussion

Les facteurs impactant l'épidémiologie des orthohantavirus chez les rongeurs sauvages sont nombreux et présentent des effets variables dans le temps et l'espace. Cette complexité rend difficile l'évaluation des risques de transmission à l'Homme. Ainsi, en France, les cas humains de NE se situent dans le quart Nord-Est mais leur nombre en fonction des lieux reflète des situations très différentes au sein de cette zone. Outre cette hétérogénéité spatiale, le nombre de NE est évolutif au cours du temps.

1) Evolution spatiale de l'épidémiologie

La grande majorité des études cible les zones de fortes endémies des cas de NE. La comparaison des caractéristiques de l'infection du réservoir hôte (séroprévalence, excrétion virale et caractéristiques du virus) des zones de fortes endémies avec celles où les cas de NE sont moins nombreux voire absents peut apporter un éclairage permettant une compréhension plus fine des mécanismes en jeu. C'était l'objectif de l'étude portant sur l'épidémiologie descriptive et la phylogénétique des orthohantavirus réalisée en Alsace qui permettait de décrire pour la première fois la situation en zone de faible endémie en France. La séroprévalence était faible et constante sur le site d'étude avec une répartition très hétérogène des rongeurs positifs, ce qui pouvait conduire à une estimation biaisée si le site d'étude était vraiment restreint. Le plus faible nombre de rongeurs infectés (et donc excréteur du virus) entraînerait une moindre contamination environnementale et donc une plus faible exposition humaine.

Peu d'études en zone de faible endémie permettent de comparer ces résultats. D'une manière générale, le lien entre la séroprévalence des rongeurs et le nombre de cas humains a été peu étudié et irrégulièrement mis en évidence dans la littérature (Kallio et al., 2009). Une étude (Drewes et al., 2017a) a été menée en 2012 et 2013 juste de l'autre côté du Rhin sur deux sites (Freiburg et Emmendingen). Le nombre des cas humains de NE était faible avec 1 cas par site en Allemagne et 1 dans le département du Haut-Rhin où se situait notre site de capture en 2012 et pas de cas en 2013 sur ces mêmes zones. De même, nos deux sites d'études de la forêt d'Elan dans les Ardennes étaient associés à une faible incidence de cas humains (Augot et al., 2008). La situation au niveau des campagnols roussâtres s'est révélée cependant différente dans les trois zones. Le site de Freiburg ne montrait pas de rongeurs séropositifs avec un intervalle de confiance calculé sur les données de l'étude de Drewes et al., 2017a de [0 ; 8,8] alors que pour celui d'Emmendingen, la séroprévalence atteint 50% ([33,6 ; 66,4]). La séroprévalence chez les rongeurs des sites de la forêt d'Elan dans les Ardennes était de 23,1% [20,8 ; 25,4] de 2000 à 2009. Ces résultats ne sont pas directement comparables à ceux retrouvés en Alsace puisque le nombre de pièges et la surface des terrains d'étude sont quatre fois moins importants en Allemagne et dans les Ardennes. Pour comparaison, il faudrait diviser notre site d'étude alsacien en quatre quadrants, ce qui ramènerait la séroprévalence de 0,0 % [0,0 ; 6,8] à 8,5 % [3,4 ; 19,9] pour l'année 2012 où les séropositifs n'étaient pas statistiquement groupés dans l'espace. Une séroprévalence faible est donc associée à un faible nombre cas de NE comme en Alsace et sur le site de Freiburg. A l'inverse, une forte séroprévalence n'est pas toujours associée à un nombre important de cas de NE comme le montre les sites d'Emmendingen et de la forêt d'Elan dans les Ardennes. Une séroprévalence importante a même pu être mise en évidence sur des zones sans cas de NE en dehors de la zone d'endémie (Castel et al., 2015).

La faible séroprévalence des rongeurs entraînant une moindre contamination environnementale constitue donc une explication pour certains sites de faible endémie mais n'explique pas la situation

d'un faible nombre de cas de NE d'autres sites à séroprévalence élevée. De nombreuses étapes vont en effet survenir entre la présence d'un rongeur infecté et la survenue d'un cas humain. En premier lieu, le rongeur infecté va excréter du virus dans l'environnement. Le niveau d'excrétion ainsi que sa durée sont variables (Dubois et al. 2017 ; Kallio et al., 2006a). Plusieurs paramètres peuvent influencer cette excrétion de virus infectieux dont l'interaction rongeur / virus qui dépend des caractéristiques du rongeur et du virus.

Toutes les séquences de PUUV mises en évidence en France appartiennent à la lignée CE. Les séquences virales alsaciennes étaient assez proches de celles mises en évidence dans le Jura (Monchatre-Leroy et al., 2018). L'arbre phylogénétique des séquences du segment S du virus mettait en évidence des groupes au sein de la lignée CE qui traduisait la provenance régionale et non une distinction zones de forte endémie / zones de faible endémie ou indemne. Une analyse comparée des séquences françaises (Castel et al., 2015) sur les trois segments du virus a conduit aussi à une distinction géographique et suggère une introduction de PUUV par deux voies, une belge et une en provenance d'Europe Centrale. Cependant, pour avoir une vision d'ensemble et plus précise des séquences virales circulant en France, des études complémentaires sont nécessaires et particulièrement dans les zones de faible endémie ou en zone indemne.

Indépendamment de la connaissance de la séquence nucléotidique des virus à un moment donné, l'analyse temporelle de la microdiversité génétique virale révèle une grande différence entre les sites explorés. Certains comme en Alsace mettaient en évidence une grande stabilité au cours du temps d'une séquence qui était majoritaire parmi les rongeurs infectés. Pour comparaison, l'évaluation de cette microdiversité dans un site de forte endémie, comme les Ardennes, a été l'objet de la deuxième étude présentée dans cette thèse. Elle a été étudiée en lien avec les caractéristiques de la population de rongeurs pour vérifier les interactions éventuelles entre l'évolution virale et celle des rongeurs.

La microdiversité des séquences de PUUV mises en évidence sur les quatre sites évoluait très différemment dans le temps en fonction des sites. Les deux sites de la forêt d'Elan au-dessous de Charleville-Mézières présentaient un virus très proche et d'une stabilité importante qui n'évoluait que très peu au cours du temps. Les deux autres sites de la forêt de Croix-Scaille montraient des variants viraux multiples qui s'éteignaient au fil du temps. Parallèlement, la dynamique de population des rongeurs présentait un profil différent en fonction des sites laissant supposer une population beaucoup plus stable dans la forêt d'Elan par rapport à la forêt de Croix-Scaille. L'un des sites particulièrement connaissait des phases d'extinction importante de la population avec des années consécutives sans rongeurs capturés. Les sites de Croix-Scaille présentaient une séniorité plus faible et un taux de recrutement bien plus élevé que les sites de la forêt d'Elan. Ce constat était cohérent avec celui d'une étude de 2011 réalisée en partie sur les mêmes sites (Guivier et al., 2011) qui étudiait la diversité génétique des rongeurs dans les forêts favorables aux campagnols comparativement aux parcelles de bois très fragmentés comme des réseaux de bosquets d'arbres. Pour les larges forêts, le pourcentage d'immigrants était moindre que dans les réseaux de bosquets d'arbres. Les sites de Croix-Scaille seraient comparables à des bosquets d'arbres car composés de forêts d'épineux qui sont des milieux bien moins favorables à la persistance de populations de campagnols. Les rongeurs s'y établissent surtout suite à des migrations d'autres sites plus adaptés que sont les forêts de feuillus qui produisent les glands et autres fruits secs indispensables à la survie hivernale. Le site de Croix-Scaille qui présentait des extinctions majeures de population de rongeurs était situé au sein d'une très large parcelle de résineux rendant moins facile la colonisation du site à partir des zones de feuillus lointaines

contrairement à l'autre site de Croix-Scaille qui était constitué d'une petite zone de résineux entourée de feuillus.

L'analyse de ces caractéristiques de population et de la microévolution du virus permet de considérer deux scénarii d'interaction hôte / virus. Dans la forêt d'Elan, milieu de feuillus favorable aux rongeurs, la population est stable, l'immigration faible, les campagnols se déplaçant sur de courtes distances. Cette stabilité de la population fait que la microdiversité virale est assez faible avec une micro évolution du PUUV qui préserve un faible nombre de variants génétiques au cours des saisons et des années (Monchatre-Leroy, à publier), ce qui a déjà été décrit (Razzauti et al., 2013). Ce scénario est aussi celui qui serait valable pour le site d'étude alsacien comme le suggère la faible variabilité des séquences virales retrouvées entre 2012 et 2017 (Monchatre-Leroy et al., 2018). Dans les sites de la forêt de Croix-Scaille, milieu de résineux moins favorable au maintien des populations de rongeurs, l'immigration de rongeurs est un phénomène plus important. Les rongeurs immigrants sont potentiellement porteurs de virus différents en fonction de leur provenance, ce qui conduit à des variants viraux transitoires (figure 15).

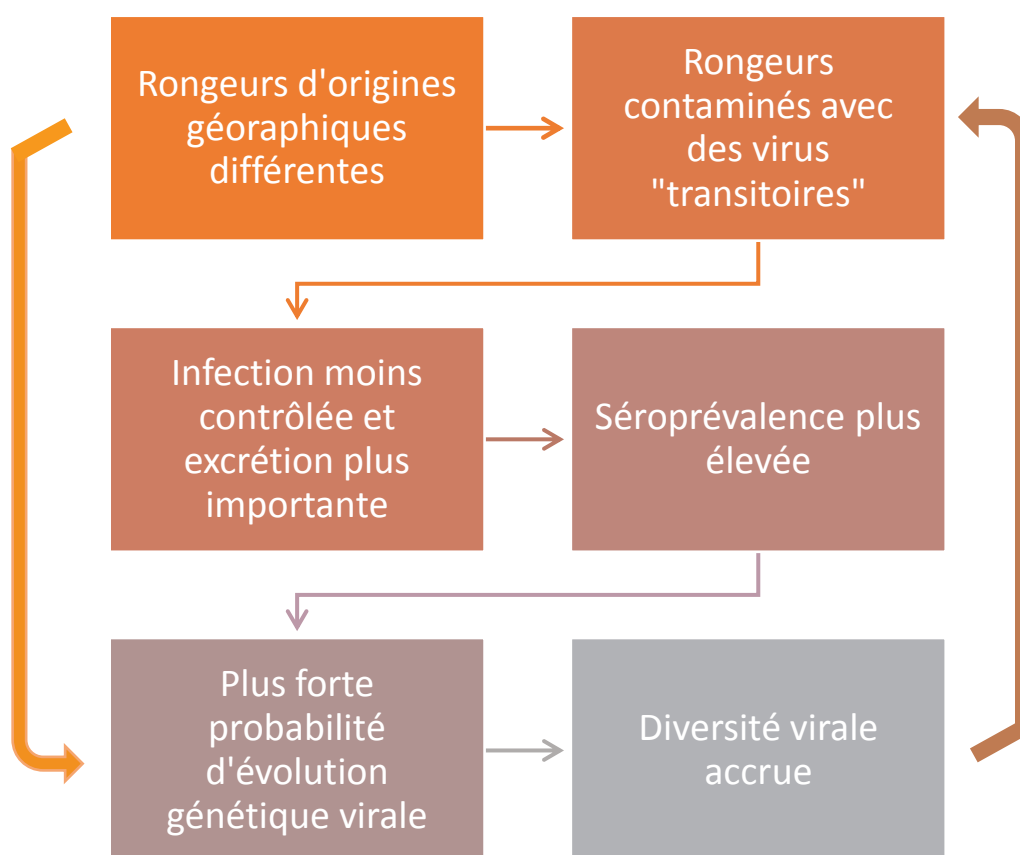


Figure 15 : Hypothèse concernant l'interaction hôte / rongeurs

La contamination des rongeurs par ces virus transitoires différents des PUUV circulant dans leur population d'origine conduirait à une infection moins contrôlée par l'organisme des rongeurs. Le nombre d'organes infectés et leur durée d'infection ainsi que l'excrétion virale seraient plus importantes. Un constat assez similaire a été mis en évidence entre les rongeurs de zones endémiques et les rongeurs de zones sans cas humains en France infectés expérimentalement par PUUV (Dubois et

al. 2017). Le taux d'ARN viral retrouvé dans les organes était plus important chez les rongeurs en provenance d'une zone sans cas humain suggérant une multiplication plus importante du virus dans les organes des rongeurs issus de zones où le virus ne circule pas. L'hypothèse de caractéristiques différentes de l'infection à PUUV en fonction de la durée de coévolution entre le virus et le rongeur est la base de l'étude de Guivier (Guivier et al., 2010a). Les auteurs ont comparé un des composants du système immunitaire impliqué dans la balance tolérance / résistance aux infections, entre des campagnols d'une zone sans cas en République Tchèque et des campagnols de zones d'endémie fortes de Finlande et des Ardennes françaises. Le taux de ce composant, le TNF α , discriminait les rongeurs des deux zones. L'augmentation du taux de TNF α basal des rongeurs des Ardennes et de Finlande suggérait une plus faible résistance à l'infection, c'est-à-dire une plus faible capacité à résister à l'infection, en lien avec une plus grande tolérance vis-à-vis de PUUV, c'est-à-dire la capacité à limiter les dommages causés par l'infection, des rongeurs finlandais et ardennais. Une autre étude (Guivier et al., 2010b) sur d'autres composants du système immunitaire, montrait que les rongeurs séropositifs étaient plus porteurs de certains allèles du CMH II que les rongeurs séronégatifs. Ces allèles du gène Mygl Drb impliqué dans la réponse immunitaire qui discriminaient les positifs des négatifs étaient différents en fonction des zones d'étude, Mygl Drb*10 en Finlande et Mygl Drb*03 dans la forêt d'Elan des Ardennes. En dehors de ces variations individuelles, la lignée d'appartenance des campagnols roussâtres semble influencer la sensibilité au PUUV comme le met en évidence une étude récente (Drewes et al., 2017b) en Allemagne où la répartition des différentes lignées de campagnols concordait avec les régions d'endémie de NE. En France, la lignée majeure est celle de l'Ouest qui recouvre une grande partie du territoire sauf le pourtour méditerranéen occupé par la lignée méditerranéenne (Ledevin et al. 2018).

Ainsi, dans nos études, les sites associés à un nombre important de cas de NE étaient caractérisés par une séroprévalence des rongeurs plutôt élevée, à une diversité virale assez importante du fait d'une population présentant des effondrements marqués et de longue durée et se renouvelant en partie importante par une migration de rongeurs d'autres zones. Ces sites présentaient un environnement non optimal aux rongeurs. A l'inverse, les sites non associés à un nombre élevé de cas de NE étaient caractérisés par une diversité virale très faible, une population beaucoup plus stable dans le temps et dont le renouvellement est moins lié à la migration de rongeurs. Ces sites constituaient un environnement favorable aux rongeurs. La séroprévalence des rongeurs sur ces sites non associés à un nombre de cas important de NE peut être faible ou élevée. Ces résultats suggèrent que le nombre de cas de NE est lié à la séroprévalence mais qu'il est aussi fonction des caractéristiques de l'infection des campagnols qui diffèrent en fonction des sites.

2) Evolution temporelle de l'épidémiologie

En plus de l'hétérogénéité spatiale des cas de NE, d'autres facteurs induisent des variations au cours du temps au sein de chaque site. Les cas de NE sont en effet plutôt détectés à partir du printemps avec un pic au cours de l'été en France (rapports annuels du CNR Hantavirus) et leur nombre varie aussi d'une année sur l'autre. De même, la séroprévalence des rongeurs évolue selon un cycle saisonnier mais diffère aussi en fonction des années.

Ces variations inter et intra annuelle sont fortement influencées par la dynamique de population des rongeurs qui est elle-même liée aux fluctuations environnementales (Khalil et al., 2014). Les

fluctuations de l'environnement vont aussi intervenir dans la survie du virus en milieu extérieur qui est essentielle pour la contamination de l'Homme et qui joue aussi un rôle dans la contamination des rongeurs (Sauvage et al., 2003). L'environnement joue donc un rôle prépondérant dans l'épidémiologie des infections à PUUV des rongeurs et des Hommes. L'environnement est l'ensemble des facteurs biotiques et abiotiques qui entourent un organisme ou une population. Ils sont résumés dans le contexte de l'épidémiologie des infections à PUUV par le climat, la disponibilité alimentaire et la configuration du paysage. La revue réalisée (Monchatre-Leroy et al., 2017) confirme l'influence des variations de l'environnement sur l'infection à PUUV des rongeurs et des Hommes.

D'autre part, cette revue montre la diversité des associations entre l'environnement et les variables représentant l'infection à PUUV chez l'Homme et le rongeur. Cette variabilité des résultats peut s'expliquer par la diversité des méthodologies et des variables explicatives employées dans les différentes études. L'ensemble des études au sein des rongeurs se basent sur la séroprévalence calculée sur des périodes différentes en fonction des protocoles mais qui reste l'estimation de l'accumulation de rongeurs séropositifs au cours du temps et non pas l'estimation du nombre de rongeurs infectés à un moment donné. Cette imprécision sur le moment de la contamination pour la séroprévalence est due au fait que la persistance des anticorps chez un individu infecté est très longue pouvant égaler la durée de vie du campagnol (Voutilainen et al., 2015). Comme d'autre part, l'impact de l'infection sur le campagnol est supposé faible à nul (Reil et al., 2017 ; Kallio et al., 2015), il pourrait y avoir confusion entre un facteur influençant le suivi temporel de la contamination des rongeurs et un facteur influençant le suivi de l'accumulation de rongeurs, c'est-à-dire l'abondance de rongeurs indépendamment de leur statut vis-à-vis de l'infection par PUUV. Aussi, afin d'étudier les facteurs de risque de la contamination, il est préférable d'utiliser l'incidence qui tient compte du moment de la contamination. Son utilisation si elle est plus difficile d'un point de vue logistique peut entraîner une sous-estimation du nombre d'individus incidents qui n'auront pas été capturés au moins deux fois, une fois avant infection et une autre après infection. Le biais qui en découlera sera un manque de puissance qui pourra ne pas mettre en évidence certaines associations. Les associations mises en évidence malgré ce biais seront bien plus spécifiques de l'infection de l'hôte à un moment donné que les associations mises en évidence avec la séroprévalence.

C'est cette approche via l'incidence qui a été utilisée pour le modèle de notre étude (chapitre 4). Il met en évidence une association de l'augmentation de l'incidence du printemps à l'augmentation de la disponibilité alimentaire de la même période, de la température et de la pluie de l'hiver précédent. L'interprétation biologique de ces résultats suggère un effet de l'environnement sur l'infection via la dynamique de population qui est favorisée par une température de l'hiver plus douce permettant une meilleure survie hivernale des rongeurs et par la disponibilité alimentaire au printemps autorisant une reproduction printanière plus efficace. L'impact positif de la pluie à l'hiver précédent peut suggérer une influence de l'environnement sur l'infection via la survie du virus en milieu extérieur plus longue en milieu humide. Cependant, ces influences peuvent aussi s'expliquer par l'intermédiaire des modifications sociales ou des comportements des rongeurs favorisant la contamination. Ainsi, la pluie qui est un élément inconstamment mis en évidence en fonction des études (Monchatre-Leroy et al., 2017) peut aussi s'interpréter du fait de son influence sur le comportement des rongeurs qui diminuent leurs activités lors d'épisode de pluie (Wrobel et al., 2015) du fait de la déperdition d'énergie importante lorsque la fourrure des animaux est mouillée. Le regroupement des rongeurs pendant l'hiver pour assurer leur thermorégulation (Ylönen et al., 1985) associé à un temps pluvieux rendrait donc plus probable la contamination entre individus. La pluie pourrait donc influencer la

contamination des rongeurs par l'une des deux voies possibles ou les deux : le comportement des rongeurs et/ou la survie du virus en milieu extérieur. Cela soulève la question de l'importance de la survie accrue du virus dans le phénomène de contamination indirecte des rongeurs. La transmission indirecte ne serait pas modulée par le milieu extérieur car dans la zone considérée d'endémie, la survie virale moyenne serait suffisante pour la contamination des rongeurs et ne serait pas le facteur limitant de l'importance de la contamination. Les résultats de notre étude alsacienne sont compatibles avec cette hypothèse car elle montre des rongeurs inféodés à leur territoire et une contamination progressive de proche en proche entre deux sessions de capture, c'est-à-dire un mois. Cependant, ce suivi de rongeurs ne s'est pas effectué en hiver et il manque un certain nombre d'études pour connaître le comportement hivernal des campagnols en Europe de l'Ouest. En effet, les études sur le devenir des rongeurs pendant l'hiver sont surtout réalisées en Europe du Nord présentant deux visions opposées : un regroupement hivernal pour la thermorégulation (Ylönen et al., 1985 en Finlande) ou un élargissement de la zone de prospection alimentaire et un renfort de la territorialité en lien avec la diminution des ressources alimentaires (Johnsen et al., 2018 en Norvège). Ces deux possibilités de comportement hivernal pourraient avoir des conséquences différentes sur la probabilité de contamination des campagnols.

Notre étude à partir de l'utilisation de l'incidence a montré que si l'utilisation de l'incidence pouvait permettre d'améliorer la précision, elle ne résolvait donc pas toutes les difficultés liées aux modélisations de l'infection des rongeurs par des facteurs environnementaux. Les difficultés des modèles environnementaux comme le souligne notre étude de modélisation proviennent de la difficultés d'interprétation biologique des résultats. En effet, les facteurs environnementaux mis en évidence peuvent agir sur l'infection des rongeurs via différentes voies (dynamique de population, survie virale, comportement des rongeurs). De plus, comme le souligne la revue réalisée sur les liens entre facteurs environnementaux et infection des rongeurs et des Hommes, les variables utilisées reflètent diverses réalités biologiques complexifiant encore l'interprétation des résultats. Ainsi, par exemple, l'inventaire des plantes autour des lieux de captures utilisé comme estimation de la disponibilité alimentaire traduit aussi la présence de refuges pour les rongeurs (Heyman et al., 2009b ; Olsson et al., 2005). La présence de neige traduit un climat rude mais aussi la présence d'une couverture protectrice pendant une saison où la végétation a disparu (Pettersson et al., 2008 ; Zeimes et al., 2015). D'autre part, des différences d'influence de facteurs environnementaux sont attendues en fonction du site, du moment des études et des échelles spatio-temporelles considérées.

A ces sources de complexification se rajoutent des facteurs de confusion peu pris en compte dans les études sur la séroprévalence des rongeurs que sont la sociabilité et le comportement des rongeurs. En effet, la sociabilité des rongeurs varie en fonction de la phase du cycle de population. Pendant les phases de haute densité de rongeurs, la surface de superposition des territoires des femelles augmente (Johnsen et al., 2019) avec une plus faible mobilité et une territorialité plus importante des individus (Mazurkiewicz et al., 1998). Cette diminution des territoires et la plus forte territorialité des femelles augmentent la probabilité de contamination. La dispersion des jeunes se produit lors de la pleine phase de reproduction de la fin du printemps au début de l'été et peut être associée à une plus forte probabilité d'infection (Crespin et al., 2002). Or, les phases de cycles intra-annuels sont associées aux saisons, elles-mêmes associées au climat pouvant créer une association statistique sans forcément révéler une influence du climat sur la séroprévalence (figure 16).

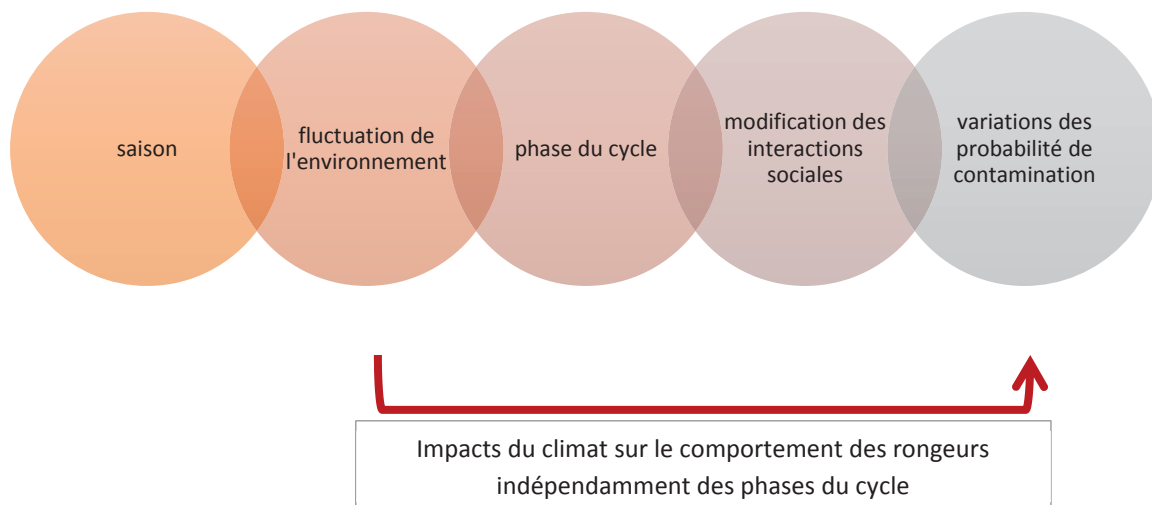


Figure 16 : Facteurs de confusion liés aux phases du cycle de population des rongeurs

En dehors de ce facteur possible de confusion, certains facteurs environnementaux influent directement sur le comportement des rongeurs qui peut avoir des conséquences sur leur probabilité de contamination. Les activités des rongeurs sont influencées par la température. Une température qui augmente fait diminuer l'activité de recherche alimentaire alors que la baisse de température augmente l'activité pour compenser la perte calorique (Wrobel et al., 2015). Cette activité de recherche va donc faire varier la probabilité de rencontre avec un rongeur infecté ou de passage dans un environnement contaminé. De même, les femelles adaptent leur zone de recherche alimentaire en fonction de la disponibilité, augmentant cette zone si la ressource alimentaire se fait plus rare (Jonsson et al., 2002).

Lorsque le modèle concerne l'incidence des cas de NE, la complexité s'accroît encore car il faut ajouter les facteurs d'influence propres à l'Homme. Il y a cependant beaucoup plus d'études qui mettent en lien l'infection humaine et les variables environnementales. L'infection des rongeurs étant centrale dans la contamination de l'environnement et donc de l'Homme, il paraît plus réalisable de comprendre dans un premier temps cet aspect en utilisant les facteurs environnementaux, la compréhension des interactions sociales des campagnols en lien avec la saison et le site, l'interaction rongeurs / virus circulant et la survie du virus dans le milieu extérieur. A partir de cette première étape, la contamination de l'environnement pourrait être estimée en tenant compte de l'excrétion virale par le rongeur en fonction des souches virales, ce qui nécessitera des études supplémentaires. La compréhension des mécanismes de persistance du virus dans l'environnement nécessitera le développement des outils de détection et de quantification du virus dans le sol, sa persistance en fonction des conditions environnementales dont les caractéristiques du sol, le climat et les différentes matrices susceptibles de protéger le virus. A partir de la contamination de l'environnement, l'exposition de l'Homme sera alors quantifiable en tenant compte de facteurs de risque qui lui sont propres : activités, climat et saison. Enfin, l'exposition humaine pourrait être équivalente mais la souche virale moins pathogène, ce qui rendrait la contamination inapparente. La compréhension de l'interaction du virus avec l'Homme qui est un hôte accidentel, est donc aussi un axe de recherche important à développer.

3) Conclusions et perspectives

L'épidémiologie des infections à PUUV chez le campagnol et l'Homme est multi-factorielle, les facteurs de risque évoluant dans l'espace et dans le temps. De nombreux auteurs y ont consacré leurs travaux et cette thèse apporte aussi sa contribution à une vision plus précise de l'ensemble. Les travaux ont été construits autour de la problématique de l'infection des rongeurs avec des hypothèses permettant d'estimer ou de comprendre le risque humain. Les résultats seront à affiner en fonction des lieux et des périodes d'études. Pour résumer globalement ces résultats, nos études montrent que l'occurrence d'un faible nombre de cas humains dans une région est associée à une population de rongeurs stable démographiquement du fait d'un environnement optimal, avec une prévalence au PUUV qui peut être très variable mais due à un variant viral peu évolutif. Au contraire, un nombre important de cas humains est généralement associé à une séroprévalence élevée avec des variants viraux multiples et évolutifs dans le temps au sein d'une population de rongeurs présentant des effondrements marqués, du fait d'un environnement plus défavorable et d'un apport important de rongeurs migrants. D'autres études seraient à mener pour voir si le même schéma est retrouvé dans d'autres zones d'endémie comme celle du Jura, voire même en zone indemne comme le Loiret où des rongeurs ont été trouvés séropositifs (Castel et al., 2015).

Ces travaux suggèrent l'importance de bien décrire l'infection des rongeurs en fonction de l'origine géographique du virus et de son hôte. Si certaines études se sont focalisées sur l'influence du système immunitaire sur la sensibilité du rongeur (Guivier et al., 2010a ; Guivier et al., 2010b ; Deter et al., 2008), peu à ma connaissance ont évalué le rôle de la variabilité génétique des PUUV sur les caractéristiques de l'infection comme les voies, la durée et l'importance de l'excrétion qui sont des éléments clef dans l'épidémiologie de l'infection à PUUV chez le campagnol et l'Homme puisqu'ils vont déterminer le niveau de contamination environnementale. Des études expérimentales complémentaires sur le niveau d'excrétion virale permettraient d'investiguer l'influence de l'origine géographique commune ou non des rongeurs et des virus. Le développement d'outils permettant la détection et donc l'estimation de la survie du virus excrété dans le milieu extérieur serait vraiment une voie prometteuse pour mieux évaluer le risque de contamination humaine et évaluer la part de la contamination indirecte dans l'épidémiologie des rongeurs.

L'importance de l'influence des facteurs environnementaux sur la démographie des campagnols est indéniable. Nos travaux suggèrent qu'un environnement défavorable à l'établissement pérenne d'une population de rongeurs a des conséquences démographiques qui peut influencer sur la diversité génétique virale. Nous avons considéré que l'environnement défavorable était la forêt d'épineux (Quere et le Louarn, 2011) mais d'autres caractéristiques seraient à considérer, comme la présence de certaines essences végétales, la fragmentation des paysages, le climat ou l'altitude. Des études plus pointues sur la dynamique de populations de campagnols roussâtres en France en fonction de l'habitat sont nécessaires pour investiguer l'influence de ces caractéristiques particulièrement en hiver. Pareillement, peu de publications existent sur l'influence de l'environnement comme le climat et la disponibilité alimentaire sur le comportement social des rongeurs qui peut être un facteur de risque de contamination. Cette connaissance plus développée des campagnols suppose des études sur le long terme comprenant au moins un cycle interannuel de densité et prenant en considération les variations saisonnières. Ces études représentent un investissement important en termes de temps et d'argent. Leur réalisation par des consortiums de recherche entre partenaires et pays pourraient permettre leur

mise en œuvre et d'associer dans une réflexion commune les pays touchés par les hantaviroses, qui sont de plus en plus considérées comme des émergences à l'échelle européenne.

Enfin, le développement d'outils permettant la détection et donc la survie du virus dans le milieu extérieur serait vraiment une voie prometteuse pour mieux évaluer le risque de contamination humaine et évaluer la part de la contamination indirecte dans l'épidémiologie des rongeurs.

Références bibliographiques

- Ahlm, C., Linderholm, M., Juto, P., Stegmayr, B., Settergren, B., 1994. Prevalence of serum IgG antibodies to Puumala virus (haemorrhagic fever with renal syndrome) in northern Sweden. *Epidemiol. Infect.* 113, 129–136. <https://doi.org/10.1017/s0950268800051542>
- Andreassen, H.P., Glorvigen, P., Rémy, A., Ims, R.A., 2013. New views on how population-intrinsic and community-extrinsic processes interact during the vole population cycles. *Oikos* 122, 507–515. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2012.00238.x>
- Antoniadis, A., Le Duc, J.W., Daniel-Alexiou, S., 1987. Clinical and epidemiological aspects of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Greece. *Eur. J. Epidemiol.* 3, 295–301.
- Augot, D., Muller, D., Demerson, J.M., Boué, F., Caillot, C., Cliquet, F., 2006. Dynamics of Puumala virus infection in bank voles in Ardennes department (France). *Pathol. Biol.* 54, 572–577. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2006.07.039>
- Augot, D., Sauvage, F., Boue, F., Bouloy, M., Artois, M., Demerson, J.M., Combes, B., Coudrier, D., Zeller, H., Cliquet, F., Pontier, D., 2008. Spatial and temporal patterning of bank vole demography and the epidemiology of the Puumala hantavirus in northeastern France. *Epidemiol. Infect.* 136, 1638–1643. <https://doi.org/10.1017/S0950268808000423>
- Bernshtein, A.D., Apekina, N.S., Mikhailova, T.V., Myasnikov, Y.A., Khlyap, L.A., Korotkov, Y.S., Gavrilovskaya, I.N., 1999. Dynamics of Puumala hantavirus infection in naturally infected bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Arch. Virol.* 144, 2415–2428.
- Brummer-Korvenkontio, M., Vapalahti, O., Henttonen, H., Koskela, P., Kuusisto, P., Vaheri, A., 1999. Epidemiological study of nephropathia epidemica in Finland 1989–96. *Scand. J. Infect. Dis.* 31, 427–435.
- Butet, A., Spitz, F., 2001. Campagnols cycliques : un demi-siècle de recherches. *rev. Ecol. (Terre Vie)* 56, 353–372.
- Calisher, C.H., Peters, C.J., Douglass, R.J., Kuenzi, A.J., 2009. Hantaviral infections of rodents: possible scenarios. *Arch. Virol.* 154, 1195–1197. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0434-5>
- Castel, G., Couteaudier, M., Sauvage, F., Pons, J.-B., Murri, S., Plyusnina, A., Pontier, D., Cosson, J.-F., Plyusnin, A., Marianneau, P., Tordo, N., 2015. Complete Genome and Phylogeny of Puumala Hantavirus Isolates Circulating in France. *Viruses* 7, 5476–5488. <https://doi.org/10.3390/v7102884>
- Childs, J.E., Krebs, J.W., Ksiazek, T.G., Maupin, G.O., Gage, K.L., Rollin, P.E., Zeitz, P.S., Sarisky, J., Ensore, R.E., Butler, J.C., 1995. A household-based, case-control study of environmental factors associated with hantavirus pulmonary syndrome in the southwestern United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52, 393–397. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1995.52.393>
- Cosgriff, T.M., 1991. Mechanisms of disease in Hantavirus infection: pathophysiology of hemorrhagic fever with renal syndrome. *Rev. Infect. Dis.* 13, 97–107.
- Crespin, L., Verhagen, R., Stenseth, N.Chr., Yoccoz, N.G., Prevot-Julliard, A.-C., Lebreton, J.-D., 2002. Survival in fluctuating bank vole populations: seasonal and yearly variations. *Oikos* 98, 467–479. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2002.980311.x>
- Crowcroft, N.S., Infuso, A., Illef, D., Le Guenno, B., Desenclos, J.-C., Van Loock, F., Clement, J., 1999. Risk factors for human hantavirus infection: Franco-Belgian collaborative case-control study during 1995–6 epidemic. *BMJ* 318, 1737–1738. <https://doi.org/10.1136/bmj.318.7200.1737>
- Dearing, M.D., Dizney, L., 2010. Ecology of hantavirus in a changing world. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1195, 99–112. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05452.x>
- Deter, J., Bryja, J., Chaval, Y., Galan, M., Henttonen, H., Laakkonen, J., Voutilainen, L., Vapalahti, O., Vaheri, A., Salvador, A.R., Morand, S., Cosson, J.-F., Charbonnel, N., 2008. Association between the DQA MHC class II gene and Puumala virus infection in *Myodes glareolus*, the bank vole. *Infect. Genet. Evol.* 8, 450–458. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2007.07.003>

- Drewes, Stephan, Ali, H.S., Saxenhofer, M., Rosenfeld, U.M., Binder, F., Cuypers, F., Schlegel, M., Röhrs, S., Heckel, G., Ulrich, R.G., 2017b. Host-Associated Absence of Human Puumala Virus Infections in Northern and Eastern Germany. *Emerging Infect. Dis.* 23, 83–86. <https://doi.org/10.3201/eid2301.160224>
- Drewes, S., Turni, H., Rosenfeld, U.M., Obiegala, A., Straková, P., Imholt, C., Glatthaar, E., Dressel, K., Pfeffer, M., Jacob, J., Wagner-Wiening, C., Ulrich, R.G., 2017b. Reservoir-Driven Heterogeneous Distribution of Recorded Human Puumala virus Cases in South-West Germany. *Zoonoses Public Health* 64, 381–390. <https://doi.org/10.1111/zph.12319>
- Dubois, A., Castel, G., Murri, S., Pulido, C., Pons, J.-B., Benoit, L., Loiseau, A., Lakhdar, L., Galan, M., Charbonnel, N., Marianneau, P., 2017. Experimental infections of wild bank voles (*Myodes glareolus*) from nephropatia epidemica endemic and non-endemic regions revealed slight differences in Puumala virological course and immunological responses. *Virus Res.* 235, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.04.004>
- Dubois, A., Castel, G., Murri, S., Pulido, C., Pons, J.-B., Benoit, L., Loiseau, A., Lakhdar, L., Galan, M., Marianneau, P., Charbonnel, N., 2018. Bank vole immunoheterogeneity may limit Nephropatia Epidemica emergence in a French non-endemic region. *Parasitology* 145, 393–407. <https://doi.org/10.1017/S0031182017001548>
- Escutenaire, S., Brochier, B., Pastoret, P.-P., 2001. Les hantavirus : évolution moléculaire et épidémiologie de l'infection. *virologie* 5, 419–429.
- Figueiredo, L.T.M., Souza, W.M. de, Ferrés, M., Enria, D.A., 2014. Hantaviruses and cardiopulmonary syndrome in South America. *Virus Res.* 187, 43–54. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.01.015>
- Groen, J., Gerding, M.N., Jordans, J.G., Clement, J.P., Nieuwenhuijs, J.H., Osterhaus, A.D., 1995. Hantavirus infections in The Netherlands: epidemiology and disease. *Epidemiol. Infect.* 114, 373–383. <https://doi.org/10.1017/s0950268800058003>
- Guivier, E., Galan, M., Chaval, Y., Xuéreb, A., Ribas Salvador, A., Poulle, M.-L., Voutilainen, L., Henttonen, H., Charbonnel, N., Cosson, J.F., 2011. Landscape genetics highlights the role of bank vole metapopulation dynamics in the epidemiology of Puumala hantavirus. *Mol. Ecol.* 20, 3569–3583. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05199.x>
- Guivier, E., Galan, M., Malé, P.-J.G., Kallio, E.R., Voutilainen, L., Henttonen, H., Olsson, G.E., Lundkvist, A., Tersago, K., Augot, D., Cosson, J.-F., Charbonnel, N., 2010b. Associations between MHC genes and Puumala virus infection in *Myodes glareolus* are detected in wild populations, but not from experimental infection data. *J. Gen. Virol.* 91, 2507–2512. <https://doi.org/10.1099/vir.0.021600-0>
- Guivier, E., Galan, M., Salvador, A.R., Xuéreb, A., Chaval, Y., Olsson, G.E., Essbauer, S., Henttonen, H., Voutilainen, L., Cosson, J.-F., Charbonnel, N., 2010a. Tnf- α expression and promoter sequences reflect the balance of tolerance/resistance to Puumala hantavirus infection in European bank vole populations. *Infect. Genet. Evol.* 10, 1208–1217. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.07.022>
- Guterres, A., de Lemos, E.R.S., 2018. Hantaviruses and a neglected environmental determinant. *One Health* 5, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2017.12.002>
- Hardestam, J., Karlsson, M., Falk, K.I., Olsson, G., Klingström, J., Lundkvist, A., 2008. Puumala hantavirus excretion kinetics in bank voles (*Myodes glareolus*). *Emerging Infect. Dis.* 14, 1209–1215. <https://doi.org/10.3201/eid1408.080221>
- Heyman, P., Ceianu, C.S., Christova, I., Tordo, N., Beersma, M., João Alves, M., Lundkvist, A., Hukic, M., Papa, A., Tenorio, A., Zelená, H., Essbauer, S., Visontai, I., Golovljova, I., Connell, J., Nicoletti, L., Van Esbroeck, M., Gjeruldsen Dudman, S., Aberle, S.W., Avšič-Županc, T., Korukluoglu, G., Nowakowska, A., Klempa, B., Ulrich, R.G., Bino, S., Engler, O., Opp, M., Vaheri, A., 2011. A five-year perspective on the situation of haemorrhagic fever with renal syndrome and status of the hantavirus reservoirs in Europe, 2005–2010. *Euro Surveill.* 16.
- Heyman, P., Cochez, C., Ducoffre, G., Mailles, A., Zeller, H., Abu Sin, M., Koch, J., van Doornum, G., Koopmans, M., Mossong, J., Schneider, F., 2007. Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome: an

- analysis of the outbreaks in Belgium, France, Germany, the Netherlands and Luxembourg in 2005. *Euro Surveill.* 12, E15-16.
- Heyman, P., Mele, R.V., Smajlovic, L., Dobby, A., Cochez, C., Vandenvelde, C., 2009b. Association between habitat and prevalence of hantavirus infections in bank voles (*Myodes glareolus*) and wood mice (*Apodemus sylvaticus*). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 9, 141–146. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0155>
- Heyman, P., Thoma, B.R., Marié, J.-L., Cochez, C., Essbauer, S.S., 2012. In Search for Factors that Drive Hantavirus Epidemics. *Front Physiol* 3, 237. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00237>
- Heyman, P., Vaheri, A., Lundkvist, A., Avsic-Zupanc, T., 2009a. Hantavirus infections in Europe: from virus carriers to a major public-health problem. *Expert Rev Anti Infect Ther* 7, 205–217. <https://doi.org/10.1586/14787210.7.2.205>
- Hughes, N.K., Helsen, S., Tersago, K., Leirs, H., 2014. Puumala hantavirus infection alters the odour attractiveness of its reservoir host. *Oecologia* 176, 955–963. <https://doi.org/10.1007/s00442-014-3072-x>
- Ilef, D., Paillat, G., Artois, M., Deubel, V., Zeller, H., Coudrier, D., Penalba, C., Pierre, V., Le Quellec-Nathan, M., Capek, I., 1999. La fièvre hémorragique avec syndrome rénal (FHSR) en France. *BEH - Bulletin épidémiologique hebdomadaire*.
- Inchausti, P., Ginzburg, L.R., 2009. Maternal effects mechanism of population cycling: a formidable competitor to the traditional predator–prey view. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364, 1117–1124. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0292>
- Johnsen, K., Devineau, O., Andreassen, H.P., 2019. Phase- and season-dependent changes in social behaviour in cyclic vole populations. *BMC Ecology* 19. <https://doi.org/10.1186/s12898-019-0222-3>
- Johnsen, K., Devineau, O., Andreassen, H.P., 2018. The Effects of Winter Climate and Intrinsic Factors on Survival of Cyclic Vole Populations in Southeastern Norway. *Annales Zoologici Fennici* 55, 173–185. <https://doi.org/10.5735/086.055.0604>
- Jonsson, C.B., Figueiredo, L.T.M., Vapalahti, O., 2010. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 412–441. <https://doi.org/10.1128/CMR.00062-09>
- Jonsson, C.B., Hooper, J., Mertz, G., 2008. Treatment of hantavirus pulmonary syndrome. *Antiviral Res.* 78, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.10.012>
- Jonsson, P., Hartikainen, T., Koskela, E., Mappes, T., 2002. Determinants of reproductive success in voles: space use in relation to food and litter size manipulation. *Evolutionary Ecology* 16, 455–467. <https://doi.org/10.1023/A:1020854525220>
- Jung, J., Ko, S.-J., Oh, H.S., Moon, S.M., Song, J.-W., Huh, K., 2018. Protective Effectiveness of Inactivated Hantavirus Vaccine Against Hemorrhagic Fever With Renal Syndrome. *J. Infect. Dis.* 217, 1417–1420. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy037>
- Kallio, E.R., Begon, M., Henttonen, H., Koskela, E., Mappes, T., Vaheri, A., Vapalahti, O., 2009. Cyclic hantavirus epidemics in humans—predicted by rodent host dynamics. *Epidemics* 1, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2009.03.002>
- Kallio, E.R., Helle, H., Koskela, E., Mappes, T., Vapalahti, O., 2015. Age-related effects of chronic hantavirus infection on female host fecundity. *J Anim Ecol* 84, 1264–1272. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12387>
- Kallio, E.R., Klingström, J., Gustafsson, E., Manni, T., Vaheri, A., Henttonen, H., Vapalahti, O., Lundkvist, A., 2006a. Prolonged survival of Puumala hantavirus outside the host: evidence for indirect transmission via the environment. *J. Gen. Virol.* 87, 2127–2134. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81643-0>
- Kallio, E.R., Poikonen, A., Vaheri, A., Vapalahti, O., Henttonen, H., Koskela, E., Mappes, T., 2006b. Maternal antibodies postpone hantavirus infection and enhance individual breeding success. *Proc. Biol. Sci.* 273, 2771–2776. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3645>
- Kallio, E.R., Voutilainen, L., Vapalahti, O., Vaheri, A., Henttonen, H., Koskela, E., Mappes, T., 2007. Endemic hantavirus infection impairs the winter survival of its rodent host. *Ecology* 88, 1911–

- 1916.
- Kallio-Kokko, H., Leveelahti, R., Brummer-Korvenkontio, M., Lundkvist A, null, Vaheri, A., Vapalahti, O., 2001. Human immune response to Puumala virus glycoproteins and nucleocapsid protein expressed in mammalian cells. *J. Med. Virol.* 65, 605–613.
- Khalil, H., Olsson, G., Ecke, F., Evander, M., Hjertqvist, M., Magnusson, M., Löfvenius, M.O., Hörnfeldt, B., 2014. The importance of bank vole density and rainy winters in predicting nephropathia epidemica incidence in Northern Sweden. *PLoS ONE* 9, e111663. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111663>
- Korva, M., Saksida, A., Kunilo, S., Vidan Jeras, B., Avsic-Zupanc, T., 2011. HLA-associated hemorrhagic fever with renal syndrome disease progression in slovenian patients. *Clin. Vaccine Immunol.* 18, 1435–1440. <https://doi.org/10.1128/CVI.05187-11>
- Kraus, A.A., Priemer, C., Heider, H., Kruger, D.H., Ulrich, R., 2005. Inactivation of Hantaan virus-containing samples for subsequent investigations outside biosafety level 3 facilities. *Intervirology* 48, 255–261. <https://doi.org/10.1159/000084603>
- Laine, O., Leppänen, I., Koskela, S., Anttonen, J., Mäkelä, S., Sinisalo, M., Vaheri, A., Mustonen, J., 2015. Severe Puumala virus infection in a patient with a lymphoproliferative disease treated with ibrutinib. *Infect Dis (Lond)* 47, 107–111. <https://doi.org/10.3109/00365548.2014.969304>
- Langlois, J.P., Fahrig, L., Merriam, G., Artsob, H., 2001. Landscape structure influences continental distribution of hantavirus in deer mice. *Landscape Ecology* 16, 255–266. <https://doi.org/10.1023/A:1011148316537>
- Lautrette, A., Merrer, J., Murgue, B., 2003. Infections à Hantavirus en Ile-de-France. *Néphrologie* 24, 167–171.
- Le Guenno, B., 1997. Les hantavirus. *Médecine et Maladies Infectieuses* 27, 703–710. [https://doi.org/10.1016/S0399-077X\(97\)80179-5](https://doi.org/10.1016/S0399-077X(97)80179-5)
- Ledevin, R., Chevret, P., Helvacı, Z., Michaux, J.R., Renaud, S., 2018. Bank Voles in Southern Eurasia: Vicariance and Adaptation. *Journal of Mammalian Evolution* 25, 119–129. <https://doi.org/10.1007/s10914-016-9368-3>
- Lee, S.-H., Chung, B.-H., Lee, W.-C., Choi, I.-S., 2013. Epidemiology of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome in Korea, 2001–2010. *Journal of Korean Medical Science* 28, 1552. <https://doi.org/10.3346/jkms.2013.28.10.1552>
- Linard, C., Tersago, K., Leirs, H., Lambin, E.F., 2007. Environmental conditions and Puumala virus transmission in Belgium. *Int J Health Geogr* 6, 55. <https://doi.org/10.1186/1476-072X-6-55>
- Liu, Z., Gao, M., Han, Q., Lou, S., Fang, J., 2009. Platelet glycoprotein IIb/IIIa (HPA-1 and HPA-3) polymorphisms in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Hum. Immunol.* 70, 452–456. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.03.009>
- Ma, Y., Yuan, B., Yi, J., Zhuang, R., Wang, J., Zhang, Yun, Xu, Z., Zhang, Yusi, Liu, B., Wei, C., Zhang, C., Yang, A., Jin, B., 2012. The genetic polymorphisms of HLA are strongly correlated with the disease severity after Hantaan virus infection in the Chinese Han population. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 308237. <https://doi.org/10.1155/2012/308237>
- MacNeil, A., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., 2011. Hantavirus pulmonary syndrome, United States, 1993–2009. *Emerging Infect. Dis.* 17, 1195–1201. <https://doi.org/10.3201/eid1707.101306>
- Mäkelä, S., Mustonen, J., Ala-Houhala, I., Hurme, M., Partanen, J., Vapalahti, O., Vaheri, A., Pasternack, A., 2002. Human leukocyte antigen-B8-DR3 is a more important risk factor for severe Puumala hantavirus infection than the tumor necrosis factor-alpha(-308) G/A polymorphism. *J. Infect. Dis.* 186, 843–846. <https://doi.org/10.1086/342413>
- Mazurkiewicz, M., Rajska-Jurgiel, E., 1998. Spatial behaviour and population dynamics of woodland rodents. *Acta Theriologica* 43, 137–161. <https://doi.org/10.4098/AT.arch.98-11>
- McKenna, P., Clement, J., Matthys, P., Coyle, P.V., McCaughey, C., 1994. Serological evidence of Hantavirus disease in Northern Ireland. *J. Med. Virol.* 43, 33–38.
- Mery, J., 1983. Muroid Virus Nephropathies. *The Lancet* 322, 845–846. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(83\)90754-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(83)90754-7)
- Meyer, B.J., Schmaljohn, C.S., 2000. Persistent hantavirus infections: characteristics and mechanisms.

- Trends Microbiol. 8, 61–67.
- Moreli, M.L., Marques-Silva, A.C., Pimentel, V.A., da Costa, V.G., 2014. Effectiveness of the ribavirin in treatment of hantavirus infections in the Americas and Eurasia: a meta-analysis. *Virusdisease* 25, 385–389. <https://doi.org/10.1007/s13337-014-0219-7>
- Murphy, M.E., Kariwa, H., Mizutani, T., Tanabe, H., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I., 2001. Characterization of in vitro and in vivo antiviral activity of lactoferrin and ribavirin upon hantavirus. *J. Vet. Med. Sci.* 63, 637–645.
- Mustonen, J., Partanen, J., Kanerva, M., Pietilä, K., Vapalahti, O., Pasternack, A., Vaheri, A., 1998. Association of HLA B27 with benign clinical course of nephropathia epidemica caused by Puumala hantavirus. *Scand. J. Immunol.* 47, 277–279.
- Mustonen, J., Partanen, J., Kanerva, M., Pietilä, K., Vapalahti, O., Pasternack, A., Vaheri, A., 1996. Genetic susceptibility to severe course of nephropathia epidemica caused by Puumala hantavirus. *Kidney Int.* 49, 217–221.
- Nuti, M., Amadeo, D., Crovatto, M., Ghionni, A., Polato, D., Lillini, E., Pitzus, E., Santini, G.F., 1993. Infections in an Alpine environment: antibodies to hantaviruses, leptospira, rickettsiae, and *Borrelia burgdorferi* in defined Italian populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48, 20–25. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1993.48.20>
- Olsson, G.E., Leirs, H., Henttonen, H., 2010. Hantaviruses and their hosts in Europe: reservoirs here and there, but not everywhere? *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10, 549–561. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0138>
- Olsson, G.E., White, N., Hjältén, J., Ahlm, C., 2005. Habitat factors associated with bank voles (*Clethrionomys glareolus*) and concomitant hantavirus in northern Sweden. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 5, 315–323. <https://doi.org/10.1089/vbz.2005.5.315>
- Papadimitriou, M.G., Antoniadis, A., 1994. Hantavirus nephropathy in Greece. *Lancet* 343, 1038.
- Penalba, C., Galempoix, J.M., Lanoux, P., 2001. Épidémiologie des infections à hantavirus en France. *Médecine et Maladies Infectieuses* 31, 272–284. [https://doi.org/10.1016/S0399-077X\(01\)80067-6](https://doi.org/10.1016/S0399-077X(01)80067-6)
- Penalba, C., Halin, P., Lanoux, P., Reveil, J.C., Le Guenno, B., Camprasse, A.M., 1994. Fièvre hémorragique avec syndrome rénal (FHSR). Aspects épidémiologique et clinique dans le département des Ardennes (76 observations). *Médecine et Maladies Infectieuses* 24, 506–511. [https://doi.org/10.1016/S0399-077X\(05\)81256-9](https://doi.org/10.1016/S0399-077X(05)81256-9)
- Pettersson, L., Boman, J., Juto, P., Evander, M., Ahlm, C., 2008. Outbreak of Puumala virus infection, Sweden. *Emerging Infect. Dis.* 14, 808–810. <https://doi.org/10.3201/eid1405.071124>
- Pettersson, L., Thunberg, T., Rocklöv, J., Klingström, J., Evander, M., Ahlm, C., 2014. Viral load and humoral immune response in association with disease severity in Puumala hantavirus-infected patients—implications for treatment. *Clinical Microbiology and Infection* 20, 235–241. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12259>
- Pettorelli, N., Vik, J.O., Mysterud, A., Gaillard, J.-M., Tucker, C.J., Stenseth, N.C., 2005. Using the satellite-derived NDVI to assess ecological responses to environmental change. *Trends Ecol. Evol. (Amst.)* 20, 503–510. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.05.011>
- Plyusnina, A., Razzauti, M., Sironen, T., Niemimaa, J., Vapalahti, O., Vaheri, A., Henttonen, H., Plyusnin, A., 2012. Analysis of complete Puumala virus genome, Finland. *Emerging Infect. Dis.* 18, 2070–2072. <https://doi.org/10.3201/eid1811.120747>
- Popugaeva, E., Witkowski, P.T., Schlegel, M., Ulrich, R.G., Auste, B., Rang, A., Krüger, D.H., Klempa, B., 2012. Dobrava-Belgrade hantavirus from Germany shows receptor usage and innate immunity induction consistent with the pathogenicity of the virus in humans. *PLoS ONE* 7, e35587. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035587>
- Previtali, M.A., Lehmer, E.M., Pearce-Duvet, J.M.C., Jones, J.D., Clay, C.A., Wood, B.A., Ely, P.W., Laverty, S.M., Dearing, M.D., 2010. Roles of human disturbance, precipitation, and a pathogen on the survival and reproductive probabilities of deer mice. *Ecology* 91, 582–592.
- Prevot-Julliard, A.-C., Henttonen, H., Yoccoz, N.G., Stenseth, N.ChR., 1999. Delayed maturation in female bank voles: optimal decision or social constraint? *Journal of Animal Ecology* 68, 684–

697. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.1999.00307.x>
- Prist, P.R., D Andrea, P.S., Metzger, J.P., 2017. Landscape, Climate and Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome Outbreaks. *Ecohealth* 14, 614–629. <https://doi.org/10.1007/s10393-017-1255-8>
- Quere, J.-P., Le Louarn, H., 2011. Les rongeurs de France - Faunistique et Biologie, 3ème édition. ed, Guide pratique. Quae.
- 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. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn234>
- Ray, N., Whidby, J., Stewart, S., Hooper, J.W., Bertolotti-Ciarlet, A., 2010. Study of Andes virus entry and neutralization using a pseudovirion system. *J. Virol. Methods* 163, 416–423. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.11.004>
- Razzauti, M., Plyusnina, A., Henttonen, H., Plyusnin, A., 2013. Microevolution of Puumala hantavirus during a complete population cycle of its host, the bank vole (*Myodes glareolus*). *PLoS ONE* 8, e64447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064447>
- Reil, D., Imholt, C., Eccard, J.A., Jacob, J., 2015. Beech Fructification and Bank Vole Population Dynamics--Combined Analyses of Promoters of Human Puumala Virus Infections in Germany. *PLoS ONE* 10, e0134124. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134124>
- Reil, D., Rosenfeld, U.M., Imholt, C., Schmidt, S., Ulrich, R.G., Eccard, J.A., Jacob, J., 2017. Puumala hantavirus infections in bank vole populations: host and virus dynamics in Central Europe. *BMC Ecol.* 17, 9. <https://doi.org/10.1186/s12898-017-0118-z>
- Reuter, M., Krüger, D.H., 2018. The nucleocapsid protein of hantaviruses: much more than a genome-wrapping protein. *Virus Genes* 54, 5–16. <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1522-3>
- Reynes, J.-M., 2013. Taxonomie des hantavirus et situation des hantaviroses en France. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France* 155. <https://doi.org/10.4267/2042/51620>
- Reynes, J.-M., Carli, D., Renaudin, B., Fizet, A., Bour, J.-B., Brodard, V., Cart-Tanneur, E., Dewilde, A., El Hamri, M., Fleury, H., Hecquet, D., Jeulin, H., Lechat, S., Lemarquand-Bardini, M., Lepiller, Q., Poveda, J.-D., Raulin, O., Twizeyimana, E., Van Cauteren, D., Velay, A., Septfons, A., Baize, S., 2017. Surveillance of human hantavirus infections in metropolitan France, 2012–2016. *BEH* 492–499.
- Richardson, K.S., Kuenzi, A., Douglass, R.J., Hart, J., Carver, S., 2013. Human exposure to particulate matter potentially contaminated with sin nombre virus. *Ecohealth* 10, 159–165. <https://doi.org/10.1007/s10393-013-0830-x>
- Rose, A.M.C., Vapalahti, O., Lyytikäinen, O., Nuorti, P., 2003. Patterns of Puumala virus infection in Finland. *Euro Surveill.* 8, 9–13.
- Safronetz, D., Falzarano, D., Scott, D.P., Furuta, Y., Feldmann, H., Gowen, B.B., 2013. Antiviral efficacy of favipiravir against two prominent etiological agents of hantavirus pulmonary syndrome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 4673–4680. <https://doi.org/10.1128/AAC.00886-13>
- Sauvage, F., Langlais, M., Yoccoz, N.G., Pontier, D., 2003. Modelling hantavirus in fluctuating populations of bank voles: the role of indirect transmission on virus persistence. *Journal of Animal Ecology* 72, 1–13. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.2003.00675.x>
- Sauvage, F., Penalba, C., Vuillaume, P., Boue, F., Coudrier, D., Pontier, D., Artois, M., 2002. Puumala hantavirus infection in humans and in the reservoir host, Ardennes region, France. *Emerging Infect. Dis.* 8, 1509–1511. <https://doi.org/10.3201/eid0812.010518>
- Schneider, D.S., Ayres, J.S., 2008. Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 889–895. <https://doi.org/10.1038/nri2432>
- Sironen, T., Vaheri, A., Plyusnin, A., 2001. Molecular evolution of Puumala hantavirus. *J. Virol.* 75, 11803–11810. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.23.11803-11810.2001>
- Tersago, K., Crespin, L., Verhagen, R., Leirs, H., 2012. Impact of Puumala virus infection on maturation and survival in bank voles: a capture-mark-recapture analysis. *J. Wildl. Dis.* 48, 148–156. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-48.1.148>
- Tersago, K., Schreurs, A., Linard, C., Verhagen, R., Van Dongen, S., Leirs, H., 2008. Population,

- environmental, and community effects on local bank vole (*Myodes glareolus*) Puumala virus infection in an area with low human incidence. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8, 235–244. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0160>
- Thoma, B.R., Müller, J., Bässler, C., Georgi, E., Osterberg, A., Schex, S., Bottomley, C., Essbauer, S.S., 2014. Identification of factors influencing the Puumala virus seroprevalence within its reservoir in a Montane Forest Environment. *Viruses* 6, 3944–3967. <https://doi.org/10.3390/v6103944>
- Tian, H., Yu, P., Bjørnstad, O.N., Cazelles, B., Yang, J., Tan, H., Huang, S., Cui, Y., Dong, L., Ma, Chaofeng, Ma, Changan, Zhou, S., Laine, M., Wu, X., Zhang, Y., Wang, J., Yang, R., Stenseth, N.C., Xu, B., 2017. Anthropogenically driven environmental changes shift the ecological dynamics of hemorrhagic fever with renal syndrome. *PLoS Pathog.* 13, e1006198. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006198>
- Tordo, N., Castel, G., Filippone, C., Marianneau, P., 2013. Données récentes sur les hantavirus et perspectives de recherche. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France* 364. <https://doi.org/10.4267/2042/53063>
- Ulrich, R.G., Schmidt-Chanasit, J., Schlegel, M., Jacob, J., Pelz, H.-J., Mertens, M., Wenk, M., Büchner, T., Masur, D., Sevke, K., Groschup, M.H., Gerstengarbe, F.-W., Pfeffer, M., Oehme, R., Wegener, W., Bemann, M., Ohlmeyer, L., Wolf, R., Zoller, H., Koch, J., Brockmann, S., Heckel, G., Essbauer, S.S., 2008. Network “Rodent-borne pathogens” in Germany: longitudinal studies on the geographical distribution and prevalence of hantavirus infections. *Parasitol. Res.* 103 Suppl 1, S121–129. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1054-9>
- Vaheri, A., Strandin, T., Hepojoki, J., Sironen, T., Henttonen, H., Mäkelä, S., Mustonen, J., 2013. Uncovering the mysteries of hantavirus infections. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 539–550.
- Vapalahti, O., Mustonen, J., Lundkvist, A., Henttonen, H., Plyusnin, A., Vaheri, A., 2003. Hantavirus infections in Europe. *Lancet Infect Dis* 3, 653–661.
- Voutilainen, L., Kallio, E.R., Niemimaa, J., Vapalahti, O., Henttonen, H., 2016. Temporal dynamics of Puumala hantavirus infection in cyclic populations of bank voles. *Sci Rep* 6, 21323. <https://doi.org/10.1038/srep21323>
- Voutilainen, L., Sironen, T., Tonteri, E., Bäck, A.T., Razzauti, M., Karlsson, M., Wahlström, M., Niemimaa, J., Henttonen, H., Lundkvist, Å., 2015. Life-long shedding of Puumala hantavirus in wild bank voles (*Myodes glareolus*). *J. Gen. Virol.* 96, 1238–1247. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000076>
- Wang, M.L., Lai, J.H., Zhu, Y., Zhang, H.B., Li, C., Wang, J.P., Li, Y.M., Yang, A.G., Jin, B.Q., 2009. Genetic susceptibility to haemorrhagic fever with renal syndrome caused by Hantaan virus in Chinese Han population. *Int. J. Immunogenet.* 36, 227–229. <https://doi.org/10.1111/j.1744-313X.2009.00848.x>
- Watson, D.C., Sargianou, M., Papa, A., Chra, P., Starakis, I., Panos, G., 2014. Epidemiology of Hantavirus infections in humans: a comprehensive, global overview. *Crit. Rev. Microbiol.* 40, 261–272. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.783555>
- Wróbel, A., Bogdziewicz, M., 2015. It is raining mice and voles: which weather conditions influence the activity of *Apodemus flavicollis* and *Myodes glareolus*? *European Journal of Wildlife Research* 61, 475–478. <https://doi.org/10.1007/s10344-014-0892-2>
- ylönen, H., Viitala, J., 1985. Social organization of an enclosed winter population of bank vole *Clethrionomys glareolus*. *Annales Zoologici Fennici* 22, 353–358.
- Zeimes, C.B., Quoilin, S., Henttonen, H., Lyytikäinen, O., Vapalahti, O., Reynes, J.-M., Reusken, C., Swart, A.N., Vainio, K., Hjertqvist, M., Vanwambeke, S.O., 2015. Landscape and regional environmental analysis of the spatial distribution of hantavirus human cases in Europe. *Front Public Health* 3, 54. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2015.00054>
- Zeller, H., Georges-Courbot, M.-C., Schuffenecker, I., Mailles, A., 2005. La fièvre hémorragique avec syndrome rénal en France en 2001–2003 : aspects épidémiologiques. *Surveillance nationale des maladies infectieuses, 2001–2003*. Saint-Maurice : Institut de veille sanitaire, 2005. URL http://invs.santepubliquefrance.fr/publications/2005/snmi/fievre_hemorragique.html
- Zhang, Y., Zhang, Hailin, Dong, X., Yuan, J., Zhang, Huajun, Yang, X., Zhou, P., Ge, X., Li, Y., Wang, L.-F.,

- Shi, Z., 2010. Hantavirus outbreak associated with laboratory rats in Yunnan, China. *Infect. Genet. Evol.* 10, 638–644. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.03.015>
- Zhu, N., Luo, F., Chen, Q., Li, N., Xiong, H., Feng, Y., Yang, Z., Hou, W., 2015. Influence of HLA-DRB alleles on haemorrhagic fever with renal syndrome in a Chinese Han population in Hubei Province, China. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 187–195. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2213-9>
- Zöller, L., Faulde, M., Meisel, H., Ruh, B., Kimmig, P., Schelling, U., Zeier, M., Kulzer, P., Becker, C., Roggendorf, M., 1995. Seroprevalence of hantavirus antibodies in Germany as determined by a new recombinant enzyme immunoassay. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*

Annexe 1

Ordre: Bunyavirales (9 Familles)

Famille : Hantaviridae (1 Genre)

Genre : Orthohantavirus (41 espèces) :

Espèce : *Amga orthohantavirus*

*Espèce : *Andes orthohantavirus* (ADNV)

Espèce : *Asama orthohantavirus*

Espèce : *Asikkala orthohantavirus*

Espèce : *Bayou orthohantavirus*

Espèce : *Black Creek Canal orthohantavirus*

Espèce : *Bowe orthohantavirus*

Espèce : *Bruges orthohantavirus*

Espèce : *Cano Delgadito orthohantavirus*

Espèce : *Cao Bang orthohantavirus*

Espèce : *Choclo orthohantavirus*

Espèce : *Dabieshan orthohantavirus*

*Espèce : *Dobrava-Belgrade orthohantavirus* (DOBV)

Espèce : *El Moro Canyon orthohantavirus*

Espèce : *Fugong orthohantavirus*

Espèce : *Fusong orthohantavirus*

*Espèce : *Hantaan orthohantavirus* (HTNV)

Espèce : *Imjin orthohantavirus*

Espèce : *Jeju orthohantavirus*

Espèce : *Kenkeme orthohantavirus*

Espèce : *Khabarovsk orthohantavirus*

Espèce : *Laguna Negra orthohantavirus*

Espèce : *Laibin orthohantavirus*

Espèce : *Longquan orthohantavirus*

Espèce : *Luxi orthohantavirus*

Espèce : *Maporal orthohantavirus*

Espèce : *Montano orthohantavirus*

Espèce : *Necocli orthohantavirus*

Espèce : *Nova orthohantavirus*

Espèce : *Oxbow orthohantavirus*

*Espèce : *Prospect Hill orthohantavirus* (PHV)

*Espèce : *Puumala orthohantavirus* (PUUV)

Espèce : *Quezon orthohantavirus*

Espèce : *Rockport orthohantavirus*

Espèce : *Sangassou orthohantavirus*

*Espèce : *Seoul orthohantavirus* (SEOV)

Espèce : *Sin Nombre orthohantavirus*

Espèce : *Thailand orthohantavirus*

Espèce : *Thottapalayam orthohantavirus*

*Espèce : *Tula orthohantavirus* (TULV)

Espèce : *Yakeshi orthohantavirus*

Les espèces présentes en Europe sont soulignées dans la liste, celles qui sont évoquées dans ce manuscrit sont précédées d'un astérisque.

Résumé / abstract

Titre : Epidémiologie descriptive et analytique des orthohantavirus chez les rongeurs sauvages en France

Mots-clefs : orthohantavirus, zoonoses, épidémiologie, réservoir, campagnols roussâtres

Résumé :

Les orthohantavirus sont des virus, généralement zoonotiques, présents dans la plupart des zones d'habitat des rongeurs, espèces réservoirs. En Europe, le virus Puumala (PUUV) est l'orthohantavirus qui provoque le plus grand nombre de cas humains, appelées néphropathies épidémiques (NE). L'Homme se contamine le plus souvent de façon indirecte via un contact avec des déjections de campagnol roussâtre (*Myodes glareolus*) qui est le réservoir spécifique du PUUV. Le rongeur se contamine de façon indirecte comme l'Homme ou de façon directe lors d'interactions avec un campagnol infecté. En France, la zone d'endémie des cas humains se situe dans le quart Nord-Est du pays. Au sein de cette zone, plusieurs foyers ont été identifiés parmi lesquels le nombre de cas varie en fonction des zones, des saisons et des années. L'épidémiologie des cas de NE est intimement liée à celle des infections à PUUV des campagnols. Cependant, la simple présence d'une population de campagnols infectée n'explique pas la disparité spatiale du nombre de cas humains, avec des zones restant indemnes de NE malgré une séroprévalence parfois élevée chez les rongeurs.

L'objectif général de cette thèse est de mieux comprendre les facteurs qui expliquent cette disparité en comparant une zone de faible endémie qu'est l'Alsace à une zone de forte endémie que sont les Ardennes. Une première étude a permis d'investiguer le lien entre le risque pour l'Homme et le nombre de rongeurs infectés et donc potentiellement excréteurs, via un suivi de la séroprévalence chez le rongeur dans le temps et dans l'espace en Alsace. En comparaison avec de précédentes études réalisées dans des zones de forte endémie, nos résultats montrent qu'en Alsace le nombre limité de cas humains est associé à une faible séroprévalence des rongeurs. Outre le nombre de rongeurs infectés, l'importance de la contamination environnementale et donc le risque de contamination humaine, dépend du niveau d'excrétion virale par les rongeurs, qui est modulée pour partie par le variant viral. Aussi, dans un deuxième temps, une étude phylogénétique a été conduite pour évaluer la microévolution du virus entre plusieurs sites des Ardennes. Cette microévolution s'est avérée très différente en fonction du nombre de cas de NE associé à chaque site et était en lien avec les caractéristiques du renouvellement des individus (via la survie et les migrations) au sein de chaque population de rongeurs. Enfin, le troisième volet de ce travail a visé à déterminer l'impact de l'environnement sur la démographie et l'infection des rongeurs dans les Ardennes. Cette partie a débuté par une revue exhaustive de la littérature afin d'identifier le rôle des conditions climatiques, de l'habitat des rongeurs et de la disponibilité alimentaire sur la séroprévalence des rongeurs et sur le nombre de cas de NE. Dans un second temps, des analyses à l'aide de modèles de régression ont permis d'examiner l'influence de ces différents facteurs sur le risque d'infection des rongeurs, estimé par deux indicateurs : la séroprévalence, communément utilisée dans de telles études, et le taux d'incidence, bien plus sensible du moment de l'infection. Logiquement, nos résultats ont montré que la séroprévalence et le taux d'incidence ne sont pas influencés par les mêmes facteurs ; ceux-ci sont discutés au regard des résultats des précédentes études.

Nos études suggèrent que l'hétérogénéité spatiale des cas de NE est en partie liée au nombre de rongeurs infectés et à la diversité des souches de PUUV, qui dépendent des caractéristiques démographiques des populations de rongeurs et de l'environnement. Ces résultats sont à approfondir et d'autres hypothèses doivent être explorées, comme l'influence de l'immunité des rongeurs sur le niveau d'excrétion virale et la modulation de leur risque de contamination par leur comportement. Tous ces apports pourraient être utilisés dans des modèles épidémiologiques afin de mieux évaluer le risque pour l'Homme.

Title: Descriptive and analytical epidemiology of orthohantavirus in wild rodents in France

Keywords: orthohantavirus, zoonosis, epidemiology, reservoir, bank voles

Abstract:

Orthohantavirus are viruses, mostly zoonotic, present in most places inhabited by rodents, which are the reservoir species. In Europe, Puumala virus (PUUV) is the orthohantavirus that causes the highest number of human disease cases, called nephropathia epidemica (NE). The virus is transmitted to humans indirectly via excretions of bank vole (*Myodes glareolus*), which is the reservoir species of PUUV. Infection of bank voles occurs by indirect contamination as in humans or by direct contact with another infected rodent. In France, the endemic area is located in the north-eastern part of the country. In this area, several outbreaks were identified among which the number of cases varies depending on locations, years and seasons. The epidemiology of human cases is closely related to PUUV infections in bank voles. However, the presence of an infected bank vole population alone does not explain the heterogeneous spatial distribution of human cases, with some areas remaining free of NE cases in spite of a high rodent seroprevalence.

The main goal of this PhD was to better understand the factors that explain this discrepancy by comparing a low endemic area, that is Alsace, and a high endemic area, that is Ardennes. A first study evaluated the link between the risk for humans and the number of infected, and thus potentially excreting, rodents via the monitoring of rodent seroprevalence in space and time in Alsace. In comparison with studies conducted in highly endemic areas, our results show that in Alsace the limited number of human cases is associated with a low rodent seroprevalence. In addition to the number of infected rodents, the importance of environmental contamination and by this way the contamination risk for humans are impacted by the quantity of virus excreted by bank voles, which is partially modulated by the virus strain. Then, in a second phase, a phylogenetic study was conducted to assess the microevolution of virus in several sites in Ardennes. This microevolution was found to be very different depending on the number of NE cases associated to each site and was related to the characteristics of individual turnover (through survival and movements) in each rodent population. At last, the third phase of this thesis aimed to determine the impact of the environment on the demography and infection of rodents in Ardennes. This part started with an exhaustive literature review to identify the role of climatic conditions (temperatures, precipitations, snow) and food availability on rodent seroprevalence and on the number of human cases. Then, analyses with regression models allowed investigating the impact of these different factors on the risk of infection of rodents, estimated by two indicators: the seroprevalence, which is commonly used in such studies, and the incidence rate, which is a better indicator of the time of infection. Logically, our results showed that seroprevalence and incidence rate were not influenced by the same factors; the role of those factors is discussed in view of results from previous studies.

Our studies suggested that the spatial heterogeneity of NE cases was partly related to the number of infected rodents and to the diversity of PUUV strains, which depend on the demographic characteristics of the rodent populations and their environment. These insights require further studies and other hypotheses need to be explored, such as the influence of rodent immunity on the level of viral excretion and the modulation of their contamination risk by their behaviour. All those inputs could be used in epidemiological models to better evaluate the risk for humans.