

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

Ac : Anticorps

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

Ag : Antigène

ARN : Acide RiboNucléique

DO : Densité optique

DOBV : *Dobrava-Belgrade virus*

EIA : Enzyme-ImmunoAssay

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FHSR : Fièvre Hémorragique à Syndrome Rénal

GPC : Glycoprotein Precursor

HRP : HorseRadish Peroxidase

HSCP : Hantavirose à Syndrome Cardio-Pulmonaire

HTNV : *Hantaan virus*

ICTV : International Committee on Taxonomy of Viruses

IgG : Immunoglobuline G

IPM : Institut Pasteur de Madagascar

L : Large

M : Medium

N : Nucléoprotéine

NE : Néphropathie Epidémique

PCR : Polymerase Chain Reaction

RdRp : ARN polymérase ARN dépendante

rNP : Protéine recombinante de la nucléocapside

RT : Reverse transcriptase

S : Small

SANGV : *Sangassou virus*

SEOV : *Seoul virus*

TAE : Tris Acétate EDTA (Ethylène Diamine Tétra-Acétique)

THAIV : *Thailand virus*

TMB : TetraMethyl Benzidine

UV : Ultra-Violet

ZORA : ZOonoses, Rongeurs et Arboviroses

Liste par ordre alphabétique

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Structure des hantavirus et de leur génome.
- Figure 2 : Distribution géographique des hantavirus pathogènes et les principales pathologies associées aux humains.
- Figure 3 : Arbre phylogénétique des hantavirus associés aux rongeurs de la sous-familles des *Murinae*.
- Figure 4 : Répartition géographique des 28 sites où les individus ont été recrutés.
- Figure 5 : Distribution de la population selon la classe d'âge avec un intervalle de 10 ans.
- Figure 6 : Distribution de la population selon l'activité professionnelle.
- Figure 7 : Distribution de la population selon l'exposition aux rats.
- Figure 8 : Récapitulatif des analyses ELISA pour la détection des anticorps IgG contre les hantavirus.
- Figure 9 : Distribution géographique et séroprévalence des hantavirus dans les 28 sites d'études à Madagascar.
- Figure 10a : Séroprévalence des hantavirus dans la population malagasy selon la classe d'âge.
- Figure 10b : Séroprévalence des hantavirus selon les catégories des activités professionnelles.
- Figure 10c : Séroprévalence des hantavirus selon l'exposition aux rats.
- Figure 11 : Thermocycleur utilisé pour le RT-PCR nichée Hantavirus (BIOMETRA T 3000).

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1 : Liste des hantavirus découverts dans le continent africain.
- Tableau 2 : Liste des sites d'études où les individus ont été recrutés dans le cadre du projet ZORA.
- Tableau 3 : Préparations des mélanges réactionnels pour l'analyse moléculaire : RT-PCR, PCR nichée.
- Tableau 4 : Profil thermique de la RT-PCR *Hantavirus*.
- Tableau 5 : Profil thermique de la PCR nichée *Hantavirus*.
- Tableau 6 : Répartition des individus séropositifs selon l'origine géographique, le sexe, l'âge, les catégories des activités professionnelles et l'exposition aux rats.
- Tableau 7 : Séroprévalence aux hantavirus dans la population malagasy selon l'âge, le sexe, l'exposition aux rats et les activités professionnelles.

SOMMAIRE

I- INTRODUCTION.....	1
II- GENERALITES.....	8
II-1- SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE ET HISTORIQUE SUR LES HANTAVIRUS.....	8
II-2- TRANSMISSION A L'HOMME	10
III- MATÉRIELS ET MÉTHODES	11
III-1- POPULATION D'ÉTUDE.....	11
III-2- MATÉRIEL UTILISÉ POUR LE TEST ELISA.....	13
III-3- ANALYSE SÉROLOGIQUE	13
ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) INDIRECT.....	13
PRINCIPE.....	13
MODE OPÉRATOIRE	14
III-4- ANALYSE MOLECULAIRE.....	16
III-4-1- EXTRACTION DU GÉNOME VIRAL.....	16
PRINCIPE.....	16
MODE OPÉRATOIRE	16
III-4-2- REVERSE TRANSCRIPTASE – POLYMERASE CHAIN REACTION NICHEE.....	18
PRINCIPE.....	18
MODE OPÉRATOIRE	19
III-4-3- ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE	20
PRINCIPE.....	20
MODE OPÉRATOIRE	21
IV- RÉSULTATS.....	22
IV-1- ANALYSE DESCRIPTIVE DE LA POPULATION D'ÉTUDE	22
IV-2- ANALYSE SÉROLOGIQUE	23
IV-3- ANALYSE MOLECULAIRE	28
V- DISCUSSION.....	29
VI- CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	32
VII- RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	33
ANNEXE 1 : CARACTÉRISTIQUES DES AMORCES UTILISÉES EN RT-PCR ET EN PCR-NICHEE (Klempa <i>et al.</i> 2006).	i
ANNEXE 2 : APPAREIL UTILISÉ POUR LA PCR.....	i

I- INTRODUCTION

Les hantavirus sont des virus zoonotiques de la famille des *Bunyaviridae*, du genre *Hantavirus*. Actuellement, vingt-cinq espèces sont incluses dans ce genre par l'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). Chaque espèce possède plusieurs sous-espèces et/ou des variantes génétiques. Les réservoirs naturels des hantavirus sont des petits Mammifères tels que les rongeurs, les insectivores (Jonsson *et al.* 2010, Arai *et al.* 2012) et, plus récemment découverts, les chauves-souris (Weiss *et al.* 2012, Arai *et al.* 2013). Parmi les différents genres de la famille des *Bunyaviridae*, les hantavirus ne sont pas transmis à l'homme par les arthropodes, mais par inhalation d'aérosol contaminé par l'urine et/ou excrétion d'un animal infecté ; les transmissions par morsure sont rares.

CARACTERISTIQUES DES HANTAVIRUS

Sous microscope électronique, les hantavirus se présentent comme une sphère dont le diamètre varie entre 80 à 120 nm. Le génome des hantavirus comprend trois segments d'ARN de polarité négative monocaténaire.

Les trois segments sont désignés selon leur taille : le segment S (small), dont la taille varie de 1,6 à 2 kb (1696-2083 nucléotide (nt)), code pour la protéine de la nucléocapside (N) ; le segment M (medium), dont la taille est d'environ 3,6 kb (3613-3707 nt), code pour une polyprotéine précurseur des glycoprotéines (GPC) de surface ; le segment L (large), dont la taille est d'environ 6,5kb (6530-6550 nt), code pour un enzyme polymérase qui est une ARN polymérase ARN dépendante (RdRp). Chaque segment du génome est associé à la nucléoprotéine pour former le ribonucléocapside. L'ensemble est enfermé dans une enveloppe de bicouche lipidique hérissée par des glycoprotéines de surface Gn et Gc (Figure 1, p. 2).

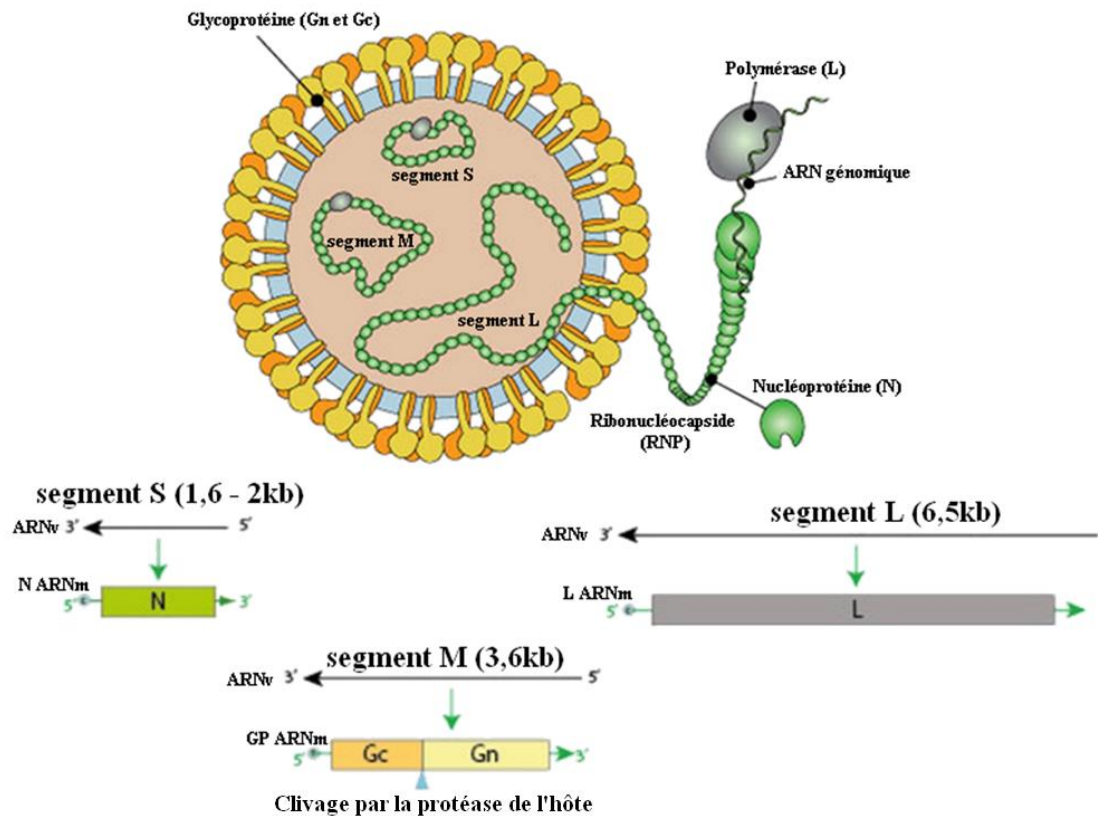


Figure 1. Structure des hantavirus et de leur génome.
(Source : adapté à partir de <http://viralzone.expasy.org/>)

DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DES HANTAVIRUS

Les hantavirus sont distribués dans plusieurs régions du monde : Afrique, Amérique, Asie et Europe (Figure 2, p. 3) (Krüger *et al.* 2015). La répartition géographique des hantavirus est en lien avec celle des hôtes qu'ils infectent. Les pathologies liées à l'infection des hantavirus sont principalement la fièvre hémorragique à syndrome rénale (FHSR), la néphropathie épidémique (NE) et l'hantavirose à syndrome cardiopulmonaire (HSCP). Auparavant, seuls les hantavirus associés aux rongeurs ont été décrits comme pathogènes pour l'homme (Tordo *et al.* 2013). Très récemment, en Afrique, une étude chez l'homme a mis en évidence la présence d'anticorps (Ac) dirigés contre des hantavirus (*Bowé virus*, *Uluguru virus*) associés aux insectivores ; ainsi l'infection avec *Bowé virus* semble associée à une pathologie au niveau du système rénal (Heinemann *et al.* 2016).



Figure 2. Distribution géographique des hantavirus pathogènes et les principales pathologies associées aux humains.

HSCP = hantavirose à syndrome cardiopulmonaire ; FHSR = Fièvre hémorragique à syndrome rénale ; NE = néphropathie épidémique (Manigold and Vial 2014).

Le nombre des personnes touchées par la FHSR est estimé entre 150 000 et 200 000 par an dans le monde (Manigold and Vial 2014), la majorité étant rencontrée en Asie, avec un taux de mortalité compris entre 1% et 12%.

En Europe, 10 000 cas de FHSR sont détectés annuellement. Deux espèces d'hantavirus, *Dobrava-Belgrade virus* (DOBV) et *Puumala virus* (PUUV), sont les plus connus comme responsables de la forme sévère (FHSR) et atténuée (NE) de la maladie (Vaheiri *et al.* 2013).

En Asie, *Hantaan virus* (HTNV) et *Seoul virus* (SEOV) sont les principaux agents de la FHSR, en particulier en Chine où la maladie est endémique (70% - 40000 à 90% - 60000) (Bi *et al.* 2008).

Approximativement 200 cas par an sont détectés pour la HSCP en Amérique, un nombre très inférieur à celui de la FHSR, avec un taux de mortalité aux environs de 40%.

En Amérique, les espèces *Sin Nombre virus* (SNV) et *Andes virus* (ANDV) sont reconnues comme les principaux agents de la HSCP (Krüger *et al.* 2015).

En Afrique, les recherches, les données épizootiques et épidémiologiques (la circulation et la répartition de la pathologie chez les animaux et l'homme) sur les hantavirus sont très récentes par rapport aux autres continents. Ce n'est qu'en 2006 que l'équipe de Klempa a découvert le premier hantavirus en Afrique, *Sangassou virus* (SANGV) (Klempa *et al.* 2006). Ce dernier a été découvert chez le rongeur *Hylomyscus simus* près du village de Sangassou en Guinée. SANGV appartient au groupe des hantavirus associés aux rongeurs de la sous-famille des *Murinae* (Klempa *et al.* 2006).

Depuis la découverte de SANGV, douze hantavirus ont été découverts dans plusieurs régions d'Afrique, non seulement chez les rongeurs mais aussi chez les musaraignes et les chauves-souris ; deux de ces hantavirus ont été découverts dans l'Océan Indien (Tableau 1) (Klempa *et al.* 2006, Klempa *et al.* 2007, Kang *et al.* 2011, Meheretu *et al.* 2012, Sumibcay *et al.* 2012, Weiss *et al.* 2012, Gu *et al.* 2013, Witkowski *et al.* 2016, Reynes *et al.* 2014, Filippone *et al.* 2016).

Tableau 1 : Liste des hantavirus découverts dans le continent africain.

Virus	Hôte animal	Nom scientifique	Pays	Références
<i>Sangassou virus</i> (SANGV)	Souris	<i>Hylomyscus simus</i>	Guinée	(Klempa <i>et al.</i> 2006)
<i>Tanganya virus</i> (TGNV)	Musaraigne	<i>Crocidura theresae</i>	Guinée	(Klempa <i>et al.</i> 2007)
<i>Azagny virus</i> (AZGV)	Musaraigne	<i>Crocidura obscurior</i>	Côte d'Ivoire	(Kang <i>et al.</i> 2011)
<i>Tigray virus</i> (TIGV)	Souris	<i>Stenocephalemys albipes</i>	Ethiopie	(Meheretu <i>et al.</i> 2012)
<i>Magboi virus</i> (MGBV)	Chauve-souris	<i>Nycteris hispida</i>	Sierra Leone	(Weiss <i>et al.</i> 2012)
<i>Mouyassué virus</i> (MOUV)	Chauve-souris	<i>Neoromicia nanus</i>	Côte d'Ivoire	(Sumibcay <i>et al.</i> 2012)
<i>Bowé virus</i> (BOWV)	Musaraigne	<i>Crocidura douceti</i>	Sud-ouest de Guinée	(Gu <i>et al.</i> 2013)
<i>Kilimanjaro virus</i> (KILV)	Musaraigne	<i>Myosorex zinki</i>	Tanzanie	Non publié (Genbank : JX193698 - 700)
<i>Uluguru virus</i> (ULUV)	Musaraigne	<i>Myosorex geata</i>	Tanzanie	Non publié (Genbank : JX193695 - 697)
<i>Makokou virus</i> (MAKV)	Chauve-souris	<i>Hipposideros ruber</i>	Gabon	(Witkowski <i>et al.</i> 2016)
<i>Anjozorobe virus</i> *	Rongeur	<i>Rattus rattus, Eliurus majori</i>	Madagascar	(Reynes <i>et al.</i> 2014)
<i>Mayotte virus</i> (MAYOV)*	Rongeur	<i>Rattus rattus</i>	Ile de Mayotte	(Filippone <i>et al.</i> 2016)

* : Hantavirus découverts dans l'Océan Indien.

Déjà avant la découverte chez le réservoir animal, plusieurs études sur la séroprévalence humaine des hantavirus ont été menées dans plusieurs régions du continent africain. En 1989, une étude sur la prévalence en anticorps contre les virus des fièvres hémorragiques a été faite sur une population représentative de 6 pays de l'Afrique centrale. Une séroprévalence de 6,15% (n=312/5070) de *Hantaan virus* a été constatée (Gonzalez *et al.* 1989).

En 1993, une étude sérologique sur les hantavirus a montré une prévalence de 3,3% chez l'homme (n=7/212) à Djibouti (Rodier *et al.* 1993).

En 2000, une étude sur la prévalence des anticorps humains contre les différents virus des fièvres hémorragiques a été faite en République centrafricaine. Une séroprévalence humaine des hantavirus de 2% (n=36/1762) a été montrée au cours de cette étude (Nakounne *et al.* 2000).

Après la découverte de SANGV, une étude effectuée en Afrique de l'Ouest (Guinée) a montré une séroprévalence humaine de 1,2% (n=8/649) (Klempa *et al.* 2010). Au cours de la même étude, dans le village de Sangassou en Guinée, des anticorps dirigés contre les hantavirus ont été détectés chez 3 sur 68 (4,4%) individus avec une fièvre dont l'étiologie est inconnue. En 2013, d'après une autre étude séro-épidémiologique menée en Haute-Guinée, la séroprévalence humaine des hantavirus était de 1,2% (n=3/253) (Klempa *et al.* 2013).

En 2014, une autre étude en Afrique du Sud a montré 1% (n=14/1442) de séroprévalence humaine des hantavirus (Witkowski *et al.* 2014).

En 2015, dans les forêts tropicales de la Côte d'Ivoire et de la République démocratique de Congo, une étude a montré 3,9% (n=27/687) de séroprévalence humaine en Côte d'Ivoire et 2,4% (n=7/295) en République démocratique de Congo (Witkowski *et al.* 2015).

Concernant Madagascar, déjà en 1986, une étude sur les hantavirus a permis de détecter la présence des anticorps dirigés contre les hantavirus dans les sérums des rongeurs (*Rattus rattus* et *Rattus norvegicus* ; 21,96%, n=96/437) et dans les sérums des individus qui ont capturé ces rongeurs (38,8%, n=7/18). Cette étude a montré que des anticorps dirigés contre les hantavirus existent à Madagascar (Rollin *et al.* 1985).

Avant 2014, seules les preuves sérologiques de Rollin et ses collaborateurs (Rollin *et al.* 1985) ont indiqué la circulation des hantavirus, chez les rongeurs et chez l'homme, à Madagascar. Depuis, une autre étude sur les hantavirus a été menée par Reynes et ses collaborateurs (Reynes *et al.* 2014) à l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM). Une nouvelle variante du *Thailand virus* (THAIV) a été alors détectée (Figure 3, p. 6) par des analyses moléculaires chez les rongeurs (*Rattus rattus* et *Eliurus majori*). Ce nouveau virus a été caractérisé après séquençage du génome et a été

appelé *Anjzorobe virus* du nom de l'endroit où les rongeurs dans lesquels il a été détecté, ont été capturés (Reynes *et al.* 2014).

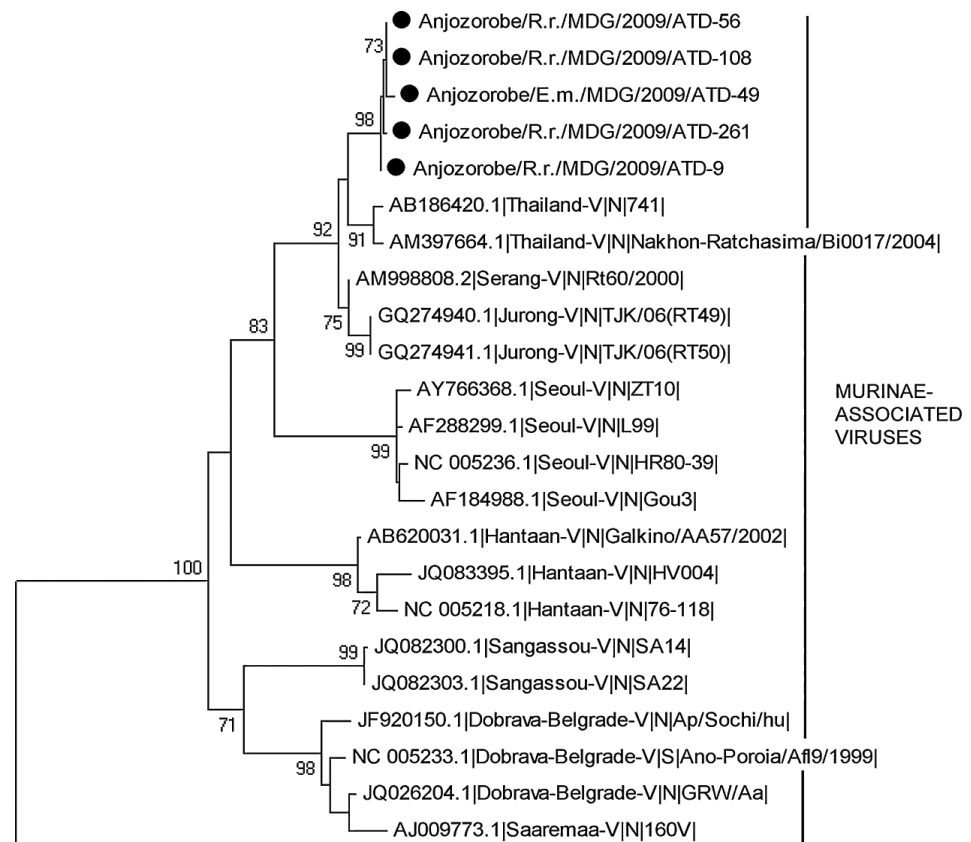


Figure 3. Arbre phylogénétique des hantavirus associés aux rongeurs de la sous-famille des *Murinae* (Reynes *et al.* 2014).

THAIV est l'un des agents responsables de la FHSR en Asie. Des études sérologiques ont démontré que les sérums des patients atteints de la FHSR, séronégatifs en leptospirose, contenaient des anticorps dirigés contre THAIV ou THAI-like virus (virus proche de THAIV) (Pattamadilok *et al.* 2006, Gamage *et al.* 2011). Le virus Anjzorobe étant une variante de THAIV, la question se pose alors s'il est associé à FHSR à Madagascar.

Les études antérieures sur les hantavirus à Madagascar ont été toutes restreintes à quelques régions. L'étude de Rollin et ses collaborateurs (Rollin *et al.* 1985) a été principalement effectuée à partir des rongeurs d'Antananarivo, et celle de Reynes et ses collaborateurs (Reynes *et al.* 2014) s'est focalisée dans la forêt d'Angavo dans le district d'Anjzorobe.

Récemment dans l'Océan Indien et plus précisément dans les îles françaises, Mayotte et La Réunion, une recherche sur les pathogènes circulants chez le rongeur (*Rattus rattus*) a mis en évidence la présence des hantavirus dans l'île de Mayotte. Ce dernier, appelé *Mayotte virus* (MAYOV) fait partie, comme *Anjzorobe virus*, du clade de THAIV d'Asie du Sud-Est (Filippone *et al.* 2016).

Le but de cette étude a été d'évaluer la séroprévalence des hantavirus à Madagascar dans une population adulte âgée de 18 ans et plus (homme et femme) sur 28 sites réparties dans toutes les régions de Madagascar. Les hantavirus sont transmis principalement par les rongeurs. *Anjzorobe virus*, l'hantavirus découvert à Madagascar a été découvert chez *Rattus rattus* et *Eliurus majori*. Afin d'étudier le risque zoonotique de l'infection liée aux hantavirus, la population a aussi été étudiée en considérant l'exposition aux rongeurs ainsi que l'activité professionnelle.

Notre étude a été réalisée dans le cadre d'un projet mis en place à l'IPM pour l'investigation des zoonoses à Madagascar. Le projet, intitulé : ZORA (ZOonoses, Rongeurs et Arboviroses) avait pour but de déterminer la circulation des pathogènes (arboviroses, hépatites, peste, leptospirose, rickettsioses), d'établir la séroprévalence de ces pathogènes et de déterminer la répartition géographique ainsi que les facteurs de risques associés à l'infection par ces pathogènes à Madagascar.

II- GENERALITES

II-1- SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE ET HISTORIQUE SUR LES HANTAVIRUS

Les rongeurs sont des petits Mammifères pouvant véhiculer plusieurs agents infectieux qui sont pathogènes pour l'être humain comme la leptospirose, la peste, les arenaviroses et les hantaviroses.

Les hantavirus sont des virus zoonotiques émergents. Ils ont pour hôtes naturels des petits Mammifères tels que les rongeurs, les insectivores (musaraignes, taupes) mais aussi les chauves-souris (Jonsson *et al.* 2010, Arai *et al.* 2012, Weiss *et al.* 2012, Arai *et al.* 2013). Contrairement à l'infection des hôtes réservoirs qui est chronique et asymptomatique, les hantavirus peuvent être pathogènes pour l'homme.

L'infection par les hantavirus était déjà connue avant de connaître le virus (Mccaughey and Hart 2000). Des cas ont été rapportés, notamment une « fièvre de Tula » qui aurait touché la Russie en 1930 (Heyman *et al.* 2009). En Europe, une forme modérée de la FHSR, appelée « Néphropathie Epidémique » (NE), a été décrite en 1934 (Lee *et al.* 2014).

C'est lors de la guerre de Corée que la maladie a attiré l'attention des chercheurs occidentaux. En effet, de 1950 à 1953, plus de 3200 soldats de l'ONU ont été victimes d'une « fièvre hémorragique de Corée » (Smadel 1953, Gajdusek 1962). Cette maladie d'apparition aiguë était caractérisée par de la fièvre, des maux de tête intenses, une insuffisance rénale, des manifestations hémorragiques et induisait une létalité d'environ 10 %. Les premières tentatives d'isolement du virus en culture cellulaire ont été sans résultat et il a fallu attendre 1976 pour que Lee mette en évidence l'agent étiologique et confirme le rôle des rongeurs à l'origine de l'infection zoonotique : les antigènes (Ag) viraux ont été détectés par immunofluorescence sur des coupes de poumon du rongeur *Apodemus agrarius* en utilisant comme antisérum le sérum de patient convalescent (Lee *et al.* 1978). Le virus a été appelé *Hantaan virus* (HTNV) du nom de la rivière séparant les deux Corées, et il est devenu le prototype du genre *Hantavirus* de la famille des *Bunyaviridae*.

En parallèle, *Puumala virus* (PUUV), le responsable de la NE dans les pays scandinaves a été isolé chez le campagnol roussâtre *Myodes glareolus* (Brummer-Korvenkontio *et al.* 1980). D'autres agents pathogènes responsables de fièvres

hémorragiques ont ensuite été rapidement identifiés, comme *Seoul virus* (SEOV) et *Dobrava-Belgrade virus* (DOBV), trouvés respectivement chez *Rattus norvegicus* et *Apodemus flavicollis* (Lee *et al.* 2014). L'ensemble des maladies causées par ces virus retrouvés sur les continents européen et asiatique ont été regroupées sous le nom de fièvres hémorragiques avec syndrome rénal (Figure 2, p. 3).

L'intérêt pour les hantavirus a progressé en 1993 quand une épidémie de détresse respiratoire a fait ravage dans la région de « Four Corners » aux Etats-Unis, avec un taux de létalité élevée (plus de plus de 40 %). Les premières recherches ont révélé que les anticorps des patients affectés ont réagi avec des antigènes d'hantavirus, et un nouvel hantavirus a été identifié chez la souris *Peromyscus maniculatus* (Zaki *et al.* 1995). Ce virus a été appelé *Sin Nombre virus* (SNV), et fait partie des hantavirus responsables de syndromes cardio-pulmonaires (Figure 2, p. 3).

Il est intéressant de noter que HTNV n'était pas le premier hantavirus à avoir été découvert. En 1964, *Thottapalayam virus* avait été isolé à partir d'une musaraigne capturée en Inde. Le virus ne présentait aucune pathogénicité pour l'homme et c'est seulement en 1989 qu'il a été classé dans le genre *Hantavirus*, suite à l'étude de sa morphologie et de son organisation génomique (Zhang 2014).

Ce n'est que plusieurs années plus tard, en 2006, que le premier hantavirus en Afrique a été trouvé chez le rongeur *Hylomyscus simus*, et a été appelé *Sangassou virus* (SANGV). Avant la découverte de SANGV, plusieurs études sur les hantavirus ont déjà été entreprises en Afrique. A présent, le nombre actuel des hantavirus trouvés en Afrique est de douze (Klempa *et al.* 2006, Klempa *et al.* 2007, Meheretu *et al.* 2012, Sumibcay *et al.* 2012, Weiss *et al.* 2012, Gu *et al.* 2013, Witkowski *et al.* 2016, Reynes *et al.* 2014, Filippone *et al.* 2016).

La gravité des maladies associées aux hantavirus, combinée à l'absence de vaccin et de traitement antiviral ainsi qu'à leur distribution dans le monde entier, constituent un problème majeur de santé publique. Les hantavirus étant des virus à ARN avec un génome segmenté, l'émergence d'éventuels réassortants génétiques peut avoir lieu.

II-2- TRANSMISSION A L'HOMME

Contrairement aux autres genres de la famille des *Bunyaviridae* (*Phlebovirus*, *Tospovirus*, *Orthobunyavirus*, *Nairovirus*), les hantavirus ne sont pas transmis à l'homme par des vecteurs arthropodes. La transmission à l'homme se produit par inhalation d'un aérosol provenant d'urines et des excréments de rongeurs infectés (Watson *et al.* 2014).

ANDV constitue une exception puisque de rares cas de transmission interhumaine ont été rapportés (Figure 2, p. 3). Lors d'une épidémie en Argentine en 1996, 20 cas de HSCP ont été étudiés et les enquêtes épidémiologiques ont révélé que certaines infections seraient dues à des contacts rapprochés entre les malades (Wells *et al.* 1997, Martinez *et al.* 2005). D'autres cas de transmission interhumaine ont été décrits pour ANDV, et l'exposition à des fluides contaminés (salive, urine) pourrait être une cause d'infection (Watson *et al.* 2014).

III- MATERIELS ET METHODES

III-1- POPULATION D'ETUDE

Avec l'autorisation du Comité d'Éthique National (Autorisation n° 066 - MSANP/CE du 26 Juillet 2011), des individus adultes âgés de 18 ans et plus (hommes et femmes, sexe ratio : 1,019) ont été recrutés, entre 2011 et 2013, dans les 28 sites sur les 31 du réseau sentinelle mis en place par l'IPM et du Ministère de la Santé dans le cadre de la surveillance des fièvres (à l'exception de ceux de Maintirano, Maroantsetra et Sainte-Marie) répartis dans tout Madagascar (Figure 4, p. 12) ; le nombre total des individus recrutés est de 1751, avec 60 à 90 individus choisis au hasard par site (Tableau 2). Les sérums de ces individus ont été prélevés. Les sérums ont été conservés à - 80 °C quand ils sont arrivés au laboratoire.

Tableau 2 : Liste des sites d'études où les individus ont été recrutés dans le cadre du projet ZORA.

PROVINCE	RÉGION	N°	ZONE	Nb d'individu
ANTANANARIVO	ANALAMANGA	1	ANJOZOROBE	60
	ANALAMANGA	2	ANTANANARIVO	60
	VAKINANKARATRA	3	ANTSIRABE	61
	BONGOLAVA	4	TSIROANIMANDIDY	62
ANTSIRANANA	DIANA	5	ANTSIRANANA	60
	DIANA	6	NOSY BE	60
	SAVA	7	SAMBAVA	60
FIANARANTSOA	AMORON'I MANIA	8	AMBOSITRA	60
	ATSIMO ATSINANANA	9	FARAFANGANA	63
	HAUTE MATSIATRA	10	FIANARANTSOA	60
	IHOROMBE	11	IHOSY	91
	VATOVAVY FITOVINANY	12	MANANJARY	63
MAHAJANGA	BOENY	13	AMBATO BOENY	60
	SOFIA	14	ANTSOHIHY	60
	BETSIBOKA	15	MAEVATANANA	60
	BOENY	16	MAHAJANGA	60
	SOFIA	17	MANDRITSARA	63
TOAMASINA	ALAOTRA MANGORO	18	AMBATONDRAZAKA	65
	ALAOTRA MANGORO	19	MORAMANGA	61
	ATSINANANA	20	TOAMASINA	60
TOLIARY	ANDROY	21	AMBOVOMBE	60
	MENABE	22	BELO SUR TSIRIBIHINA	60
	ATSIMO ANDREFANA	23	EJEDA	66
	MENABE	24	MIANDRIVAZO	65
	ATSIMO ANDREFANA	25	MOROMBE	67
	MENABE	26	MORONDAVA	60
	ANOSY	27	TAOLAGNARO	62
	ATSIMO ANDREFANA	28	TOLIARY	62

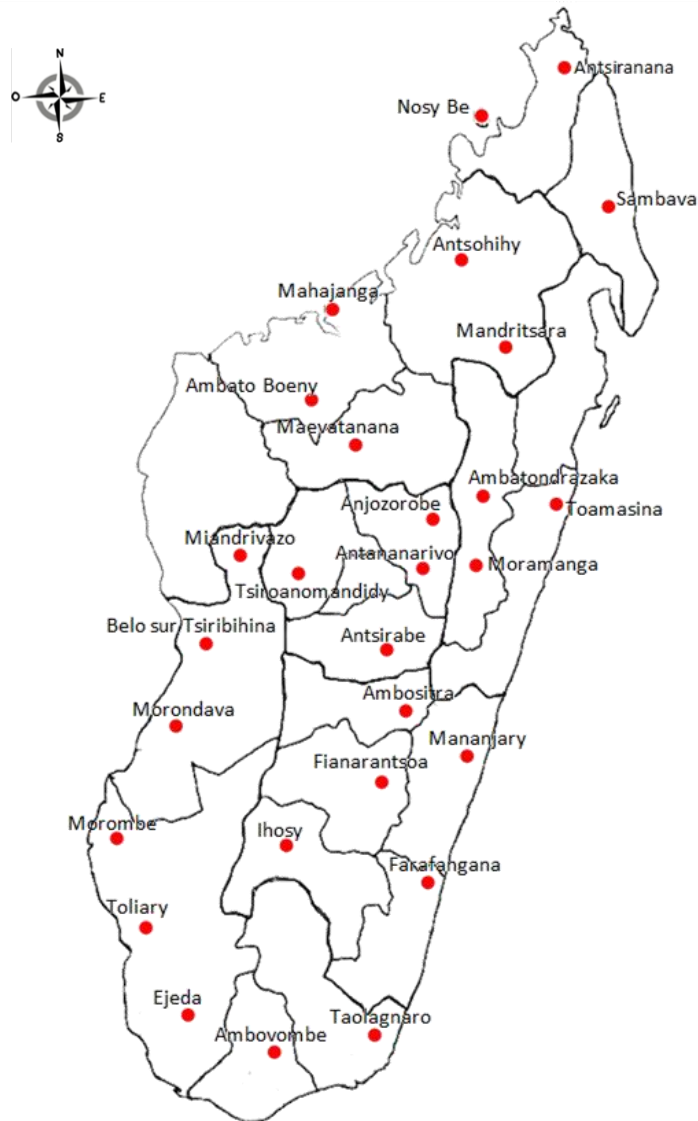


Figure 4 : Répartition géographique des 28 sites où les individus ont été recrutés.

Les individus recrutés dans cette étude ont été choisis au hasard et étaient des personnes saines ; chaque individu a été questionné sur son activité professionnelle et son éventuelle exposition aux rats.

Dans le cadre de notre étude, les sérums ont été utilisés pour la recherche des anticorps IgG dirigés contre les hantavirus par l'intermédiaire de la technique sérologique Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA).

III-2- MATERIEL UTILISE POUR LE TEST ELISA

Dans cette étude, le kit commercial « DOBRAVA-HANTAAN IgG Enzyme ImmunoAssay » (Reagentia, Finlande) a été utilisé pour les tests ELISA.

III-3- ANALYSE SEROLOGIQUE

ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) INDIRECT

Le test sérologique ELISA est une technique de dosage immuno-enzymatique principalement utilisée en immunologie afin de détecter et/ou doser la présence des anticorps ou des antigènes (Ag) dans un échantillon. Parmi les différents types de test ELISA, le type **indirect** est le plus adapté pour atteindre l'objectif de notre étude.

PRINCIPE

L'ELISA indirect consiste à détecter et/ou doser des anticorps spécifiques dans un échantillon (sérum humain). Les antigènes correspondant à des protéines recombinantes du virus HTNV sont fixés dans les puits d'une plaque de microtitration. Les anticorps IgG dirigés contre les hantavirus du même groupe vont se lier spécifiquement à ces antigènes. Les anticorps IgG liés aux antigènes seront détectés par addition des anticorps secondaires anti-IgG humains couplés à l'enzyme « Horseradish peroxidase (HRP) » (conjugué). Le conjugué contient une enzyme de type peroxydase, permettant la dégradation des peroxydes.

Une coloration est obtenue après ajout d'un substrat (TMB = 3,3',5,5'-Tetramethyl benzidine) spécifique à l'enzyme. L'oxydation du TMB par la peroxydase se traduit par un changement de la coloration du composé en bleu.

L'ajout de la solution STOP va arrêter la réaction enzymatique entre la peroxydase et le substrat TMB, et entraîner le virage de la coloration bleue en jaune. L'intensité de la coloration jaune est proportionnelle à la densité optique (DO) et à la concentration des anticorps à doser. La DO est mesurée à la longueur d'ondes 450 nm.

MODE OPÉRATOIRE

Préparation de la manipulation

Les sérums conservés à - 80 °C ont été transférés à + 4 °C pour qu'ils puissent se décongeler. Les tests se déroulaient dans des plaques de microtitration à 96 puits. À chaque manipulation correspondait un plan de la plaque de microtitration utilisée, c'est-à-dire un tableau qui indiquait les échantillons à tester dans chaque puits pour faciliter le traitement des résultats.

Les manipulations se déroulaient selon les indications du kit commercial.

Préparation des échantillons biologiques

Les sérums à tester ont été dilués à **1:201**. **2,5 µl** de sérum ont été dilués dans **500 µl** de tampon de dilution.

Dilution des contrôles

Chaque contrôle fourni par le kit (positif et négatif), sous forme de poudre, a été dissous dans **1,3 ml** du tampon de dilution, puis agité jusqu'à dissolution totale.

Dilution du tampon de lavage

Le tampon de lavage concentré a été dilué à **1:10**. **50 ml** du tampon de lavage concentré ont été dilués dans **450 ml** d'eau distillée.

Dilution du conjugué

Le conjugué a été dilué à **1:10**. **1,2 ml** du conjugué ont été dilués dans **10,8 ml** de tampon de dilution.

Dépôt des sérums à tester et des contrôles

Avant le dépôt des échantillons et des contrôles, la plaque a été lavée une fois au moyen d'un automate avec le tampon de lavage dilué.

Les sérums et les contrôles dilués (**100 µl** chacun) ont été déposés dans les puits selon le plan de plaque, les contrôles ayant été déposés en duplicat. La plaque de microtitration a été recouverte d'un papier aluminium pour la protéger de la lumière ; ensuite, elle a été déposée sur un agitateur orbital à **450 rpm** (rotation par minute), puis laissée incuber pendant une heure à température ambiante.

Dépôt du conjugué

Après incubation, la plaque a été lavée quatre fois afin d'éliminer les anticorps qui n'ont pas été complexés par les antigènes.

La plaque a été séchée, puis **100 µl** du conjugué ont été ajoutés dans chaque puits. La plaque a été recouverte de papier aluminium et laissée incuber sur un agitateur orbital à 450 rpm pendant une heure à température ambiante.

Révélation

Après la deuxième incubation, la plaque a été lavée cinq fois afin d'enlever les anticorps secondaires non fixés, puis elle a été séchée. Ensuite, **100 µl** du substrat TMB ont été ajoutés dans chaque puit, puis la plaque a été recouverte de papier aluminium et laissée incuber pendant 30 minutes dans le noir.

Après cette dernière incubation, **100 µl** d'acide sulfurique (solution STOP) ont été ajoutés dans chaque puits. La plaque a été incubée sur l'agitateur orbital à **700rpm** pendant 15 secondes. La plaque de microtitration a été recouverte de papier aluminium jusqu'à la lecture de la DO car le TMB est photosensible.

Mesure de l'absorbance ou densité optique (DO)

L'absorbance (ou DO) à 450 nm doit être lue dans les 10 minutes qui suivent l'ajout de la solution STOP. La lecture de la DO a été menée en parallèle sur deux lecteurs de plaques.

Validation des résultats

Après la lecture de l'absorbance, les valeurs de DO obtenues pour chaque échantillon et celles des contrôles (positive et négative) ont été analysées. Le seuil de positivité (valeur Cut-off), c'est à dire la valeur seuil qui détermine la positivité ou la négativité d'un échantillon, a été calculé selon les indications du kit.

$$\mathbf{R = (DO_{\text{échantillon}}/DO_{\text{contrôle positif}}) \times K}$$

R : résultat

DO_{échantillon} : valeur de l'absorbance d'un échantillon

DO_{contrôle positif} : valeur de l'absorbance du contrôle positif

K : valeur indiquée pour chaque kit (fiche de contrôle)

Les résultats sont interprétés comme suit :

NÉGATIF : $R < 0,8$

DOUTEUX : $0,8 \leq R \leq 1,2$

POSITIF : $R > 1,2$

III-4- ANALYSE MOLECULAIRE

Dans cette étude, l'analyse moléculaire a été réalisée sur :

- les sérums des individus trouvés positifs et douteux en ELISA ;
- les sérums de 30 individus (choisis au hasard et représentatifs des sites répartis dans les 6 provinces) trouvés négatifs en ELISA ;
- les sérums des individus les plus exposés aux rats (les individus qui ont à la fois touché les rats vivants, tué les rats et touché les rats morts).

L'analyse moléculaire comportait l'extraction du génome viral et l'amplification des gènes par la technique PCR (Polymerase Chain Reaction). Ces différentes manipulations ont été effectuées dans des pièces séparées pour éviter les contaminations.

III-4-1- EXTRACTION DU GÉNOME VIRAL

PRINCIPE

L'extraction du génome viral (dans le cas des hantavirus, virus à ARN) à partir des sérums humains repose sur une première étape de lyse, suivie de la purification des acides nucléiques par l'intermédiaire d'un système de chromatographie sur colonne-filtre disponible sous forme de Kit commercial « NucleoSpin® Dx Virus » (Macherey-Nagel, Germany).

MODE OPÉRATOIRE

L'extraction du génome viral a été réalisée en 5 étapes :

Première étape : phase de lyse

Le tampon de lyse (**600 µl**) RAV1 contenant du « carrier RNA » (pour améliorer la fixation des ARN sur la colonne-filtre du kit et pour augmenter le rendement en ARN) a été ajouté à raison de **150 µl** de sérum par tube de 1,5 ml. La solution a été mélangée avec la pipette, puis le mélange a été brièvement agité au vortex. Ensuite, le mélange a été porté au bain-marie à une température de 70 °C pendant 5 minutes pour détruire les capsides et l'enveloppe virale. Après l'incubation, le mélange a été brièvement centrifugé (200 rpm , 3 sec : short spin,).

Deuxième étape : phase de précipitation

De l'éthanol absolu (**600 µl**) a été ajouté dans le lysat afin de précipiter les ARN viraux, puis le tout a été agité au vortex pendant 10 à 15 secondes.

Troisième étape : phase de fixation

Le lysat (**700 µl**) a été versé dans une colonne constituée d'un tube collecteur et d'une colonne à filtre. Après une centrifugation à 8000 xg pendant 1 min, l'ARN était fixé sur la colonne, tandis que le liquide ayant traversé la colonne a été récupéré dans le tube collecteur et jeté. Ce processus a été effectué 2 fois de suite.

Quatrième étape : phase de lavage

Cette phase a consisté à éliminer les contaminants (organites et débris cellulaires). La colonne a été lavée trois fois de suite avec 2 tampons de lavage différents (RAW et RAV3).

Le premier lavage a été effectué avec **500 µl** du tampon de lavage RAW, puis l'ensemble a été soumis à une centrifugation à 8000 xg pendant une minute pour éliminer les contaminants et les potentiels inhibiteurs, tels que les alcools et le « carrier RNA », des réactions en aval de l'extraction, comme la PCR.

Le second et le troisième lavage ont été entrepris avec le tampon de lavage RAV3 : **600 µl** à 8000 xg pendant 1 min et **200 µl** à 11 000 xg pendant 3 min, respectivement. La vitesse de centrifugation plus importante pour le dernier lavage a permis d'éliminer le tampon de lavage RAV3 qui est un potentiel inhibiteur de la PCR.

Cinquième étape : phase d'élution

Du H₂O dépourvu de RNase (**50 µl**), préalablement chauffé à 70 °C, a été ajouté dans la colonne à filtre, sans toucher la paroi ni le filtre. La colonne a été ensuite incubée pendant 1 à 2 min, puis une centrifugation à 11 000 xg pendant 1 min est réalisée. L'extrait d'ARN a été collecté dans un tube de 1,5 ml. L'extrait d'ARN a été conservé à une température de -80 °C en attendant son utilisation.

III-4-2- REVERSE TRANSCRIPTASE – POLYMERASE CHAIN REACTION NICHEE

PRINCIPE

La transcription inverse permet de transcrire *in vitro* un extrait d'ARN viral en ADN complémentaire (ADNc) en utilisant l'enzyme transcriptase inverse (RT) qui est une ADN polymérase ARN dépendante.

Ensuite, la réaction PCR permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique du génome afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter. Les gènes sont amplifiés de façon exponentielle par utilisation de couple d'amorces délimitant une séquence d'intérêt : amorce sens (5'→3') et amorce anti-sens (3'→5'). Pour cela, une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle :

- Dénaturation de l'ADN : 92 - 95 °C.
- Hybridation des amorces sur les deux brins d'ADN. Elle dépend de la température melting (T_m) du couple d'amorces : 45 – 60 °C.
- Élongation ou la synthèse du brin complémentaire par ajout des bases nucléotidiques sur chaque brin d'ADN : 70 – 72 °C.

Au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant.

La transcription inverse et la PCR ont été réalisées en une seule étape (one-step RT-PCR).

La PCR nichée permet l'amplification d'un produit issu d'une première PCR avec une autre couple d'amorces. Ces dernières s'hybrident dans une partie à l'intérieur de la séquence amplifiée auparavant afin d'augmenter la sensibilité.

Dans cette étude, des amorces dégénérées ont été utilisées pour détecter une partie codante du segment L des hantavirus (**HAN-L-F1** et **HAN-L-R1** : pour la première PCR ; **HAN-L-F2** : et **HAN-L-R2** : pour la PCR nichée) ; ces amorces été utilisés pour détecter le premier hantavirus en Afrique (Klempa *et al.* 2006).

Pour la première amplification, le RT-PCR, la taille moléculaire attendue est de **452 pb** et pour la deuxième amplification, la PCR nichée, la taille attendue est de **390 pb**.

MODE OPÉRATOIRE

Le mélange réactionnel (mix) est préparé selon le Tableau 3. Son volume est calculé en tenant compte du nombre d'échantillons à analyser et des 2 témoins, positif et négatif (Tableau 3).

Tableau 3 : Préparations des mélanges réactionnels pour l'analyse moléculaire : RT-PCR, PCR nichée.

RT-PCR		PCR NICHEE	
Réactif	Volume	Réactif	Volume
Eau (Nuclease free)	25 µl	Eau (Nuclease free)	28,75 µl
Tampon Taq 5X	10 µl	tampon Taq 5X	10 µl
MgCl ₂ (25mM)	3 µl	MgCl ₂ (25mM)	3 µl
dNTP (10mM)	1 µl	dNTP (10mM)	1 µl
HAN-L-F1 (10µM)	2,5 µl	HAN-L-F2 (10µM)	2,5 µl
HAN-L-R1 (10µM)	2,5 µl	HAN-L-R2 (10µM)	2,5 µl
RNAsine (40U/µl)	0,5 µl	Taq polymerase	0,25 µl
RT-AMV (10U/µl)	0,25 µl	Total	48 µl
Taq polymerase	0,25 µl		
Total	45 µl		

L'extrait d'ARN de volume **5 µl** a été ajouté dans le mélange réactionnel (volume final = 50 µl). L'amplification génique se fait dans un thermocycleur (BIOMETRA) suivant un programme préinséré dans la machine (Tableau 4).

Tableau 4. Profil thermique de la RT-PCR *Hantavirus* (Klempa *et al.* 2006).

Étape	Température	Temps
Transcription inverse	42°C	60 min
Activation de la polymérase	95°C	5 min
35 cycles de PCR	95°C	45 sec
	42°C	45 sec
	72°C	60 sec
Élongation et conservation	72°C	10 min
	4°C	10 min

Pour la deuxième PCR (PCR nichée), **2 µl** de l'amplicon de la première PCR ont été ajoutés dans le mélange réactionnel (volume final = 50 µl). Le programme de l'amplification est détaillé dans le Tableau 5.

Tableau 5. Profil thermique de la PCR nichée *Hantavirus* (Klempa *et al.* 2006).

Étape	Température	Temps
Activation de la polymérase	95°C	5 min
30 cycles de PCR	95°C	45 sec
	42°C	45 sec
	72°C	60 sec
Élongation et conservation	72°C	10 min
	4°C	10 min

III-4-3- ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE

PRINCIPE

La technique de l'électrophorèse sur gel d'agarose est utilisée pour séparer les acides nucléiques selon leur poids moléculaire. La séparation des macromolécules dépend de deux variables : la charge et la masse. Les molécules repoussées d'un côté par le courant électrique produit par une électrode sont attirées simultanément par le courant produit par l'autre électrode. Les molécules d'ADN devraient être du côté de la cathode car l'ADN est chargé négativement dans le milieu basique du tampon de migration, donc les molécules d'ADN vont migrer vers l'anode puisqu'ils seront repoussés par la charge de la cathode. La variation de tension électrique est inversement proportionnelle à la taille des fragments d'ADN : la valeur maximale de 5 V/cm est utilisée pour des fragments de moins de 1 000 pb. La durée de migration varie en fonction de la taille des fragments d'ADN à séparer. La force de friction des matériaux composant du gel joue le rôle de « tamis moléculaire » et sépare les molécules en fonction de leur taille. Durant l'électrophorèse, les macromolécules sont poussées à travers les pores. La concentration du gel d'agarose dépend des tailles des fragments d'ADN à séparer. La vitesse de migration à travers le champ électrique dépend de leur poids moléculaire : plus la molécule est de petite taille, plus sa migration est rapide. L'agarose convient aux fragments d'ADN de taille comprise entre 100 pb et 60 000 pb.

MODE OPÉRATOIRE

Préparation du gel d'agarose

La quantité appropriée d'agarose a été pesée sur une balance de précision. Dans cette étude le gel utilisé est à 2 % : 2 g d'agarose ont été dissous dans **100 ml** de Tris acétate EDTA 0,5X (= 20mM Tris-acétate, 0,5mM EDTA) (TAE).

Le mélange a été chauffé dans un four à micro-ondes jusqu'à dissolution complète de la poudre d'agarose. Le SYBR® Safe (Invitrogen™) (15%), un agent intercalant de l'ADN qui émet une fluorescence mauve quand il est excité à une longueur d'ondes entre 254 et 365 nm dans l'ultra-violet (UV), a été ajouté quand la température du gel était d'environ 60 °C. Cette fluorescence permet la révélation des fragments d'ADN sur le gel.

Le gel d'agarose fondu a été versé dans un moule avec les peignes appropriés pour créer des puits. Ensuite, le gel a été laissé à température ambiante pour permettre sa solidification.

Dépôt et migration des produits de la PCR nichée

Les peignes ont été retirés pour former les puits. Le gel a été placé avec son support dans une cuve électrophorétique contenant le tampon de migration qui est le TAE 0,5X, puis **6 µl** de chaque échantillon d'ADN ont été chargés dans les puits du gel. Le marqueur de poids moléculaire (**7 µl**) utilisé est le « DNA ladder 100 bp » (Invitrogen™) qui va servir de référence pour les échantillons analysés.

Les électrodes du couvercle de la cuve électrophorétique ont été branchées au générateur. Le gel a été soumis à 1 à 5 V/cm de tension électrique.

Selon le nombre des échantillons à déposer, un grand ou petit gel a été utilisé, les paramètres étant respectivement :

- 180 V de tension électrique et 200 mA d'intensité, pendant 45 min.
- 120 V de tension électrique et 150 mA d'intensité, pendant 30 min.

Visualisation des bandes après migration

Le gel d'agarose a été placé sous lumière UV puis photographié dans un appareil appelé « gel scan » afin de visualiser les différentes bandes. Les échantillons qui montrent des bandes de taille similaire à la taille attendue sont considérés comme positifs et sont par la suite soumis au séquençage ($\pm 45 \mu\text{l}$ d'échantillons). La réaction de RT-PCR est considérée valide seulement si le témoin positif et le témoin négatif sont confirmés.

IV- RÉSULTATS

IV-1- ANALYSE DESCRIPTIVE DE LA POPULATION D'ETUDE

La présente étude a été faite sur 1751 individus recrutés dans 28 sites d'étude correspondant à des centres de santé du réseau sentinelle à Madagascar (IPM et Ministère de la Santé) (Figure 4, p. 12 ; Tableau 2). Le sexe ratio de la population est égal à 1,019 (H/F) avec 884 hommes et 867 femmes. Les individus recrutés sont des adultes de 18 à 99 ans (âge moyen de 37 ans) (Figure 5).

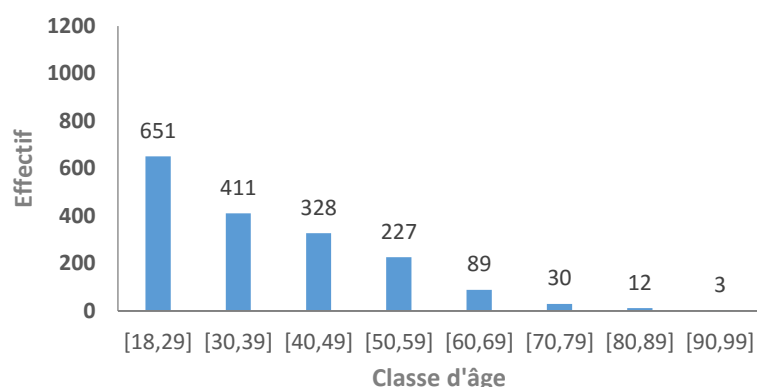


Figure 5 : Distribution de la population selon la classe d'âge avec un intervalle de 10 ans.

Les individus ont été interrogés par rapport aux risques d'infections aux hantavirus, en particulier en tenant compte de l'activité professionnelle et de l'exposition aux rats. Compte tenu de leur grande variété, les activités recensées au cours de l'enquête ont été groupées de façon arbitraire en 8 catégories (Figure 6).

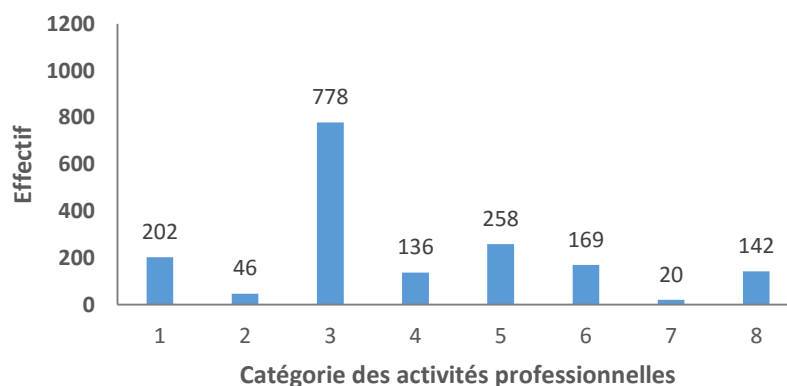


Figure 6 : Distribution de la population selon l'activité professionnelle.

(1 : Administratif, enseignant/étudiant ; 2 : Retraité, sans activité ; 3 : Agriculteur, Gardien/éleveur d'animaux ; 4 : Commerçant ; 5 : Femme au foyer/ service ménage ; 6 : Artisan ; 7 : Agent de santé/social ; 8 : Autres (ex : coiffeuse, chauffeur, ...))

À chaque individu a été attribué un score zoonotique selon l'exposition aux rats. Un score « Bas » a été attribué aux individus qui n'ont eu aucun contact avec les rats. Un score « Moyen » a été attribué aux individus qui ont vu ou entendu les rats dans leur maison ou dans les environs de leur maison. Un score « Haut » a été attribué aux individus qui ont eu des contacts avec les rats ; ce sont des personnes qui ont, soit touché des rats vivants ou des rats morts, soit tué des rats (Figure 7).

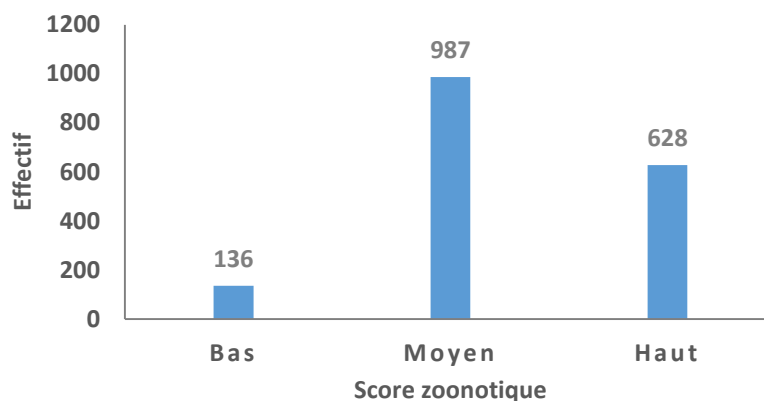


Figure 7 : Distribution de la population selon l'exposition aux rats.

IV-2- ANALYSE SEROLOGIQUE

Les sérums provenant des 1751 individus recrutés ont été analysés par la technique ELISA pour tester la présence des anticorps IgG contre les hantavirus. D'après un premier criblage, 31 sérums ont été positifs, 31 douteux et 1689 négatifs (Figure 8, p. 24).

Les 62 sérums trouvés positifs et douteux ont été analysés en ELISA une deuxième fois en duplicat (Figure 8, p. 24).

Les échantillons positifs issus de la deuxième analyse ont été considérés comme vrais positifs. En conclusion, le pourcentage des individus séropositifs aux hantavirus est de 1,71% ($n=30/1751$) (Figure 8, p. 24).

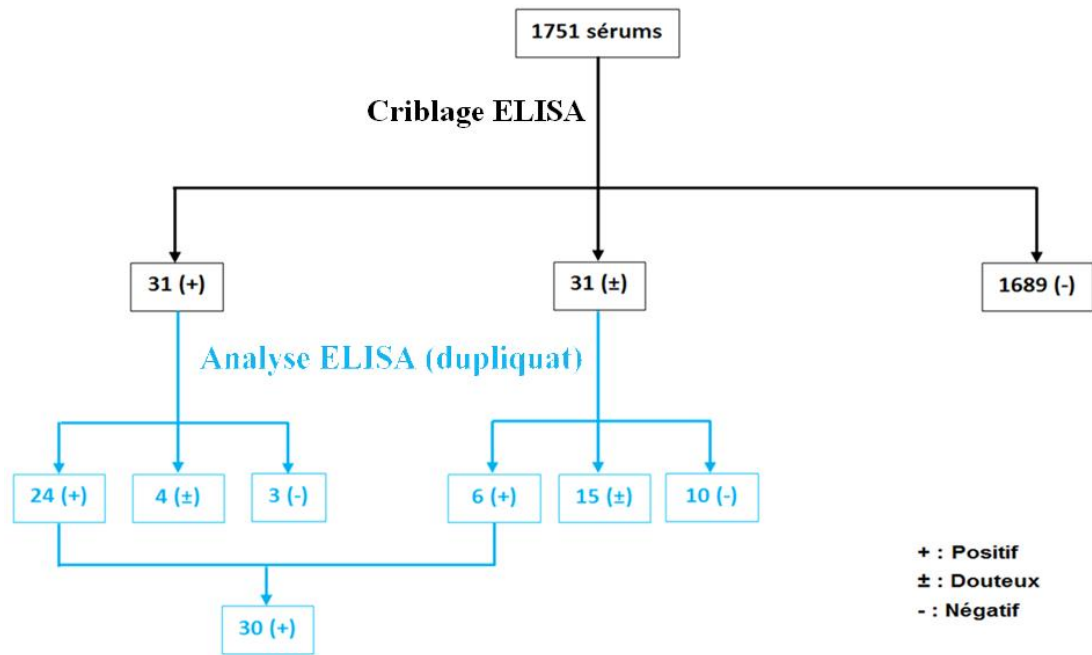


Figure 8 : Récapitulatif des analyses ELISA pour la détection des anticorps IgG contre les hantavirus.

Ces individus séropositifs proviennent de 18 sur les 28 sites d'études (Figure 9).

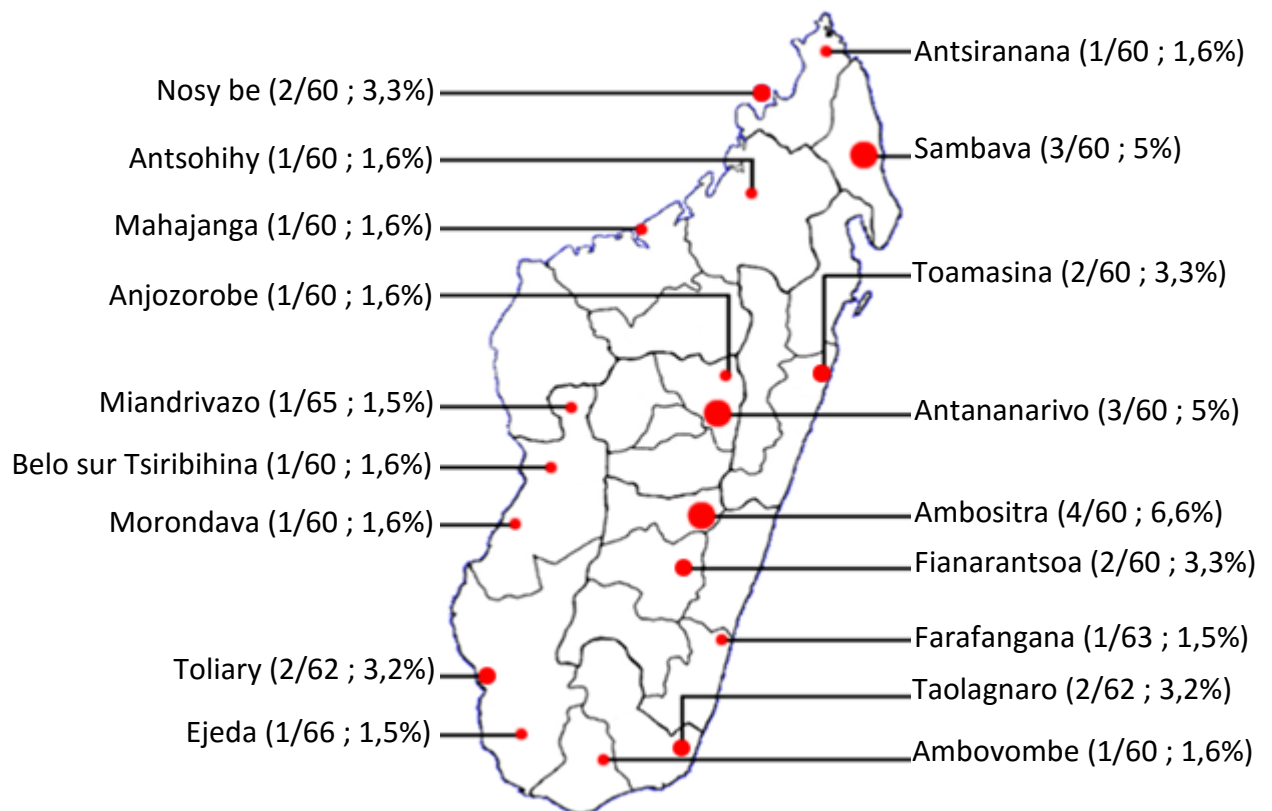


Figure 9. Distribution géographique et séroprévalence des hantavirus dans les 28 sites d'études à Madagascar.

● $4\% < x < 7\%$
 ● $2\% < x < 4\%$
 ● $x < 2\%$

Les points rouges indiqués sur la figure 9 représentent les sites de provenance des individus séropositifs, la séroprévalence par site étant de 0 à 6,6%. Les sites avec les gros points correspondent à des séroprévalences comprises entre 4 - 7% (Sambava, Antananarivo, Ambositra) ; les sites avec les points de taille moyenne correspondent à des séroprévalences comprises entre 2 - 4% (Nosy be, Toamasina, Toliary, Fianarantsoa, Taolagnaro.) ; et les sites avec les plus petits points correspondent à des séroprévalences inférieures à 2% (Antsiranana, Antsohihy, Mahajanga, Anjozorobe, Miandrivazo, Belo sur Tsiribihina, Morondava, Farafangana, Ejeda, Ambovombe). D'après l'analyse statistique univariée (test de Fisher Exact avec le logiciel STATA 13), aucune différence significative n'a pu être montrée entre la séropositivité aux hantavirus et l'origine géographique (site : $p=0,2$; province $p = 0,3$).

Parmi les 30 individus séropositifs aux hantavirus 19 sont des hommes et 11 sont des femmes, âgés de 18 à 70 ans (âge moyen : 42,7 ans) (Figure 10a). L'analyse univariée a montré que, bien que 11 sur les 30 individus séropositifs soient dans la classe d'âge [18-29], il n'y a pas différence significative entre les différentes classes d'âges ($p = 0,88$), il n'y a pas de lien significatif avec le sexe (test Chi2, $p = 0,15$).

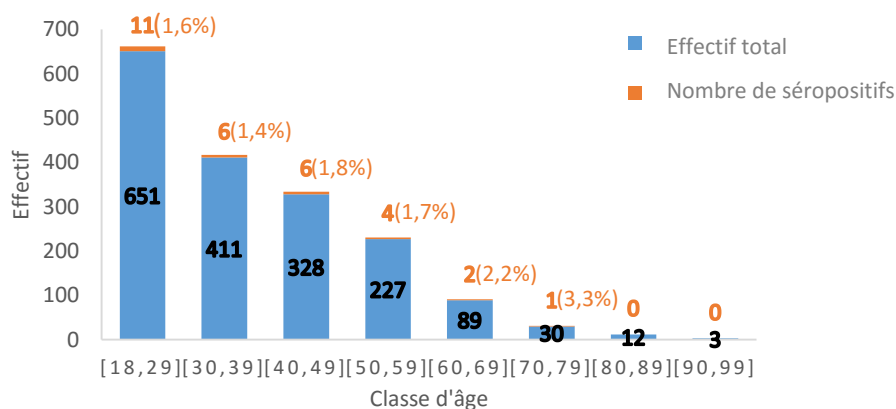


Figure 10a : Séroprévalence des hantavirus dans la population malagasy selon la classe d'âge.

Parmi 30 individus séropositifs, 12 (38,7%) sont des agriculteurs et des éleveurs d'animaux qui appartiennent à la catégorie 3 (Figure 10b). Cependant, l'analyse statistique (test Fischer exact) n'indique pas une différence significative entre les différentes catégories d'activités professionnelles ($p = 0,59$).

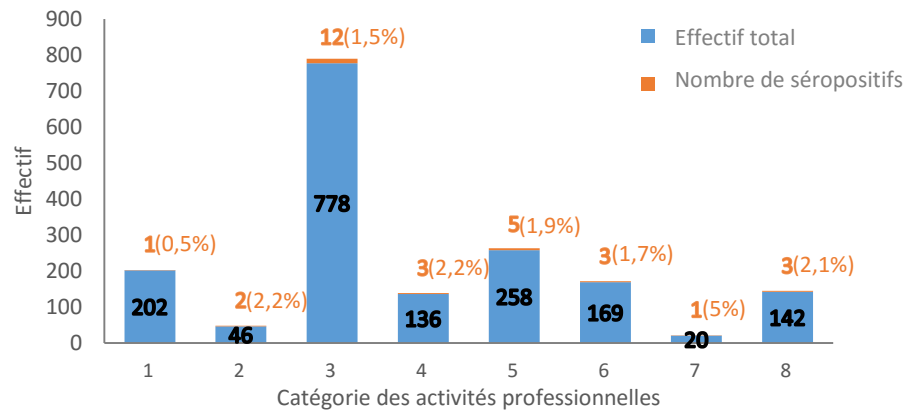


Figure 10b : Séroprévalence des hantavirus selon les catégories des activités professionnelles.

(1 : Administratif, enseignant/étudiant ; 2 : Retraité, sans activité ; 3 : Agriculteur, Gardien/éleveur d'animaux ; 4 : Commerçant ; 5 : Femme au foyer/ service ménage ; 6 : Artisan ; 7 : Agent de santé/social ; 8 : Autres (ex : coiffeuse, chauffeur, ...)

Concernant l'exposition aux rats, la majorité des individus (17/31) sont inclus dans le score « Moyen » (avoir vu ou des rats dans la maison, entendu des rats dans la maison ou dans les environs de la maison), sans lien significatif selon le test Chi2 ($p = 1$) (Figure 10c).

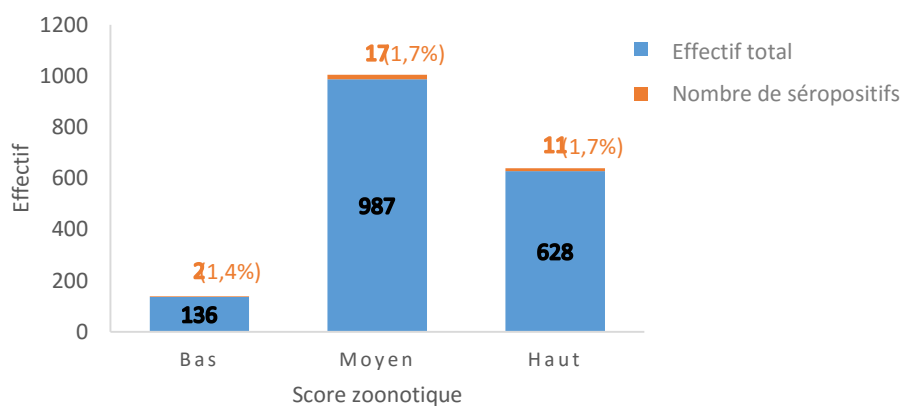


Figure 10c. Séroprévalence des hantavirus selon l'exposition aux rats.

Les tableaux 6 et 7 résument tous ces résultats.

Tableau 6 : Répartition des individus séropositifs selon l'origine géographique, le sexe, l'âge, les catégories des activités professionnelles et l'exposition aux rats.

N°	Zone	Sexe	Age	Catégorie des activités professionnelles	Score d'exposition
1	Toliary	H	54	Administratif, Enseignant/Étudiant	1 Moyen
2	Toliary	H	19	Retraité, Sans activité	2 Haut Bas
3	Nosy Be	H	60		
4	Sambava	H	52	Agriculteur, Gardien /éleveur d'animaux	Moyen
5	Ambositra	F	70		Moyen
6	Farafangana	H	67		Moyen
7	Ambositra	H	41		Moyen
8	Nosy Be	H	18		Moyen
9	Anjozorobe	F	57		Moyen
10	Antsohihy	H	39		Haut
11	Antsiranana	H	27		Haut
12	Taolagnaro	H	26		Haut
13	Toamasina	H	48		Haut
14	Ambovombe	H	44	Haut	
15	Morondava	H	20	Haut	
16	Sambava	F	35	Commerçant	Moyen
17	Miandrivazo	F	53		4 Moyen
18	Mahajanga	F	40		Haut
19	Fianarantsoa	F	37	Femme au foyer/service ménage	Bas
20	Antananarivo	F	35		Moyen
21	Taolagnaro	F	22		5 Moyen
22	Belo sur Tsiribihina	F	27		Haut
23	Ejeda	F	24		Haut
24	Ambositra	H	33	Artisan	Moyen
25	Fianarantsoa	H	35		6 Moyen
26	Toamasina	H	40		Moyen
27	Ambositra	H	26	Agent de Santé/social	7 Moyen
28	Sambava	H	45	Autres (ex : coiffeuse, chauffeur, ...)	Moyen
29	Antananarivo	F	23		8 Moyen
30	Antananarivo	H	29		Haut

Tableau 7 : Séroprévalence aux hantavirus dans la population malagasy selon l'âge, le sexe, l'exposition aux rats et les activités professionnelles.

Analyse	Nombre de séropositifs	p-value
Age		
[18-29]	11/651(1,6%)	0,88
[30-39]	6/411(1,4%)	
[40-49]	6/328(1,8%)	
[50-59]	4/227(1,7%)	
[60-69]	2/89(2,2%)	
[70-79]	1/30(3,3%)	
[80-89]	0/12	
[90-99]	0/3	
Sexe		
Homme	19/884(2,1%)	0,15
Femme	11/867(1,2%)	
Exposition aux rats		
Bas	2/136(1,4%)	1
Moyen	17/987(1,7%)	
Haut	11/628(1,7%)	
Activité professionnelle		
1	1/202(0,5%)	0,59
2	2/46(4,3%)	
3	12/778(1,5%)	
4	3/136(2,2%)	
5	5/258(1,9%)	
6	3/169(1,7%)	
7	1/20(5%)	
8	3/142(2,1%)	

IV-3- ANALYSE MOLECULAIRE

Au total, 146 échantillons ont été testés par l'intermédiaire de la RT-PCR NICHEE : i) 31 positifs, 31 douteux et 30/1689 négatifs issus du premier test ELISA (Figure 8, p. 24) ; ii) 54 sérums provenant des individus qui ont à la fois touché des rats vivants ou morts et tué des rats. (Score « Haut » d'exposition aux rats).

Aucune présence des ARN génomiques des hantavirus n'a été détectée dans les extraits d'ARN provenant de ces 146 sérums.

V- DISCUSSION

Les hantavirus sont des virus zoonotiques à ARN appartenant à la famille des *Bunyaviridae*. L'infection de ces virus dans les animaux réservoirs (petits Mammifères : rongeurs, insectivores, chauves-souris) est asymptomatique, alors qu'ils sont pathogènes pour l'homme (Jonsson *et al.* 2010, Arai *et al.* 2012, Weiss *et al.* 2012, Arai *et al.* 2013).

L'infection des hantavirus chez l'homme est responsable de la fièvre hémorragique à syndrome rénal, en Europe et en Asie, et de l'hantavirose à syndrome cardiopulmonaire en Amérique (Bi *et al.* 2008, Vaheri *et al.* 2013, Krüger *et al.* 2015) (Figure 2, p. 3).

Concernant le continent africain, plusieurs études sérologiques (Gonzalez *et al.* 1989, Rodier *et al.* 1993, Nakounne *et al.* 2000) ont été effectuées avant la découverte du virus *Sangassou* chez le rongeur *Hylomiscus simus* en Guinée en 2006 (Klempa *et al.* 2006).

Actuellement, le nombre total des hantavirus découverts sur ce continent est de douze (Klempa *et al.* 2006, Klempa *et al.* 2007, Kang *et al.* 2011, Meheretu *et al.* 2012, Sumibcay *et al.* 2012, Weiss *et al.* 2012, Gu *et al.* 2013, Witkowski *et al.* 2016, Reynes *et al.* 2014, Filippone *et al.* 2016) (Tableau 1, p. 4).

Depuis, plusieurs études sur la séroprévalence humaine ont été effectuées dans plusieurs régions d'Afrique (Klempa *et al.* 2010, Klempa *et al.* 2013, Witkowski *et al.* 2014, Witkowski *et al.* 2015).

A Madagascar, bien qu'une étude ait montré la présence des anticorps contre les hantavirus chez les rongeurs et les individus qui les avaient capturés (Rollin *et al.* 1985), c'est seulement en 2014 que la variante *Anjozorobe virus* de l'espèce THAIV a été découverte chez deux rongeurs (*Rattus rattus*, *Eliurus majori*) (Reynes *et al.* 2014) (Tableau 1, p. 4, Figure 3, p. 6).

La présente étude a été faite pour déterminer la séroprévalence humaine des hantavirus à Madagascar. La technique sérologique ELISA indirect a été utilisée pour atteindre cet objectif.

L'étude a été faite dans une population générale adulte recrutée dans le cadre du projet ZORA mise en place à l'IPM et focalisé sur les maladies zoonotiques à Madagascar. Ces individus provenaient de 28 sites (Figure 4, p. 12, Tableau 2, p. 11).

Nous avons essayé de définir le risque zoonotique de la population d'étude ; pour cela, les individus ont été groupés en 8 catégories selon leur activité professionnelle et en trois groupes selon l'exposition aux rongeurs (Figure 6 et 7, p.22 et 23).

Ne disposant pas d'une technique sérologique spécifique pour le virus *Anjzorobe*, l'analyse sérologique a été effectuée par l'intermédiaire d'un kit commercial (« DOBRAVA-HANTAAAN IgG EIA »), développé à partir de la protéine recombinante de la nucléocapside (rNP) de HTNV.

Les protéines des nucléocapsides sont des antigènes immunodominants au cours de l'infection des hantavirus et la majeure partie des anticorps sont sécrétés contre ces antigènes (Yoshimatsu and Arikawa 2014).

Compte tenu du fait que le criblage ELISA avec la rNP de HTNV peut détecter d'autres hantavirus associés aux rongeurs de la sous-famille des *Murinae* (SEOV, DOBV et THAIV) (Yoshimatsu and Arikawa 2014), et que l'hantavirus trouvé à Madagascar est une variante génétique de THAIV (Reynes *et al.* 2014), nous avons décidé d'utiliser cette approche méthodologique, en supposant qu'il y a une cross-réactivité entre le virus *Anjzorobe* et HTNV/DOBV.

L'évaluation du kit EIA HTNV/DOBV a déjà été effectuée sur des patients confirmés positifs aux hantavirus (Kelo *et al.* 2012).

Notre étude a permis de trouver une séroprévalence des hantavirus à Madagascar de 1,71% (n=30/1751).

Sur les 30 individus séropositifs aux hantavirus, aucun lien n'a été trouvé avec les variables (sexe, âge, exposition aux rats, activité professionnelle) testées d'après les analyses statistiques (Tableau 6 et 7, p. 27 et 28 ; Figure 10a, 10b,10c, p.25 et 26).

Bien que la majorité (12) des individus séropositifs se trouve, en nombre absolu, dans la catégorie des agriculteurs et des éleveurs (Tableau 7, p. 27), cela est aussi en lien avec le nombre de ces derniers recrutés au cours de cette étude (778/1751).

La présence des anticorps IgG permet d'affirmer que ces individus ont été en contact avec ces hantavirus dans le passé et qu'ils ont acquis une immunité contre ces virus.

Les échantillons trouvés douteux au cours des analyses ELISA pourraient contenir un taux d'anticorps IgG faible contre les hantavirus, mais qui reste au-dessous du seuil de positivité.

Bien que la séroprévalence observée de 1,7%, aucune trace d'ARN virale a été détectée dans les ARN extraits à partir des individus séropositifs. L'absence de l'ARN génomique chez ces individus séropositifs pourrait être due au fait que la virémie des hantavirus n'est plus détectable au-delà de 30 à 40 jours après l'infection (Korva *et al.* 2013). La présence des anticorps IgG dans les sérums correspond au fait que les anticorps IgG persistent plus longtemps dans l'organisme, contrairement à la virémie qui se dissipe peu à peu et disparaît à un moment donné.

VI- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude s'est focalisée sur la détermination de la séroprévalence humaine des hantavirus chez la population malagasy. Nous avons observé un pourcentage de 1,71% (n=30/1751), valeur de séroprévalence comparable à celles trouvées dans plusieurs régions d'Afrique (Klempa *et al.* 2010, Klempa *et al.* 2013, Witkowski *et al.* 2014, Witkowski *et al.* 2015). Pour confirmer ces résultats, des tests plus spécifiques avec des antigènes recombinants du virus *Anjzorobe virus* et/ou du virus *Thailand* seront mis en place.

Etant donné que THAIV est l'un des responsables de la FHSR en Asie, et que le virus *Anjzorobe* est une de ses variantes génétiques, des études sur des patients souffrant de fièvres d'étiologie inconnue seraient envisageables à Madagascar.

Les données actuelles concernant les hantavirus à Madagascar sont encore très limitées, le virus *Anjzorobe* étant le seul hantavirus connu dans le territoire malagasy. D'autres études seront nécessaires pour investiguer la présence d'autres hantavirus potentiellement pathogènes pour l'homme chez d'autres rongeurs, insectivores ou chauves-souris.

VII- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Arai S, Gu S H, Baek L J, Tabara K, Bennett S N, Oh H-S, Takada N, Kang H J, Tanaka-Taya K, Morikawa S, Okabe N, Yanagihara R and Song J-W. 2012. Divergent ancestral lineages of newfound hantaviruses harbored by phylogenetically related crocidurine shrew species in Korea. *Virology* 424: 99-105.

Arai S, Nguyen S T, Boldgiv B, Fukui D, Araki K, Dang C N, Ohdachi S D, Nguyen N X, Pham T D, Boldbaatar B, Satoh H, Yoshikawa Y, Morikawa S, Tanaka-Taya K, Yanagihara R and Oishi K. 2013. Novel bat-borne hantavirus, Vietnam. *Emerging Infectious Diseases* 19: 1159-1161.

Bi Z, Formenty P B H and Roth C E. 2008. Hantavirus Infection: a review and global update. *The Journal of Infection in Developing Countries* 2: 003-023.

Brummer-Korvenkontio M, Vaheri A, Hovi T, von Bonsdorff C H, Vuorimies J, Manni T, Penttinen K, Oker-Blom N and Lähdevirta J. 1980. Nephropathia epidemica: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection. *The Journal of infectious diseases* 141: 131-134.

Filippone C, Jallet C, Murri S, Fooks A R, Ellis R J, Tordo N, Beaulieux F, Desvars A, Marston D A, Vourc'h G, Wise E L, Castel G, Ermonval M, McElhinney L M, Marianneau P and Halos L g. 2016. Discovery of hantavirus circulating among *Rattus rattus* in French Mayotte island, Indian Ocean. *Journal of General Virology* 97: 1060-1065.

Gajdusek D C. 1962. Virus Hemorrhagic Fevers: Special Reference To Hemorrhagic Fever With Renal Syndrome (Epidemic Hemorrhagic Fever). *The Journal of Pediatrics* 60: 841-857.

Gamage C D, Yasuda S P, Nishio S, Kularatne S A, Weerakoon K, Rajapakse J, Nwafor-Okoli C, Lee R B, Obayashi Y, Yoshimatsu K, Arikawa J and Tamashiro H. 2011. Serological evidence of *Thailand virus*-related hantavirus infection among suspected leptospirosis patients in Kandy, Sri Lanka. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 64: 72-75.

Gonzalez J P, Josse R, Johnson E D, Merlin M, Georges a J, Abandja J, Danyod M, Delaporte E, Dupont a, Ghogomu a, Kouka-Bemba D, Madelon M C, Sima a and Meunier D M Y. 1989. Antibody prevalence against haemorrhagic fever viruses in randomized representative central African populations. *Research in Virology* 140: 319-331.

Gu S H, Nicolas V, Lalis A, Sathirapongsasuti N and Yanagihara R. 2013. Complete genome sequence and molecular phylogeny of a newfound hantavirus harbored by the Doucet's musk shrew (*Crocidura douceti*) in Guinea. *Infection, Genetics and Evolution* 20: 118-123.

Heinemann P, Tia M, Alabi A, Anon J-C, Auste B, Essbauer S, Gnionsahe A, Kigninlman H, Klempa B, Kraer C, Kruger N, Leendertz F H, Ndhatz-Sanogo M, Schaumburg F, Witkowski P T, G.Akoua-Koffi C and Krüger D H. 2016. Human infections by non-rodent associated hantaviruses in Africa. *The Journal of infectious Diseases*.

Heyman P, Vaheiri A, Lundkvist A and Avsic-Zupanc T. 2009. Hantavirus infections in Europe: from virus carriers to a major public-health problem. *Expert review of anti-infective therapy* 7: 205-217.

Jonsson C B, Figueiredo L T M and Vapalahti O. 2010. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clinical microbiology reviews* 23: 412-441.

Kang H J, Kadjo B, Dubey S, Jacquet F and Yanagihara R. 2011. Molecular evolution of Azagny virus, a newfound hantavirus harbored by the West African pygmy shrew (*Crocidura obscurior*) in Côte d'Ivoire. *Virology journal* 8: 373.

Kelo E, Parviainen M, Sirola H, Vaheiri A, Vapalahti O, Avsic-Zupanc T, Flinck H, Sakari Jokiranta T and Mononen I. 2012. Enzyme immunoassay tests for detection of hantavirus infection and immunity. *European Infectious Disease* 6: 9-13.

Klempa B, Fichet-Calvet E, Lecompte E, Auste B, Aniskin V, Meisel H, Barrière P, Koivogui L, Ter Meulen J and Krüger D H. 2007. Novel hantavirus sequences in Shrew, Guinea [16]. *Emerging Infectious Diseases* 13: 520-522.

Klempa B, Fichet-Calvet E, Lecompte E, Auste B, Aniskin V, Meisel H, Denys C, Koivogui L, ter Meulen J and Krüger D H. 2006. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerging infectious diseases* 12: 838-840.

Klempa B, Koivogui L, Sylla O, Koulemou K, Auste B, Krüger D H and ter Meulen J. 2010. Serological evidence of human hantavirus infections in Guinea, West Africa. *The Journal of infectious diseases* 201: 1031-1034.

Klempa B, Koulemou K, Auste B, Emmerich P, Thomé-Bolduan C, Günther S, Koivogui L, Krüger D H and Fichet-Calvet E. 2013. Seroepidemiological study reveals regional co-occurrence of Lassa- and Hantavirus antibodies in Upper Guinea, West Africa. *Tropical Medicine and International Health* 18: 366-371.

Korva M, Saksida A, Kejžar N, Schmaljohn C and Avšič-Županc T. 2013. Viral load and immune response dynamics in patients with haemorrhagic fever with renal syndrome. *Clinical Microbiology and Infection* 19.

Krüger D H, Figueiredo L T M, Song J W and Klempa B. 2015. Hantaviruses- Globally emerging pathogens. *Journal of Clinical Virology* 64: 128-136.

Lee H W, Lee P W and Johnson K M. 1978. Isolation of the etiologic agent of Korean Hemorrhagic fever. *The Journal of infectious diseases* 137: 298-308.

Lee H W, Vaheiri A and Schmaljohn C S. 2014. Discovery of hantaviruses and of the Hantavirus genus: Personal and historical perspectives of the Presidents of the International Society of Hantaviruses. *Virus Research* 187: 2-5.

Manigold T and Vial P. 2014. Human hantavirus infections: epidemiology, clinical features, pathogenesis and immunology. *Swiss medical weekly* 144: w13937.

Martinez V P, Bellomo C, San Juan J, Pinna D, Forlenza R, Elder M and Padula P J. 2005. Person-to-person transmission of *Andes virus*. *Emerging Infectious Diseases* 11: 1848-1853.

Mccaughey C and Hart C A. 2000. Hantaviruses. *Journal of Medical Microbiology* 49: 587-599.

Meheretu Y, Cizkokova D, Tesikova J, Welegerima K, Tomas Z, Kidane D, Girmay K, Schmidt-Chanasit J, Bryja J, Gunther S, Bryjova A, Leirs H and de Bellocq J I G y. 2012. High diversity of RNA viruses in Rodents, Ethiopia. *Emerging Infectious Diseases* 18: 2047-2050.

Nakounne E, Selekon B and Morvan J. 2000. [Microbiological surveillance: viral hemorrhagic fever in Central African Republic: current serological data in man]. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique* (1990) 93: 340-347.

Pattamadilok S, Lee B-H, Kumperasart S, Yoshimatsu K, Okumura M, Nakamura I, Araki K, Khoprasert Y, Dangsupa P, Panlar P, Jandrig B, Krüger D H, Klempa B, Jakel T, Schmidt J, Ulrich R, Kariwa H and Arikawa J. 2006. Geographical distribution of hantaviruses in thailand and potential human health significance of *Thailand virus*. *Am J Trop Med Hyg* 75: 994-1002.

Reynes J-M, Razafindralambo N K, Lacoste V, Olive M-M, Barivelo T A, Soarimalala V, Heraud J-M and Lavergne A. 2014. Anjozorobe hantavirus, a new genetic variant of *Thailand virus* detected in rodents from Madagascar. *Vector borne and zoonotic diseases* (Larchmont, N.Y.) 14: 212-219.

Rodier G, Soliman a K, Rodier G, Bouloumié J and Kremer D. 1993. Presence of antibodies to Hantavirus in rat and human populations of Djibouti. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 87: 160-161.

Rollin P E, Mathiot C and Nawrocka E. 1985. La fièvre hémorragique avec syndrome renal a Madagascar. Première enquête sero-épidémiologique sur les populations de rats. Archives De L'institut Pasteur De Madagascar 52: 181-186.

Smadel J E. 1953. Epidemic hemorrhagic fever. American journal of public health and the nation's health 43: 1327-1330.

Sumibcay L, Kadjo B, Gu S H, Kang H J, Lim B K, Cook J A, Song J-W and Yanagihara R. 2012. Divergent lineage of a novel hantavirus in the banana pipistrelle (*Neoromicia nanus*) in Côte d'Ivoire. Virology journal 9: 34.

Tordo P N, Castel G, Filippone C and Marianneau P. 2013. Recent data on Hantaviruses and perspectives for research; Données récentes sur les Hantavirus et perspectives de recherche. Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France 166.(4): 364 - 371.

Vaheri A, Henttonen H, Voutilainen L, Mustonen J, Sironen T and Vapalahti O. 2013. Hantavirus infections in Europe and their impact on public health. Reviews in Medical Virology 23: 35-49.

Watson D C, Sargianou M, Papa A, Chra P, Starakis I and Panos G. 2014. Epidemiology of Hantavirus infections in humans: a comprehensive, global overview. Critical reviews in microbiology 40: 261-272.

Weiss S, Witkowski P T, Auste B, Nowa K, Weber N, Fah J, Mombouli J V, Wolfe N D, Drexler J F, Drosten C, Klempa B, Leendertz F H and Krüger D H. 2012. Hantavirus in bat, Sierra Leone. Emerging Infectious Diseases 18: 159-161.

Wells R M, Estani S and Yadon Z E. 1997. An unusual outbreak in southern Argentina: person-to-person transmission? Hantavirus pulmonary syndrome study group for Patagonia. Emerging infectious diseases 3: 171-174.

Witkowski P T, Drexler J F, Kallies R, Ličková M, Bokorová S, Mananga G D, Szemes T, Leroy E M, Krüger D H, Drosten C and Klempa B. 2016. Phylogenetic analysis of a newfound bat-borne hantavirus supports a laurasiatherian host association for ancestral mammalian hantaviruses. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases 41: 113-119.

Witkowski P T, Klempa B, Ithete N L, Auste B, Mfunne J K E, Hoveka J, Matthee S, Preiser W and Krüger D H. 2014. Hantaviruses in Africa. *Virus Research* 187: 34-42.

Witkowski P T, Leendertz S A J, Auste B, Akoua-Koffi C, Schubert G, Klempa B, Muyembe-Tamfum J J, Karhemere S, Leendertz F H and Kruger D H. 2015. Human seroprevalence indicating hantavirus infections in tropical rainforests of Côte d'Ivoire and Democratic Republic of Congo. *Frontiers in Microbiology* 6: 518.

Yoshimatsu K and Arikawa J. 2014. Antigenic properties of N protein of Hantavirus. *Viruses* 6: 3097-3109.

Yoshimatsu K and Arikawa J. 2014. Serological diagnosis with recombinant N antigen for hantavirus infection. *Virus Research* 187: 77-83.

Zaki P W, Coffield L M, Goldsmith C S, Nolte K B, Foucar K, Feddersen R M, Zumwalt R E, Miller G L, Khan A S, Rollin P E, Ksiazek T G, Nichol S T, Mahy B W J, Peters C J, S R. and Greer. 1995. Hantavirus pulmonary syndrome. Pathogenesis of an emerging infectious disease. *American Journal of Pathology* 146: 552-579.

Zhang Y Z. 2014. Discovery of hantaviruses in bats and insectivores and the evolution of the genus Hantavirus. *Virus Research* 187: 15-21.

ANNEXES

ANNEXE 1 : CARACTERISTIQUES DES AMORCES UTILISEES EN RT-PCR ET EN PCR-NICHEE (Klempa et al. 2006).

Amorces	Séquence (5' vers 3')	Position
<u>RT-PCR</u>		
HAN-L-F1 (forward)	ATGTAYGTBAGTGCWGATGC	2899-2918
HAN-L-R1 (reverse)	AACCADTCWGTYCCRTCATC	3356-3337
<u>PCR-NICHEE</u>		
HAN-L-F2 (forward)	TGCWGATGCHACIAARTGGTC	2910-2930
HAN-L-R2 (reverse)	GCRTCRTCWGARTGRTGDGCAA	3399-3278

ANNEXE 2 : APPAREIL UTILISE POUR LA PCR.



Figure 11 : Thermocycleur utilisé pour le RT-PCR nichée Hantavirus (BIOMETRA T 3000).