



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

MASTER
ÉCO-ÉPIDÉMIOLOGIE
Parcours Etude Intégrée
des Émergences Parasitaires et Infectieuses
Année 2

Rapport de Stage de Fin d'Étude

Analyse des patrons de co-infections entre le
Seoul orthohantavirus et les helminthes gastro-intestinaux de *Rattus norvegicus* à Bamako

Présenté par

Aloïs BERARD

Réalisé sous la direction de : Christophe Diagne, Guillaume Castel et Nathalie Charbonnel
Laboratoire/Organisme/Structure : Centre de Biologie pour la Gestion des Populations (CBGP)
Période du stage : 09/01/2023 au 23/06/2023
Date de soutenance : 28/06/2023

Année universitaire 2022-2023



REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à exprimer ma profonde gratitude à Christophe Diagne, Guillaume Castel et Nathalie Charbonnel, pour leur confiance et leur bienveillance sans faille. Merci infiniment d'avoir su transmettre avec un enthousiasme si contagieux la passion qui vous anime et d'avoir toujours été si impliqués et à l'écoute. Passer ces six mois en votre compagnie a été un vrai plaisir et je ne pense pas que j'aurais pu tomber sur des encadrant·e·s autrement si géniaux·ales !

Je souhaite également remercier très chaleureusement Caroline Tatard, Johannes Tavoillot, Laurent Granjon, Maxime Galan, Odile Fossati, Philippe Gauthier et Romain Gallet pour m'avoir accordé leur aide si précieuse avec tant de pédagogie, de patience et d'attention. Merci de m'avoir permis de vivre avec vous ces beaux moments de partage et de bonne humeur.

Je tiens aussi à remercier profondément Solimane Ag Atteynine et toute l'équipe de l'IER de Bamako pour le travail monumental qu'ils ont réalisé en amont de ce stage et sans lequel rien de tout cela n'aurait été possible.

Enfin, un grand merci à Antoine Ca, Antoine Ch, Benjamin, Choi Lin, Cloé, Ghislain, Maëlle, Marie, Sébastien, Sido et tous les autres membres du CBGP sans qui les journées n'auraient pas eu la même saveur. Merci à vous pour ces moments passés ensemble, pour toutes les petites blagues, tous les délicieux gâteaux et toute la joie quotidienne.

RÉSUMÉ

La co-infection est un phénomène fréquent dans les populations naturelles où plusieurs parasites infectent simultanément un même hôte, favorisant ainsi l'établissement d'interactions entre ces parasites. Ces interactions peuvent avoir une influence sur l'évolution, la pathogenèse et la transmission des agents pathogènes, et conduire à des associations positives ou négatives entre les parasites. Le *Seoul orthohantavirus* (SEOV) est un virus zoonotique dont l'aire de répartition est mondialement en expansion du fait de ses hôtes invasifs du genre *Rattus*. L'existence d'interactions inter-parasites impliquant le SEOV n'a jamais été étudiée alors qu'elles pourraient être au cœur de processus influençant la distribution de ce virus. Les helminthes gastro-intestinaux sont des candidats particulièrement pertinents pour étudier les associations, en raison de leurs capacités connues à moduler la réponse immunitaire et influencer les microparasites (p. ex. virus et bactéries). Afin d'explorer l'existence de ces associations, nous avons caractérisé la présence de SEOV et décrit les communautés d'helminthes dans la population de rats bruns de Bamako (Afrique de l'Ouest). Notre étude a fourni les premières indications d'une circulation très probable du SEOV au Mali, ainsi que la première description de la communauté d'helminthes présente chez les rats bruns d'Afrique de l'Ouest. Bien que nous n'ayons pas identifié d'association significative entre la séropositivité au SEOV et la présence d'helminthes, nous avons observé un signal d'association négative entre la séropositivité et l'intensité du nématode *Gongylonema neoplasticum*, qui nécessite des investigations plus approfondies. En perspectives, il faudrait poursuivre cette recherche pour confirmer ou infirmer l'association observée, à Bamako et dans d'autres contextes urbains. Des études longitudinales pourraient être entreprises afin d'identifier l'existence d'interactions liées aux associations détectées, et les mécanismes sous-jacents à ces interactions.

Mots clefs : Associations intra-hôte, *Seoul orthohantavirus*, Helminthes, *Rattus norvegicus*, Bamako

ABSTRACT

Co-infection is a frequent phenomenon in natural populations, where several parasites simultaneously infect the same host, fostering the establishment of interactions between these parasites. These interactions can influence the evolution, pathogenesis and transmission of pathogens, and lead to positive or negative associations between parasites. *Seoul orthohantavirus* (SEOV) is a zoonotic virus with a globally expanding distribution due to its invasive *Rattus* hosts. The existence of inter-parasite interactions involving SEOV has never been studied, although they could be at the heart of the processes influencing the distribution of this virus. Gastrointestinal helminths are particularly relevant candidates for investigating these associations, due to their recognized ability to modulate the immune response and influence microparasites (e.g. viruses and bacteria). To explore the existence of such associations, we characterized the presence of SEOV and described helminth communities in the brown rat population of Bamako (West Africa). Our study provided the first indications of a highly probable circulation of SEOV in Mali, as well as the first description of the helminth community present in West African brown rats. Although we did not identify a significant association between SEOV seropositivity and the presence of helminths, we did observe a negative association signal between seropositivity and the intensity of the nematode *Gongylonema neoplasticum*, which requires further investigation. This research should be pursued to confirm or refute the observed association, in Bamako and other urban contexts. Longitudinal studies could be undertaken to identify the existence of interactions linked to the associations detected, and the mechanisms underlying them.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

RÉSUMÉ

I. INTRODUCTION

II. MATERIELS ET METHODES

A. Echantillonnage et traitement préalable des données	4
1. Piégeage de petits mammifères et prélèvements biologiques	4
2. Caractérisation du socio-environnement	4
3. Caractérisation de la maturité sexuelle des <i>Rattus norvegicus</i>	5
B. Détection et identification des cortèges parasitaires	5
1. Détection d'IgG anti-SEOV par test ELISA indirect	5
2. Détection et identification taxonomique des helminthes gastro-intestinaux	6
i. Tri et identification morphotypique des helminthes	7
ii. Identification moléculaire des helminthes	7
C. Analyses des patrons d'associations entre communauté d'helminthes et anticorps anti-SEOV	8
1. Détection des associations basée sur les probabilités d'occurrence	8
2. Analyses multivariées	8
3. Modèles linéaires généralisés à effets mixtes	9
III. RÉSULTATS	10
A. Analyse du socio-environnement	10
B. Détection et identification des cortèges parasitaires	11
1. Présence d'anticorps anti-SEOV	11
2. Détection et diversité des helminthes gastro-intestinaux	12
C. Analyse des associations SEOV - helminthes	13
1. Détection des associations basée sur les probabilités d'occurrence	13
2. Analyses multivariées	14
3. Modèle linéaires généralisés à effets mixtes	15
IV. DISCUSSION	17
A. Circulation du SEOV et communautés d'helminthes	17
B. Absence d'évidence d'une forte d'association entre IgG anti-SEOV et helminthes	18
C. Limites possibles de l'étude pour la détection d'associations	18
D. Une corrélation entre IgG anti-SEOV et intensité de <i>G. neoplasticum</i>	20
E. Conclusions et perspectives	20
ANNEXE	22
BIBLIOGRAPHIE	24

I. INTRODUCTION

La co-infection (*syn.* polyparasitisme et multiparasitisme) désigne une situation dans laquelle un individu hôte est infecté simultanément par au moins deux espèces ou deux génotypes de parasites (parasite *lato sensu* : virus, bactéries ou eucaryotes symbiotiques ayant un effet délétère sur leurs hôtes)¹. La grande diversité des parasites et la nature ubiquiste du parasitisme créent une vaste possibilité d'infections simultanées dans les populations naturelles d'hôtes^{2,3}. Les co-infections sont ainsi courantes dans les populations naturelles et sont parfois considérées comme étant la norme^{4,5}.

La co-infection d'un hôte peut survenir dans le cas d'une co-exposition à différents agents infectieux pour lequel il est compétent⁶. Cette situation peut résulter aussi bien de l'exposition simultanée que séquentielle d'un hôte à plusieurs parasites⁷. Une co-exposition peut notamment être causée par des agents pathogènes ayant des modes de transmission similaires, comme dans le cas de vecteurs transmettant plusieurs agents pathogènes au cours d'un seul repas sanguin^{8,9}.

L'infection préalable d'un hôte par un parasite peut affecter la probabilité¹⁰ et le développement¹¹ d'une infection ultérieure par un autre parasite, conduisant ainsi à l'établissement d'associations positives ou négatives entre parasites à l'échelle de l'individu hôte¹². De tels patrons d'associations peuvent ainsi avoir pour origine les interactions antagonistes ou synergiques entretenues par les parasites co-occurrents⁷. En effet, les parasites qui consomment les mêmes ressources ou qui occupent les mêmes sites peuvent être en compétition pour leur exploitation^{13,14}. Cette compétition peut prendre des formes variées, allant d'une simple concurrence indirecte pour l'exploitation efficace des ressources à des interférences directes par contact ou allélopathie¹³. Cette compétition peut donc entraîner des patrons d'associations négatives intra-hôtes. A titre d'illustration, une infection par un parasite limitant le nombre de globules rouges (anémiant) peut limiter la croissance des parasites dépendant de cette ressource (p. ex. *Apicomplexa*)¹⁵. Dans ce cas, la compétition indirecte pour la ressource est engendrée par l'induction d'une pathologie chez l'hôte. Les interactions entre parasites peuvent, au contraire, parfois favoriser les co-infections. Par exemple, certains parasites peuvent faciliter l'entrée d'autres parasites dans l'hôte en provoquant des lésions mucocutanées¹⁶. D'autres peuvent excréter des substances qui améliorent l'accès aux ressources pour d'autres membres de la communauté parasitaire¹³. Cette facilitation peut donc entraîner des patrons d'associations positives intra-hôtes.

Alternativement, les interactions entre les parasites peuvent être médiées par le système immunitaire de l'hôte^{14,17}. L'immunomodulation ou l'immunosuppression induites par la présence ou l'activité d'un parasite peuvent ainsi avoir des répercussions sur les autres parasites présents ou sur les probabilités d'infections ultérieures¹⁷. Cela peut par exemple conduire à des associations négatives entre parasites antigéniquement proches, du fait de mécanismes de réaction croisée, tels que ceux observés entre les différents génotypes de plasmodes (embranchements : *Apicomplexa* : genre *Plasmodium*)¹⁸. A l'inverse, cela peut également mener à des associations positives, comme c'est le cas pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1), qui peut engendrer une immunosuppression et favoriser les infections opportunistes chez l'humain¹⁹.

Lors d'une co-infection, les interactions intra-hôtes peuvent changer radicalement le devenir de l'infection pour l'hôte comme pour les parasites⁴. En conséquence, les co-infections peuvent avoir une influence considérable sur i) la pathogenèse, ii) la dynamique et iii) l'évolution des agents infectieux. i) Les personnes atteintes de co-infections peuvent présenter des symptômes différents de ceux des personnes infectées individuellement. Par exemple, les infections par des vers parasites intestinaux sont susceptibles de modifier la sensibilité aux formes cérébrales du paludisme au travers d'interactions complexes entre *Plasmodium falciparum* et les vers, mais aussi entre les vers eux-mêmes^{20,21}. ii) Les interactions entre les parasites peuvent constituer une force majeure à l'origine des variations

dans la transmission des agents pathogènes, contribuant ainsi à façonner la dynamique des maladies infectieuses. En effet, une co-infection peut affecter la durée effective d'infectiosité d'un hôte en modifiant le taux de mortalité et/ou le taux de guérison^{22,23}. L'impact d'une co-infection peut également être observé sur le taux de transmissibilité des agents pathogènes, en particulier, en modifiant la contagiosité des hôtes infectés²³. Une étude a notamment révélé que la co-infection de souris BALB/c avec *Bordetella bronchiseptica* (règne : *Eubacteria*) et *Heligmosomoides polygyrus* (phylum: *Nematoda*) engendre une augmentation du nombre de nématodes infectieux excréts¹¹. Le taux de transmissibilité global peut aussi être impacté si la co-infection provoque une modification du flux de contacts (nombre de contacts/durée) entretenus par l'hôte infecté, notamment au travers de son influence sur la pathogénèse. *In fine*, le taux de reproduction d'agents pathogènes peut donc se voir significativement impacté par la présence de co-infections^{23,24}. iii) Enfin, alors que les parasites exercent une action régulatrice sur les populations d'hôtes²⁵, les interactions intra-hôtes prenant place lors de co-infections jouent un rôle clé dans les processus évolutifs impactant les parasites et leurs hôtes. C'est notamment le cas pour l'évolution de la virulence des agents pathogènes²⁶ et le maintien de leur diversité génétique¹³. La co-infection peut ainsi permettre l'hybridation d'espèces différentes^{27,28} ou encore les échanges de matériel génétique, comme cela a déjà été montré pour certains virus à génome segmenté²⁹. Ces transferts et recombinaisons de gènes peuvent notamment permettre l'acquisition de facteurs de résistance ou de virulence^{27,30,31}.

Il est ainsi crucial de considérer les co-infections pour comprendre les interactions entre les hôtes et leurs agents infectieux, tant dans un cadre théorique d'écologie évolutive que dans un cadre appliqué de prévention, de gestion et de traitement des maladies infectieuses. L'émergence de maladies infectieuses, notamment d'origine zoonotique (*syn.* anthropozoonose), étant en augmentation depuis plusieurs décennies^{32,33}, une meilleure évaluation des co-infections chez les animaux non humains et de leurs impacts pourrait grandement contribuer aux programmes de prévention.

Dans ce contexte, les co-infections impliquant les helminthes (groupe polyphylétique d'organismes multicellulaires parasites vermiformes) et les microparasites (p. ex. bactéries et virus) apparaissent d'un intérêt particulier, de par la fréquence élevée du parasitisme par les helminthes en populations naturelles⁴, la chronicité de ces infections³⁴ et l'influence potentielle de ce parasitisme sur les infections secondaires de microparasites¹⁵. En effet, certains helminthes gastro-intestinaux peuvent avoir une action immunosuppressive et/ou immunomodulatrice^{35,36} pouvant influencer la dynamique et l'évolution d'autres parasites, y compris des agents pathogènes ayant un impact significatif sur la santé humaine³⁷.

L'ordre des rongeurs (classe : *Mammalia*) apparaît comme un groupe modèle particulièrement pertinent pour étudier, en populations naturelles, les co-infections helminthes - microparasites³⁸. Cet ordre héberge une grande diversité d'espèces hôtes (environ 50% des espèces de mammifères), avec au moins 79 espèces reconnus capables d'héberger plusieurs agents zootiques³⁹. Le contexte actuel de changements globaux (p. ex. urbanisation et changement d'affectation des terres) est particulièrement propice à l'expansion et à la prolifération de plusieurs de ces espèces de rongeurs^{40,41}, notamment en raison de leurs affinités synanthropiques (proximité de ces hôtes avec les humains)^{42,43}, induisant un risque accru de transmission zootique^{39,44} potentiellement médié par des co-infections. Parmi les zoonoses associées aux rongeurs, on retrouve par exemple la leptospirose causée par les bactéries du genre *Leptospira* (règne *Eubacteria* : ordre *Spirochaetales*), la fièvre de Lassa causée par le *Lassa mammarenavirus* et les hantaviroses causées par les orthohantavirus⁴⁵.

Le genre *Orthohantavirus* (ordre *Bunyavirales* : famille *Hantaviridae*) est constitué de plus de trente virus reconnus⁴⁶. Ces virus enveloppés ont un génome d'ARN simple brin tri-segmenté à polarité négative⁴⁷. Ils sont présents dans le monde entier^{48,49} et certains peuvent engendrer de graves maladies chez l'humain⁵⁰. Des orthohantavirus originaires de l'Ancien Monde (Europe & Asie) peuvent entraîner une fièvre hémorragique avec syndrome rénal, tandis que d'autres, provenant du Nouveau Monde (Amériques du nord et du sud), peuvent provoquer le syndrome pulmonaire à hantavirus⁵⁰. Les orthohantavirus sont généralement considérés comme étant associés à une

espèce hôte spécifique (appartenant à l'ordre des *Rodentia*, *Eulipotyphla* ou *Chiroptera*), ou à un groupe d'espèces hôtes étroitement apparentées⁵¹. Parmi eux, le *Seoul orthohantavirus* (SEOV) qui peut être responsable de fièvre hémorragique chez l'humain, a pour hôte des rongeurs du genre *Rattus* (ordre *Rodentia* : famille *Muridae*). Il parasite principalement *Rattus norvegicus*, aussi connu sous le nom de rat brun, rat d'égout ou surmulot, mais également *Rattus rattus*, couramment appelé rat noir. Le rat brun est un rongeur synanthrope opportuniste, particulièrement adapté à la vie urbaine⁵² et qui a réussi à coloniser la plupart des grandes villes du monde par le biais des activités humaines, apportant avec lui le SEOV⁴⁹. Sur le continent africain, le virus n'a été identifié sans ambiguïté (c.-à-d. par séquençage) que récemment, et seulement au Sénégal et au Bénin^{53,54}. Or, la croissance accélérée des échanges commerciaux, en particulier maritimes, entre l'Afrique et d'autres continents pourrait conduire à une augmentation rapide des cas d'introduction du SEOV. En outre, la possibilité de transmission du virus, de l'espèce *R. norvegicus*, vers l'espèce plus largement répandue en Afrique *R. rattus*, pourrait faciliter la diffusion rapide du virus une fois introduit⁵⁵. Malgré ce risque croissant, le virus Seoul n'y est pas encore considéré comme un enjeu de santé publique et sa circulation y reste mal caractérisée⁵⁴. De fait, le rôle potentiel de co-infections avec les helminthes, parasites très présents en Afrique et importants pour la bio-écologie et la dynamique des populations naturelles de rongeurs⁵⁶, n'a encore pas été étudié dans ce contexte.

Peu de travaux ont étudié l'influence potentielle de ces co-infections sur l'épidémiologie et l'évolution des orthohantavirus. Or, ces virus et les communautés d'helminthes co-circulent très probablement avec de fortes prévalences chez les rongeurs. L'existence d'associations entre SEOV et helminthes n'a encore jamais été étudiée. Des travaux ont cependant porté sur d'autres modèles biologiques et ont pu révéler des résultats partiellement contradictoires. Les études sur les populations naturelles de *Myodes glareolus* (ordre *Rodentia* : famille *Cricetidae*) et le *Puumala orthohantavirus* (PUUV) en Finlande, ont révélé que la charge parasitaire en *Heligmosomum mixtum* était inversement corrélée à la séroprévalence et à la charge virale en PUUV (travaux non-publiés de P. Ahola dans le cadre de son master, 2020). En revanche, en France, une association positive significative a été observée entre la présence du nématode *H. mixtum* et la séroprévalence du PUUV⁵⁷. La présence du *Sin Nombre orthohantavirus* (SNV) dans les populations naturelles de *Peromyscus* spp. (famille *Cricetidae*) a elle été observée comme étant négativement corrélée à l'infection par des helminthes (travaux non-publiés de C. Gritzen dans le cadre de son master, 2012). L'administration d'un anthelminthique (Ivermectine) à des populations naturelles a aussi entraîné une augmentation de la séroprévalence du SNV⁵⁸. Ces résultats suggèrent dans ce cas une association négative où l'infection par l'un pourrait conférer une forme de protection contre l'autre.

Ce stage vise à approfondir nos connaissances et notre compréhension des co-infections *Orthohantavirus* - helminthes gastro-intestinaux. Pour cela, le projet s'appuie sur le modèle SEOV d'intérêt en santé publique, dont la circulation mondiale est en expansion du fait du caractère envahissant de son hôte commensal, *Rattus norvegicus*. Dans ce contexte, les objectifs spécifiques de mon stage sont d'estimer la circulation du SEOV, de décrire la diversité et la composition des communautés d'helminthes gastro-intestinaux, puis d'analyser les patrons de co-infection entre SEOV et helminthes au sein des populations de *R. norvegicus*. Cette étude s'appuiera sur des échantillons collectés dans la ville ouest-africaine de Bamako (Mali), pour laquelle aucune connaissance sur le SEOV n'est aujourd'hui disponible alors que des liens commerciaux existent avec d'autres pays africains aujourd'hui connus pour héberger SEOV (Sénégal). Les résultats obtenus permettront la mise en évidence d'éventuelles associations entre ces agents pathogènes et la caractérisation des paramètres écologiques influençant leur distribution.

II. MATERIELS ET METHODES

Toutes les analyses statistiques décrites dans la suite du manuscrit ont été réalisées sur le logiciel R (v.4.2.2 pour Windows).

A. Echantillonnage et traitement préalable des données

1. Piégeage de petits mammifères et prélèvements biologiques

Avant le début du stage, des populations de petits mammifères ont été échantillonnées dans le cadre des activités de l'Observatoire ouest-africain des petits Mammifères indicateurs des Changements Environnementaux (ObsMiCE; coord. L. Granjon, IRD-CBGP et Solimane Ag Atteynine, IER Sotuba) à Bamako, entre octobre 2021 et octobre 2022. Des rongeurs et crocidures ont été collectés dans les habitations de 14 quartiers au sein des six communes du district de Bamako, à raison d'au minimum deux quartiers par commune (cf. Figure 2). Les quartiers ont parfois été subdivisés en deux secteurs distincts pour maximiser la représentativité des typologies d'habitats au sein de chaque quartier. Les sessions de piégeage ont été réalisées selon une procédure standardisée, largement éprouvée en contexte ouest-africain et en accord avec les recommandations éthiques en vigueur⁵⁹. Dans chaque quartier, quatre à cinq nuits de piégeage ont été réalisées pour un effort total de 450 à 600 nuits-pièges. Les individus capturés ont été euthanasiés par dislocation cervicale, conformément aux recommandations de Mills et al. (1995)⁶⁰, avant d'être mesurés, pesés, sexés et identifiés. Les caractéristiques sexuelles ont été enregistrées pour chaque spécimen. L'ensemble de ces informations a été enregistré dans la "Base de données Petits Mammifères" du CBGP⁶¹. Des échantillons de tissus et de fluides ont également été prélevés, comprenant du sang sur papier Whatman (sérobuuvards) pour les sérologies, ainsi que les tubes digestifs (de l'œsophage au rectum) stockés dans de l'éthanol 96% à température ambiante pour étudier les communautés d'helminthes.

L'échantillonnage de chaque habitation n'a eu lieu qu'après l'obtention de l'accord éclairé et signé des habitants. L'emploi de méthodes d'échantillonnages non-invasives n'était pas possible en raison du besoin d'identification et de quantification fine des helminthes gastro-intestinaux, nécessitant une étape de dissection. Toutes les procédures listées ont été préalablement approuvées par la direction nationale des eaux et forêts du Mali et le comité d'éthique de l'Institut national de santé publique malien (Décision n°18/2021/CE-INSPI).

2. Caractérisation du socio-environnement

Pour tenir compte d'un large éventail de facteurs pouvant potentiellement influencer la distribution de SEOV et des helminthes, le socio-environnement de Bamako a été caractérisé. Pour cela, les données du recensement général de la population et de l'habitat (RGPH) de 2009 ont été exploitées. Ces données fournissent des informations sur les pratiques et les caractéristiques des ménages de la ville, regroupées par districts de dénombrement (DD) ou sections d'enumeration (SE). Les données décrivant les pièces échantillonnées (cf. section II.A.1, Annexe 1, ci-après "données d'habitat") ont également été utilisées.

Afin de réduire la dimensionnalité de ces données et d'en extraire les informations les plus pertinentes, des analyses multivariées ont été utilisées. Les données du RGPH ont été soumises à des Classification Ascendantes Hiérarchiques (CAH) réalisées en parallèle du stage (coll. M. Bertrand, IRD-CESSMA) à l'échelle de la ville, permettant ainsi de générer des variables consensus qualitatives décrivant les niveaux de densité humaine et d'hygiène de chaque DD. Une Analyse des Correspondances Multiples (ACM) a été effectuée sur les données collectées lors du piégeage en utilisant la fonction *MCA* du package FactoMineR (v.1.1-32)⁶². L'ACM est une méthode d'ordination permettant la visualisation, dans des espaces réduits, d'un système multidimensionnel défini par le tableau disjonctif

complet de variables catégorielles. Ces espaces sont délimités par des axes orthogonaux qui maximisent la somme des rapports de corrélations des variables qualitatives au carré⁶³. Cette analyse a été réalisée en prenant en compte les variables suivantes à l'échelle de la pièce échantillonnée : les matériaux des murs, du plafond et du sol, le type de pièce et la présence ou non de stock alimentaire. Elle a été faite sur l'ensemble des pièces distinctes où des *R. norvegicus* ont été piégés, afin de représenter au mieux la variabilité de leurs habitats. L'ACM étant sensible aux modalités rares, le nombre de modalités des variables qualitatives a été réduit en les regroupant. Lorsque deux types de modalités étaient notés simultanément, c'est la plus perméable aux rongeurs qui a été retenue (p. ex. Terre > Banco > Ciment > Zinc).

Les coordonnées sur le premier axe de l'ACM (A_1) et les variables issues de la CAH ont été utilisées pour des analyses ultérieures (cf. section II.C.3).

3. Caractérisation de la maturité sexuelle des *Rattus norvegicus*

Le statut des juvéniles peut entraîner un biais dans la détermination du nombre d'individus infectés par SEOV de par la transmission d'IgG anti-SEOV maternelles non-persistantes par une mère séropositive (juvéniles séropositifs non infectés)⁶⁴. L'estimation précise de l'âge des rongeurs sauvages peut être particulièrement complexe et nécessiter des informations morphométriques spécifiques⁶⁵ qui n'ont pas été collectées. Par conséquent, les individus ont été classés en fonction de leur maturité sexuelle, qui a été utilisée comme un indicateur du statut juvénile/adulte.

La maturité sexuelle de chaque *R. norvegicus* piégés ($n = 350$) a été caractérisée selon une méthode développée par un membre de notre groupe thématique (R. Gallet, INRAE-CBGP). Cette méthode repose sur l'établissement d'un seuil discriminant de manière optimale des individus préalablement définis comme matures ou immatures (travaux non publiés). Pour cela, les individus ont dans un premier temps été classés en fonction du développement de leur scrotum et de leurs vésicules séminales pour les mâles, ainsi que de leur perforation vulvaire, de leur développement mammaire, de la présence de cicatrices placentaires, et de leur statut lactant et/ou gestant pour les femelles. Si au moins un de ces traits était développé, l'individu était classé comme mature ($n = 223$). Si aucun de ces traits n'était développé, l'individu était considéré comme immature ($n = 109$), sauf si au moins une information était manquante ou jugée imprécise, auquel cas l'individu était considéré comme de classe indéterminée ($n = 18$).

En utilisant la fonction *cutpointr* du package *cutpointr* (v.1.1.2)⁶⁶, une valeur seuil optimale de poids a ensuite été déterminée pour chaque sexe (cf. Annexe 2), permettant de catégoriser les individus indéterminés comme immatures s'ils pesaient moins de 88 g pour les femelles (AUC 0,986 ; précision 0,959 ; sensibilité 0,945 ; spécificité 1) et moins de 127 g pour les mâles (AUC 0,979 ; précision 0,942 ; sensibilité 0,897 ; spécificité 1). Une autre valeur seuil a été déterminée pour les mâles en utilisant la longueur testiculaire (14 mm ; AUC 0,979 ; précision 0,969 ; sensibilité 0,947 ; spécificité 1), ce qui a permis de classer les individus masculins indéterminés ($n = 11$) de manière identique au seuil établi sur le poids.

B. Détection et identification des cortèges parasitaires

1. Détection d'IgG anti-SEOV par test ELISA indirect

L'ensemble des analyses sérologiques ont été réalisées avec Caroline Tatard (technicienne de recherche INRAE-CBGP) dans le laboratoire de niveau 2 du CBGP. La présence d'IgG anti-SEOV a été détectée par test ELISA grâce à un antigène recombinant (nucléoprotéine recombinante HTV-001, *Prospec*). Comme pour la plupart des orthohantavirus, l'infection par le virus Seoul est considérée comme étant chronique chez le rongeur^{67,68}. La présence d'IgG anti-orthohantavirus chez les rats mûrs sexuellement constitue donc un témoin de la présence très probable d'une infection persistante au SEOV.

Le test ELISA a été effectué à partir des sérobuards de *R. norvegicus* maliens conditionnés à température ambiante. Des poinçons (6 mm) de buvard ont été inactivés dans 75µL de PBS 1X Tween 0,1% sous étuve (30 min à 60°C) puis laissé à éluer sous agitation (une nuit à température ambiante). Les échantillons provenant de chaque sujet ont été incubés avec deux types d'antigènes. Le premier étant l'HTV-001 et le second un antigène recombinant du virus de Lassa (LSV-002, *Prospec*) produit dans le même système que l'antigène HTV-001 (en levure, avec une étiquette 6His) et servant d'antigène négatif (détermination du bruit de fond).

Les antigènes ont été adsorbés à des plaques POLYSORP par incubation de 25 ng d'antigène (incubé une nuit à 4°C). Après trois lavages au PBS 1X Tween 0,1%, 10µL d'éluat de buvard et 100µL de PBS 1X Tween 0,1% lait 3% ont été mis à incuber sur la plaque (1h à 37°C). Un éluat préalablement testé positif et un autre préalablement testé négatif ont été utilisés comme témoins pour chaque plaque. Après six lavages au PBS 1X Tween 0,1%, 100µL d'une solution de PBS 1X Tween 0,1% lait 3% IgG anti-rat de lapin couplé à la peroxydase 20µg.mL⁻¹ ont été mis à incuber (1h à 37°C). Après six lavages au PBS 1X Tween 0,1%, 100µL de TMB (à cinétique lente) ont été ajoutés afin de détecter l'activité de la peroxydase. L'observation d'une coloration bleu au niveau du puits sert d'indicateur de la présence de peroxydase et indique la fixation spécifique d'anticorps secondaires de rats à des anticorps précédemment fixés sur les antigènes adsorbés. La réaction enzymatique a été arrêtée par l'ajout de 100µL d'acide phosphorique 10,6% après une dizaine de minutes. Le produit formé par le TMB sous l'action de la peroxydase prend alors une couleur jaune (absorbance max 450 nm). L'absorbance a ensuite été mesurée à 450 et 620 nm. La densité optique (DO) corrigée correspondant à chaque échantillon a été déterminée tel que :

$$\Delta DO = DO\ 450nm - DO\ 620nm$$

$$\Delta DO \text{ corrigée} = \Delta DO \text{ antigène HTNV} - \Delta DO \text{ antigène Lassa}$$

Les échantillons dont la valeur de DO corrigée était supérieure à 0,1 ont été considérés comme séropositifs. Ce seuil arbitraire a été déterminé d'après la littérature et à partir d'une gamme étalon réalisée avant le début du stage. Les individus douteux, dont la valeur de DO était proche de la valeur seuil, ont été repassés au test ELISA.

Tous les individus testés positifs ont été soumis à un second test ELISA selon la même procédure, en utilisant l'antigène recombinant HTV-001 ainsi que l'antigène THAIV, produit à partir de cultures virales de *Thailand orthohantavirus*. Les deux antigènes utilisés lors de ce second test ont montré une congruence de 100 %. Seuls les séropositifs répétables entre les deux tests ELISA réalisés ont été conservés.

2. Détection et identification taxonomique des helminthes gastro-intestinaux

En raison de considérations pratiques (disponibilité des échantillons, contraintes de temps, etc.), la détection des helminthes n'a pas été effectuée pour tous les rats échantillonnés. Un sous-échantillon a été sélectionné pour permettre au mieux l'analyse des associations entre helminthes et SEOV. Tout d'abord, seuls les rats provenant des quartiers où il existait des preuves de la circulation du virus SEOV ont été choisis (cf. Figure 2). Ensuite, parmi ces rats, seuls les individus sexuellement matures ont été retenus (cf. section II.A.3). Enfin, les femelles gestantes n'ont pas été incluses en raison du biais potentiel que pourraient constituer les perturbations hormonales et immunologiques liées à la gestation sur la composition en parasites⁶⁹.

Afin d'assurer l'obtention d'un niveau taxonomique fiable et précis pour les helminthes, une combinaison d'approches morphologique et moléculaire a été employée.

i. Tri et identification morphotypique des helminthes

Les membres de l'équipe de l'IER du Mali ont réalisé la dissection des tubes digestifs disponibles ($n = 153$) parmi les rats sélectionnés. Chaque partie du système digestif (estomac, intestin grêle, gros intestin et cæcum) a été examinée séparément afin de détecter la présence d'helminthes⁷⁰. Les vers collectés pour chaque rat ont été soigneusement retirés, comptés et classés en différents morphotypes, sur la base de clés de détermination^{71,72} permettant une pré-identification à l'échelle de la famille ou du genre (p. ex. *Acanthocephala*, *Cestoda*, *Gongylonema*, *Pterygodermatites*) et placés dans de l'alcool à 96 %.

L'identité des morphotypes primo-renseignés a ensuite été vérifiée sous la supervision de Christophe Diagne (IRD-CBGP) au laboratoire de niveau 2 du CBGP, avant d'entreprendre l'identification moléculaire.

ii. Identification moléculaire des helminthes

En raison de contraintes logistiques et matérielles, il n'a pas été possible de soumettre tous les helminthes à des analyses de biologie moléculaire pour leur identification. Dans le but de réduire les approximations, tous les morphotypes-hôtes (ensemble d'helminthes partageant un même morphotype au sein d'un hôte) de nématodes disponibles ont été inclus. Cependant, pour les cestodes qui représentent le morphotype le plus prévalent, une sélection visant à assurer une représentativité maximale a été effectuée. Au moins 50% des morphotypes-hôtes par secteur d'échantillonnage ont été choisis pour un total de 72 % ($n = 60$) de l'ensemble des morphotypes-hôtes de cestodes.

Pour procéder à l'identification moléculaire, la partie médiane du corps d'un helminthe par morphotype-hôte a été mise en tube en vue de l'extraction. Les parties antérieure et postérieure ont été préservées dans de l'éthanol 96 % pour une éventuelle investigation morpho-anatomique ultérieure. L'ADN total a été extrait sur membrane de silice (encadrement P. Gauthier, ingénieur d'étude IRD-CBGP) en utilisant le kit 96-Well Plate Genomic DNA Minipreps (*Biobasics*) conformément aux recommandations du fabricant. Le produit d'extraction a été élué dans un volume final de 200µL de tampon.

Les amores COX1-F1 : 5'-TTG RTT TTT TGG TCA TCC TGA RG-3' et COX1-R1 : 5'-WSY MAC WAC ATA ATA AGT ATC ATG-3' ont ensuite permis l'amplification partielle (~ 400 pb) du gène *cytochrome oxydase de type I* (CO1)⁷³. Ce gène, présent sur l'ADN mitochondrial, code pour une protéine impliquée dans le complexe de la chaîne respiratoire. Il est très largement utilisé comme marqueur moléculaire standard pour l'identification taxonomique de diverses espèces animales⁷⁴ dont d'helminthes⁷⁵. Chaque réaction PCR a été réalisée dans un volume total de 20µL contenant 2µL de produit d'extraction, 1X de Premix QIAGEN multiplex et 0,2µM de chaque amorce, complétés par de l'eau purifiée. L'ensemble des PCR a été réalisé dans le thermocycleur *Eppendorf Nexus Gradient*. Le protocole de PCR comporte une pré-incubation de 15 minutes à 95°C suivie de 40 cycles d'amplification à 94°C 30s, 50°C 90s, 72°C 90s ainsi qu'une élongation finale à 72°C 10 minutes. L'amplification a été contrôlée par le passage des produits PCR en électrophorèse sur gel d'agarose 1,5%. Chaque plaque utilisée contenait deux témoins d'extraction et un témoin PCR.

Les produits PCR validés par électrophorèse ont été séquencés dans les deux sens selon la méthode Sanger (prestation *Eurofins MWG*). Les séquences obtenues ont été nettoyées, assemblées et alignées (encadrement J. Tavoillot, assistante ingénierie IRD-CBGP) sur Geneious (v.11.1.5) et Mega X (v.10.2.5-1)⁷⁶. Par la suite, ces séquences ont été comparées à celles présentes dans les bases de données publiques GenBank⁷⁷ et BOLD⁷⁸, dans le but de leur attribuer une identité taxonomique. Les séquences homologues avec une similarité inférieure à 97% n'ont pas été considérées. Pour soutenir l'identification moléculaire obtenue, nos séquences ont été comparées à celles d'une base de référence constituée localement par les membres de notre groupe thématique, en amont du stage. Cette base a été

développée en séquençant des helminthes de rongeurs provenant de différentes régions d'Afrique de l'Ouest, et dont l'identification morphologique a été assurée par un spécialiste.

Certains morphotypes-hôtes n'ont cependant pas pu être identifiés à l'échelle de l'espèce, du fait de séquences n'ayant pas trouvé de correspondance satisfaisante avec celles comprises dans les bases de données considérées. Il a donc été nécessaire de regrouper les helminthes en groupes cohérents pour réaliser les analyses statistiques. Lorsqu'il n'y avait pas d'ambiguïté parmi les espèces ou genre identifiés au sein d'un morphotype, tous les helminthes du même morphotype ont été regroupés au niveau du seul groupe identifié (c.-à-d. *G. neoplasticum*, *Pterygodermatites* spp.). A l'inverse, lorsque plusieurs espèces par morphotype semblaient coexister, les espèces ont été regroupées au niveau du taxon supérieur partagé identifié (c.-à-d. *Cestoda* spp., *Trichostrongylidae* spp.).

C. Analyses des patrons d'associations entre communauté d'helminthes et anticorps anti-SEOV

Les groupes d'helminthes dont la prévalence globale était inférieure à 5% (c.-à-d. les indéterminés) n'ont pas été considérés dans l'analyse. Le risque α de première espèce a été fixé à 5%. Les données ont été explorées selon la méthode décrite par Zuur et al. (2010)⁷⁹, avant la mise en place des analyses.

1. Détection des associations basée sur les probabilités d'occurrence

Dans un premier temps, les associations entre parasites (anticorps anti-SEOV et helminthes de prévalence >5%) ont été étudiées sans *a priori* par une approche de détection d'associations (*syn. SCA* pour "Screening Analyses") basée sur la fréquence des co-occurrences⁸⁰. Cette méthode permet d'identifier les combinaisons exclusives de parasites dont l'effectif observé diffère de celui attendu par le fait du hasard, sachant la prévalence globale de chaque parasite. Pour ce faire, des simulations sont utilisées pour générer un intervalle de confiance de 95% pour chaque effectif de combinaison sous l'hypothèse nulle. Celle-ci stipule que la probabilité d'infection d'un individu par les parasites de cette combinaison dépend uniquement de la prévalence de ces parasites. Pour les combinaisons exclusives dont l'effectif observé se trouve en dehors de l'intervalle de confiance, l'hypothèse nulle est rejetée. La fonction utilisée est détaillée dans la publication de Vaumourin et al. (2014)⁸⁰.

2. Analyses multivariées

Des analyses multivariées ont été réalisées avec le package *vegan* (v.2.6-4)⁸¹ pour étudier le lien entre la communauté d'helminthes (prévalence >5%) et la présence d'anticorps anti-SEOV.

Dans un premier temps, l'indice de Bray-Curtis a été calculé sur le jeu de données "helminthes" afin d'identifier les différences de composition des infracommunautés d'helminthes entre rats. Cet indice de diversité bêta permet d'évaluer la dissimilarité entre communautés en se basant sur l'abondance relative des taxons. L'indice a ici été utilisé sous sa forme exacte, sans standardisation.

Un positionnement multidimensionnel non-métrique (nMDS) à deux dimensions a été réalisé grâce à la fonction *metaMDS* pour représenter la matrice de dissimilarité. Cette méthode d'ordination permet de représenter une matrice non-métrique en cherchant, par un processus itératif, à conserver au mieux les distances relatives entre communautés dans un espace de dimensions choisies⁸².

Dans un second temps, nous avons testé s'il y avait des différences significatives de composition des communautés d'helminthes entre les individus séropositifs et séronégatifs à SEOV. Pour cela, une PERMANOVA (Permutational Multivariate Analysis of Variance) a été réalisée avec la fonction *adonis2*. Cette méthode permet de

tester si les centroïdes ou la dispersion des communautés dans l'espace de mesure sont différents entre groupes⁸³. Elle repose sur des permutations aléatoires des données pour évaluer la significativité des différences observées.

Parallèlement, un test PERMDISP a été effectué avec les fonctions *betadisper* et *permute* pour comparer la dispersion intra-groupe des deux groupes (séronégatifs et séropositifs à SEOV). Ce test permet d'évaluer si la variabilité des communautés à l'intérieur de chaque groupe est significativement différente grâce à l'emploi de permutations.

3. Modèles linéaires généralisés à effets mixtes

Pour tenir compte des facteurs potentiellement confondants dans l'analyse des associations (facteurs individuels ou environnementaux), la probabilité d'être séropositif au SEOV a été modélisée à l'aide de modèles linéaires généralisés à effets mixtes (GLMM). Les GLMM permettent de modéliser la relation entre une variable dépendante, peu importe sa distribution, et un ensemble de variables indépendantes à effet fixe ou aléatoire. L'utilisation d'effets aléatoires permet notamment de prendre en compte la variation des effets entre différentes unités d'observation dans le modèle, ce qui permet de considérer la non-indépendance des données à l'échelle de ces unités^{84,85}.

L'ensemble des modèles testés ont été créés à partir de la fonction *glmer* du package lme4 (v.1.1-32)⁸⁶. Une régression logistique (GLMM de fonction de lien *logit*) a été employée pour modéliser la probabilité d'infection en utilisant le logarithme des rapports de cotes (*syn. odd ratio*), ce qui assure que la probabilité soit bornée entre 0 et 1. La variable dépendante utilisée est la présence/absence d'IgG anti-SEOV dans l'hôte modélisée selon une distribution de Bernoulli. Le quartier d'échantillonnage a été considéré comme effet aléatoire appliqué à l'ordonnée à l'origine.

Afin d'identifier les variables susceptibles de moduler l'exposition au SEOV, nous avons employé comme variables explicatives des facteurs intrinsèques à l'hôte (sex et poids), à son socio-environnement (densité, hygiène et coordonnées sur l'axe A₁ de l'ACM réalisée sur les données d'habitats, cf. section III.A) et à ses helminthes.

Pour les helminthes, trois types de variables explicatives ont été utilisées alternativement dans les modèles. En effet, l'infection du rat par un helminthe peut être représentée par une information relative i) soit à la présence ou non de l'helminthe (ci-après "données de présence/absence"), ii) soit à son abondance (c.-à-d. le nombre de spécimens par morphotype chez chaque individu, y compris ceux qui ne sont pas parasités) ou son intensité (c.-à-d. le nombre de spécimens par morphotype chez chaque individu infecté par un helminthe donné), indicatrices de la charge parasitaire.

En conséquence, trois stratégies de modèles ont été implémentées, selon que les variables "helminthes" considérées correspondaient aux données de présence/absence, d'abondance ou d'intensité. L'emploi parallèle de ces trois approches vise à identifier d'éventuelles associations liées à l'impact des interactions entre parasites sur le développement ou la probabilité d'infection de chacun des parasites impliqués. Plus spécifiquement, nous évaluons 1) les probabilités de co-occurrence SEOV-helminthe chez l'hôte (données de présence/absence), et 2) les liens entre infection à SEOV et charge parasitaire en helminthes (données d'abondance tenant compte de la probabilité d'infection; données d'intensité focalisées sur les individus infectés). L'influence de l'intensité parasitaire a été testée de manière successive pour les taxons d'helminthes prévalents à plus de 10% puisqu'elle implique une réduction importante du jeu de données par le retrait des individus non parasités par l'helminthe considéré.

La richesse taxonomique en helminthes a aussi été utilisée comme variable explicative dans les modèles testant l'influence de la charge parasitaire.

Une approche de sélection de modèles a été utilisée en partant de modèles globaux incluant les variables explicatives considérées. Pour chaque modèle global, les meilleurs modèles dérivés ont été sélectionnés à l'aide du critère d'information d'Akaike corrigé pour les petits échantillons (AICc)^{87,88}. Ce critère évalue la capacité explicative

d'un modèle tout en pénalisant l'utilisation excessive de variables indépendantes. L'AICc a été calculé pour tous les modèles dérivés à l'aide de la fonction *dredge* du package MuMIn (v.1.47.5)⁸⁹. Les modèles dérivés présentant une différence d'AICc inférieure à deux par rapport au modèle ayant l'AICc le plus faible ont été conservés et considérés comme équivalents⁸⁸. Parmi eux, le modèle le plus parcimonieux (c.-à-d. contenant le moins de variables explicatives à effet fixe) a été conservé. L'ajustement de ce modèle a été vérifié par le contrôle des résidus standardisés simulés par la fonction *simulateResiduals* du package DHARMA (v.0.4.6)⁹⁰. La colinéarité entre variables a été contrôlée *a priori* et *a posteriori* par mesure du GVIF (generalized variance inflation factor)⁹¹. La part de la variation expliquée par le modèle a été déterminée à titre informatif par le calcul du coefficient de détermination (R^2) de Nakagawa adapté aux modèles mixtes⁹², grâce au package performance (v.0.10.2)⁹³. Nous avons finalement utilisé des tests de déletion pour évaluer la significativité des variables indépendantes dans le meilleur modèle valide. À l'aide de tests du rapport de vraisemblance, nous avons déterminé si l'ajout d'une variable modifiait de manière significative la vraisemblance du modèle.

III. RÉSULTATS

A. Analyse du socio-environnement

Un total de 2050 pièces distinctes ont été échantillonnées dans le cadre du piégeage des rats à Bamako. Dans 270 d'entre elles, des rats bruns ont été capturés. L'analyse des correspondances multiples (ACM) a été effectuée sur les données collectées pour ces dernières.

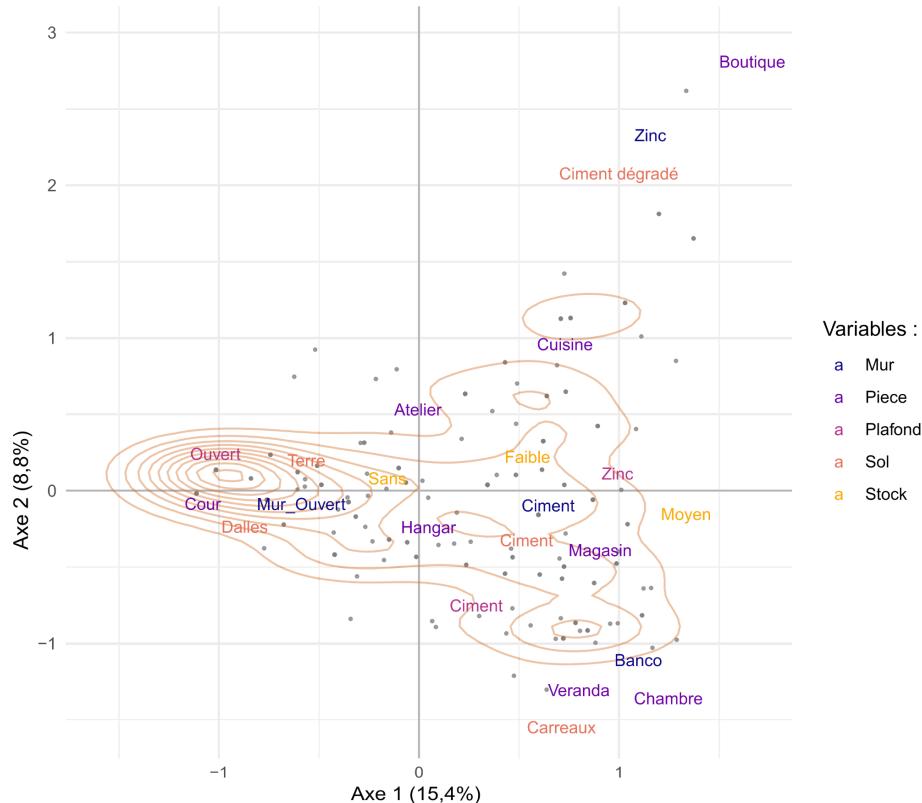


Figure 1. Analyse des Correspondances Multiples des données d'habitat sur le premier plan factoriel (24.2 %)

ACM réalisée à partir des variables matériaux des murs, du plafond et du sol, type de pièce et présence/quantité de stock alimentaire pour les 270 pièces distinctes où ont été piégés des rats bruns. Le graphique représente la projection des pièces et modalités sur le premier plan. La densité des points a été représentée par des lignes de niveaux pour palier aux nombreuses superpositions.

Le premier axe de l'ACM (A_1) explique 15,4% de l'inertie totale, le deuxième 8,8% et le troisième 8,3%. Le premier plan factoriel explique donc 24,2 % de l'inertie. Les variables “Pièce”, “Plafond” et “Mur” sont les principales contributrices du premier axe avec η^2 (A_1 , Pièce) = 0,79, η^2 (A_1 , Plafond) = 0,72 et η^2 (A_1 , Mur) = 0,68. Le deuxième axe est principalement défini par “Pièce et “Mur”, η^2 (A_2 , Pièce) = 0,66, η^2 (A_2 , Plafond) = 0,41.

La représentation des projections sur le premier plan factoriel permet d'identifier les associations entre modalités et la distribution relative des pièces dans l'espace défini (Figure 1). Le premier axe semble séparer les modalités correspondant aux pièces les plus perméables (p. ex. cour, terre) des plus imperméables (p. ex. chambre, zinc). Les cours sont surreprésentées dans le jeu de données utilisé. Elles constituent 45% ($n = 122$) des pièces où des rats buns ont été piégés, alors qu'elles représentent 28% ($n = 574$) de toutes les pièces échantillonnées et 27% des pièces dans lesquelles des petits mammifères ont été capturés ($n = 958$).

Le deuxième axe de l'ACM est difficilement interprétable et est potentiellement influencé par des modalités de faibles occurrences comme “Boutique” ($n = 8$). Seul le premier axe a été conservé afin de caractériser le bâti où vivent les rats piégés.

B. Détection et identification des cortèges parasitaires

1. Présence d'anticorps anti-SEOV

La présence d'anticorps anti-SEOV a été testée sur le jeu de données initial comprenant 350 *R. norvegicus*, dont 227 caractérisés comme sexuellement matures et 123 comme immatures. Parmi les individus matures, 44 étaient des femelles gestantes. Le sexe-ratio global du jeu initial est de 0,74 et de 0,77 pour le sous-jeu sélectionné pour les analyses d'helminthes (Tableau 1).

Quartier	Tous rats bruns piégés n= 350				Sous-jeu sélectionné N = 153						
	Total	M/F	I/M	SEOV	Total	M/F	SEOV	Ces	Gon	Pte	Tri
Badalabougou	25	1,27	0,32	2	16	1,67	2	14	6	3	1
Bamako Coura	26	0,73	1,36	8	5	1,50	1	2	2	3	0
Banconi	37	1,18	0,54	3	18	1,25	3	4	6	5	0
Fadjiguita	30	0,67	0,36	5	15	0,67	4	5	5	5	0
Hippodrome	23	0,21	0,53	2	9	0,13	1	5	6	3	0
Kalabambougou	13	2,25	0,30	3	9	8,00	2	4	2	1	3
Lafiabougou	41	1,28	1,05	0							
Medina Coura	18	0,38	0,29	4	12	0,50	3	6	5	3	0
Missabougou	22	0,69	0,29	9	15	0,88	6	14	8	4	7
Niamakoro	25	0,25	0,47	3	11	0,57	3	6	9	3	1
Niarela	26	0,63	0,73	3	14	0,40	3	11	6	2	1
Ouolofobougou	19	0,73	0,58	4	9	0,50	4	4	0	3	0
Sabalibougou	28	0,65	0,27	8	20	0,54	7	8	5	4	0
Sotuba	17	0,89	0,89	0							
TOTAL	350	0,74	0,54	54	153	0,78	39	83	60	39	13

Tableau 1. Nombre d'individus analysés et nombre d'individus parasités (présence d'anticorps anti-SEOV et présence d'helminthes) dans les différents quartiers de Bamako.

M/F: ratio mâle/femelle; I/M: ratio immature/mature; Ces: *Cestoda* spp.; Gon : *G. neoplasticum*; ; Pte: *Pterygodermatites* spp. ; Tri: *Trichonstrygilidae* spp.

La séroprévalence apparente sur le jeu de données global est de 15%. Parmi les individus immatures, 3% ($n = 4$) ont été testés séropositifs contre 22% ($n = 50$) pour les matures. Parmi les femelles gestantes, 25% ($n = 11$) ont été testées séropositives. La séroprévalence varie entre quartiers, oscillant entre 0% et 41% au sein des quartiers avec des cas. La répartition des individus séropositifs s'étend sur l'ensemble du district de Bamako, à l'exception des quartiers périphériques de Lafiabougou ($n = 41$) et Sotuba ($n = 17$) où aucun individu séropositif n'a été recensé (Figure 2).

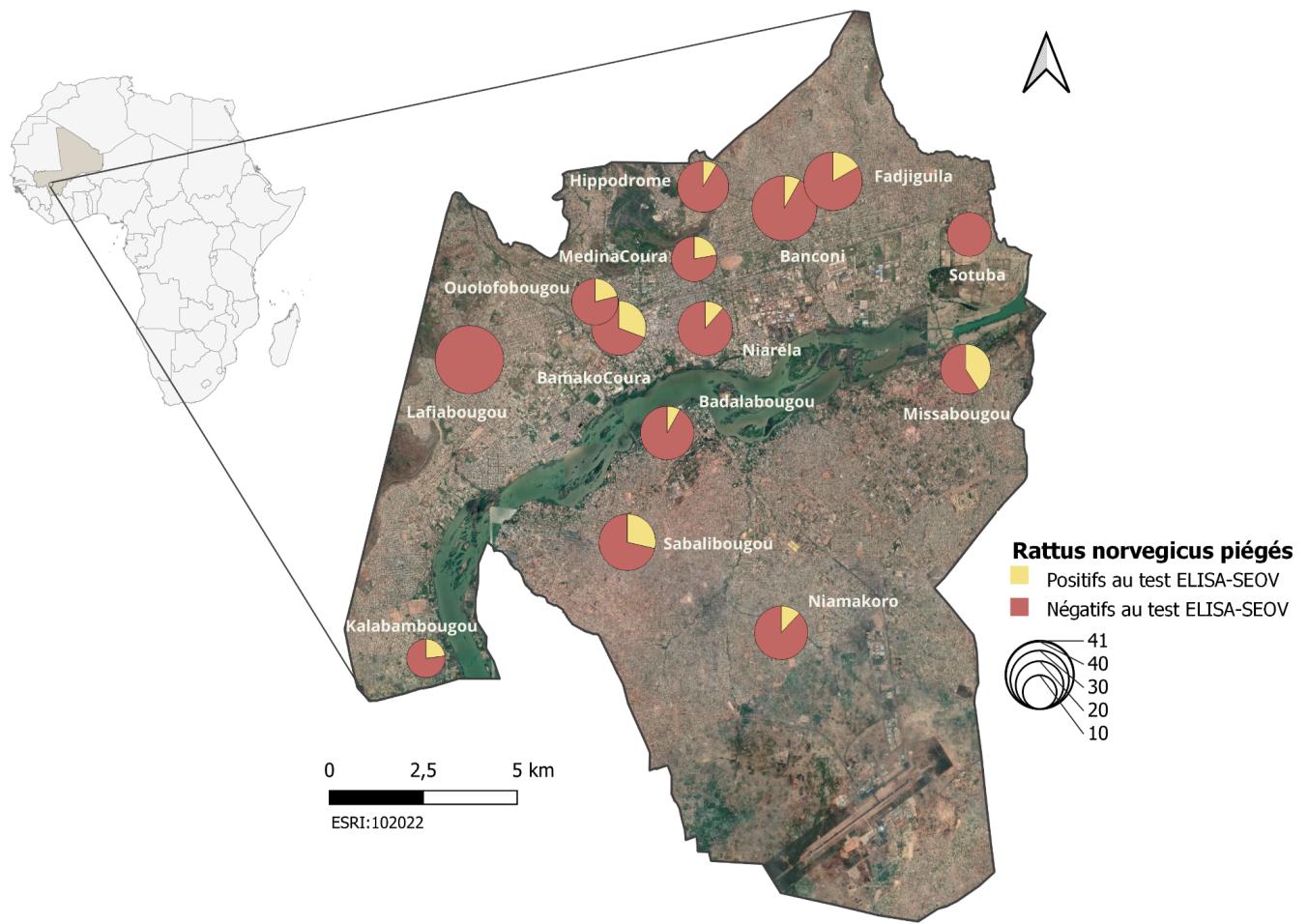


Figure 2. Séroprévalence (IgG anti-SEOV) des *R. norvegicus* dans les différents quartiers de Bamako.

Carte réalisée sur QGIS (v. 3.28.1) à partir des statuts sérologiques fournis par le test ELISA HTV-001 sur les 350 rats bruns piégés à Bamako entre 2021-2022, individus immatures et femelles gestantes compris.

2. Détection et diversité des helminthes gastro-intestinaux

La détection des helminthes a été réalisée sur 153 tubes digestifs provenant des rats matures sexuellement (à l'exception des femelles gestantes) issus des quartiers présentant des cas séropositifs à SEOV. Sur les individus examinés, 74% ($n = 113$) étaient infectés par au moins un helminthe. Le nombre de morphotypes distincts retrouvés par individu variait entre 0 et 3.

Une identité moléculaire a été obtenue pour 76% des morphotypes-hôtes d'helminthes (Annexe 3). Parmi ceux-ci, on compte des *Cestoda* spp. : *Hymenolepis diminuta* ($n = 42$), *Hymenolepis nana* ($n = 6$) et *Cestoda* spp. ($n = 9$) ; des *Trichostrongylidae* : *Nippostrongylus brasiliensis* ($n = 9$) et *Trichostrongylidae* sp ($n = 1$) ; des *Gongylonema neoplasticum* ($n = 55$) et des *Pterygodermatites* spp. ($n = 37$). Pour les spécimens pour lesquels nous n'avons pas pu

obtenir d'information moléculaire fiable, une généralisation a été faite afin de les assigner à des taxons. Cette généralisation s'est faite sur la base des informations moléculaires obtenues pour les autres morphotypes-hôtes et des critères morphologiques (cf. section II.B.2.ii). Malgré cela, la nature de quatre morphotypes-hôtes reste indéterminée.

On obtient une prévalence globale de 54% pour les *Cestoda* spp. (Tableau 1), avec une abondance moyenne de 0,77 (variance = 1,01) et de 39% pour les *G. neoplasticum*, avec une abondance moyenne de 2,43 (variance = 23,42).

C. Analyse des associations SEOV - helminthes

1. Détection des associations basée sur les probabilités d'occurrence

Parmi les 153 rats bruns matures (hors femelles gestantes) issus des quartiers présentant des cas de séropositif SEOV, 53% ($n = 82$) des individus sont infectés par au moins deux parasites et 87% ($n = 34$) des individus séropositifs sont infectés par au moins un helminthe.

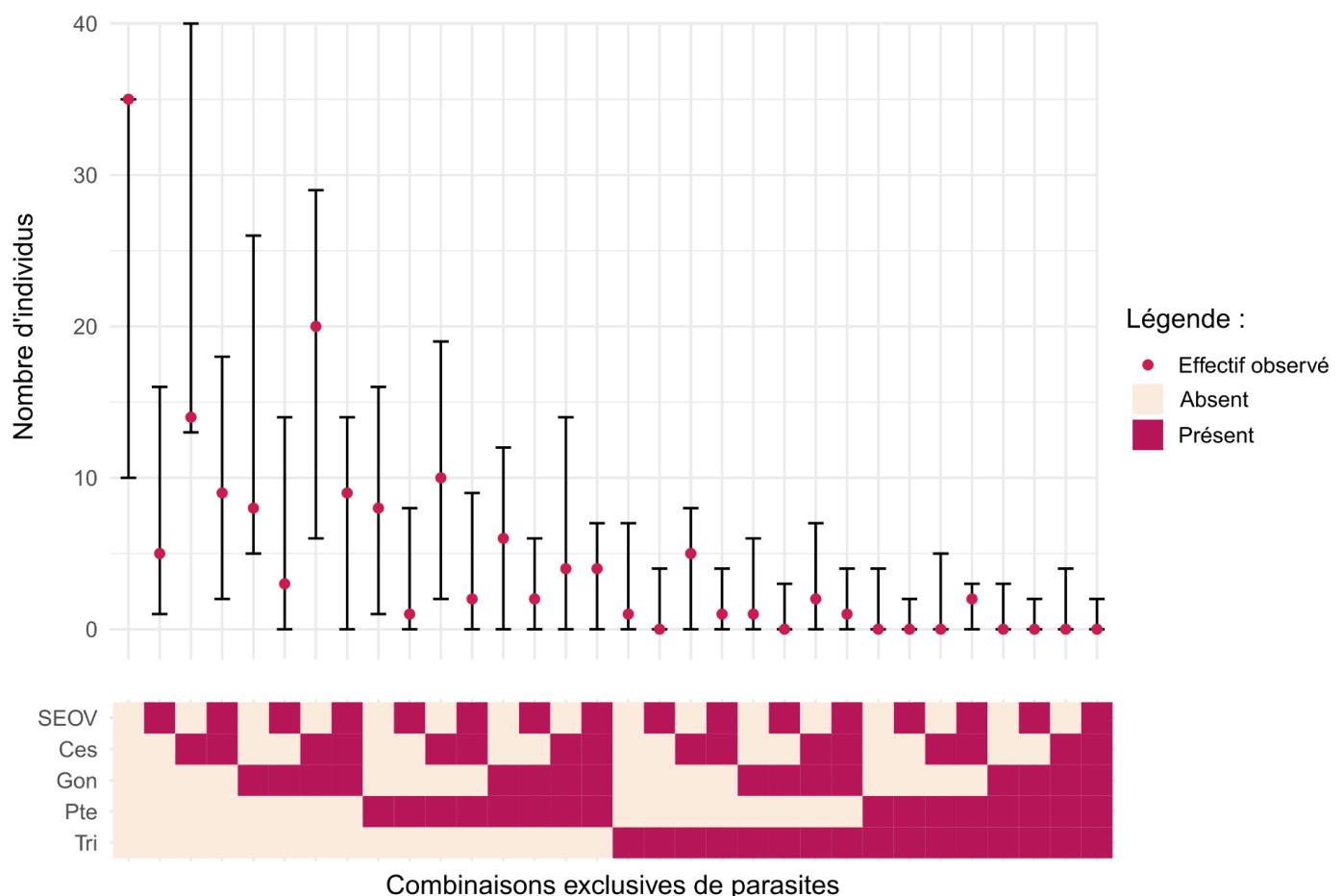


Figure 3. Criblage des combinaisons exclusives de parasites par SCA

Représentation des intervalles de confiance 95% de chaque combinaison exclusive de parasites sous l'hypothèse nulle. L'effectif observé pour chacune est marqué d'un point rouge. L'analyse SCA a été réalisée sur les rats bruns matures (à l'exception des femelles gestantes) à partir des données d'occurrences de IgG anti-SEOV, Ces : *Cestoda* spp., Gon : *G. neoplasticum*, Pte : *Pterygodermatites* spp. et Tri : *Trichostrongylidae* spp.

Un total de 32 combinaisons exclusives a été inclus dans l'analyse SCA, qui a été réalisée en utilisant les données d'occurrences d'helminthes et de SEOV (Figure 3). Aucune des combinaisons de parasites n'a son effectif observé en dehors de l'intervalle de confiance. Cette analyse ne permet donc pas la mise en évidence d'associations entre parasites sur la base de leurs probabilités d'occurrences.

2. Analyses multivariées

Des analyses multivariées ont été réalisées à partir des 113 rats matures sexuellement (hors femelles gestantes) issus des quartiers présentant des cas de séropositif SEOV, parasités par au moins un helminthe. Un positionnement multidimensionnel non-métrique (nMDS) sur deux axes a été réalisé à partir des matrices de dissimilarité exactes de Bray-Curtis calculées entre les infracommunautés d'helminthes (Figure 4). Le stress final de la meilleure nMDS est de 0,1541, ce qui témoigne d'une déformation relativement faible des distances relatives.

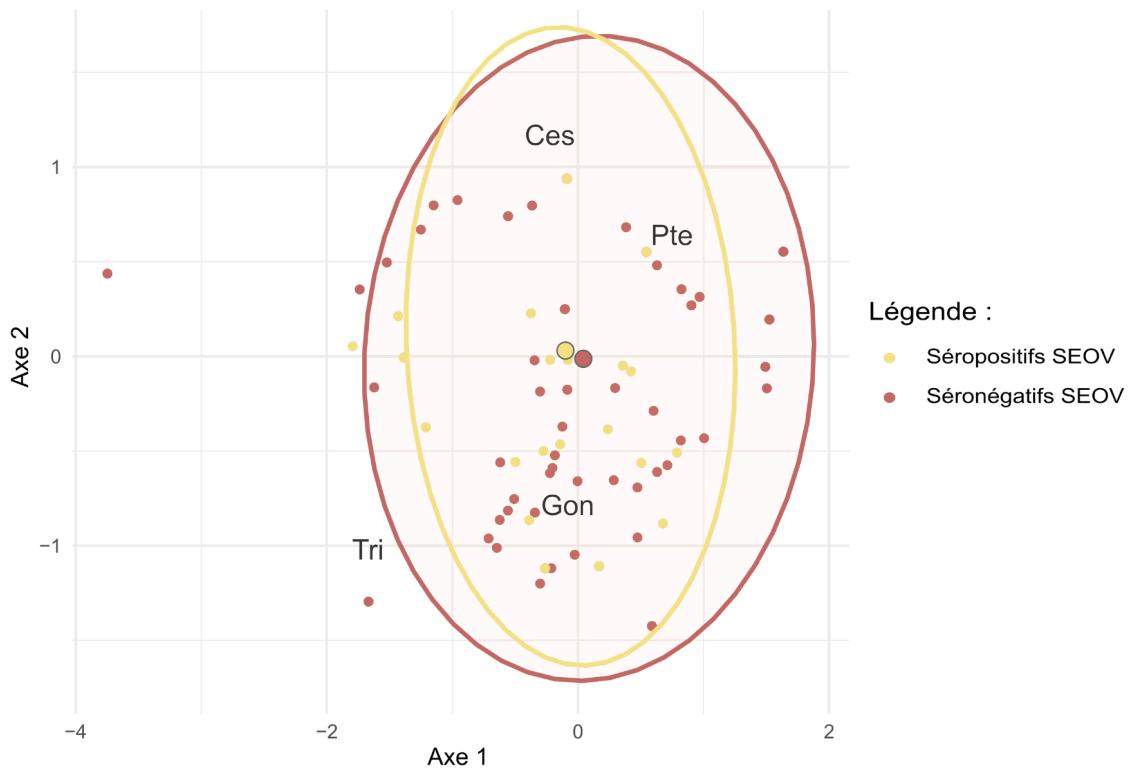


Figure 4. nMDS des infracommunautés d'helminthes regroupées par statut sérologique

nMDS réalisée sur deux axes à partir des matrices de dissimilarité exactes de Bray-Curtis. Les points représentent les infracommunautés d'helminthes pour chaque individu, tandis que les ellipses indiquent la distribution t-multivariée à 95% pour les séropositifs (en jaune) et les séronégatifs (en rouge) à SEOV. Les centroïdes pondérés de chaque groupe d'helminthes sont représentés tels que Ces : *Cestoda* spp., Gon : *G. neoplasticum*, Pte : *Pterygodermatites* spp. et Tri : *Trichostrongylidae* spp. Stress = 0,1541.

Le regroupement des infracommunautés en fonction de la séropositivité à SEOV dans la nMDS ne semble pas indiquer de différence entre ces deux groupes (séronégatifs et séropositifs à SEOV), dont les ellipses de distribution t-multivariée 95% sont très chevauchantes. Cette observation est appuyée par la PERMANOVA qui ne témoigne pas d'une différence significative entre les centroïdes des groupes (pseudo-*F* ratio : 0,947 ; *p*-valeur : 0,412). De même, le test PERMDISP ne témoigne pas d'une différence significative entre la dispersion de ces groupes (permutations : 9999

; p -valeur : 0,0577). Ces résultats ne permettent donc pas de rejeter l'hypothèse nulle selon laquelle les rats séropositifs auraient des infracommunautés d'helminthes de compositions similaires à celles des rats séronégatifs.

3. Modèle linéaires généralisés à effets mixtes

Des GLMM ont été réalisés pour identifier les variables influençant la probabilité d'être séropositif à SEOV à partir des données récoltées pour les 153 rats bruns matures (hors femelles gestantes) issus des quartiers présentant des cas de séropositif à SEOV. Sur la base des critères préalablement décrits (cf. section II.C.3), un total de cinq modèles ont été implémentés. Deux sur la totalité des 153 rats bruns pour étudier l'effet de la présence/absence ou l'abondance des helminthes. Trois pour modéliser l'effet de leur intensité sur des jeux de données réduits ne contenant que les individus parasités par l'helminthe considéré (Tableau 2).

Variable dépendante	Variables confondantes	Variables helminthe	Effectif du jeu	AICc (Δ)	R ² (%)	Variables significatives	Df	GVIF	LRT	p-valeur		
Séropositivité SEOV	Sexe Poids Hygiène Densité A ₁ Quartier	Présence/absence	153	135,6 (1,77)	49,7	Poids	1	1,149	45,731	< 0,0001		
		Abondances et richesse				Sexe	1	5,128	5,128	0,0235		
		Intensité Ces, abondances et richesse	83	74,1 (1,11)	61,5	Poids	1	1,149	45,731	< 0,0001		
		Intensité Gon et abondances et richesse	60	53 (0)	66,1	Sexe	1	5,128	5,63	0,0177		
		Intensité Pte et abondances et richesse	39	40,1 (1,91)	42,8	Poids	1	1,1475	28,911	< 0,0001		
						Intensité Gon	1	4,641	13,014	0,0312		

Tableau 2. Modèles linéaires généralisés à effets mixtes (GLMM) les plus parcimonieux

AICc : critère d'information d'Akaike corrigé pour les petits effectifs. Δ : Différence d'AICc entre le modèle choisi et le modèle ayant l'AICc le plus faible. R² : Coefficient de détermination de Nakagawa. Df : degrés de liberté. GVIF : generalized variance inflation factor. LRT : rapport de vraisemblance lié à la déletion de la variable significative et p -valeur associée. Ces: *Cestoda* spp.; Gon : *G. neoplasticum*; ; Pte: *Pterygodermatites* spp. ; Tri: *Trichonstrygidae* spp. ; A₁ : premier axe de l'ACM réalisée sur les données d'habitats

Au sein de tous les modèles les plus parcimonieux identifiés, le poids est systématiquement ressorti comme une variable ayant un impact significatif (p -valeur < 0,0001) sur la probabilité d'être séropositif à SEOV. Le coefficient estimé pour le poids suggère que les individus les plus lourds ont une plus grande probabilité d'être séropositifs (Figure 5.A). Le sexe a également été identifié comme une variable significativement explicative (p -valeur d'environ 0,02), mais tend à ne plus l'être pour les modèles avec un effectif plus réduit. Les coefficients estimés indiquent que les femelles ont une probabilité plus élevée d'être séropositives que les mâles. Aucune des variables liées au socio-environnement des rats ne fait partie des modèles les plus parcimonieux considérés.

La seule variable "helminthe" ayant montré une influence significative sur la probabilité d'être séropositif au SEOV est l'intensité parasitaire en *G. neoplasticum*. Parmi les individus parasités par *G. neoplasticum*, l'intensité parasitaire a montré une corrélation négative significative avec la séropositivité à SEOV (p -valeur : 0,03). Les individus présentant une charge plus élevée en *Gongylonema* ont donc une probabilité plus faible d'être séropositifs (Figure 5.B). Les modèles examinés permettent d'expliquer entre 42 à 66 % de la variation observée dans la variable dépendante. Les modèles finaux présentent des GVIF relativement faibles et proches de 1, ce qui indique qu'il n'y a pas de multicolinéarité dans ces modèles.

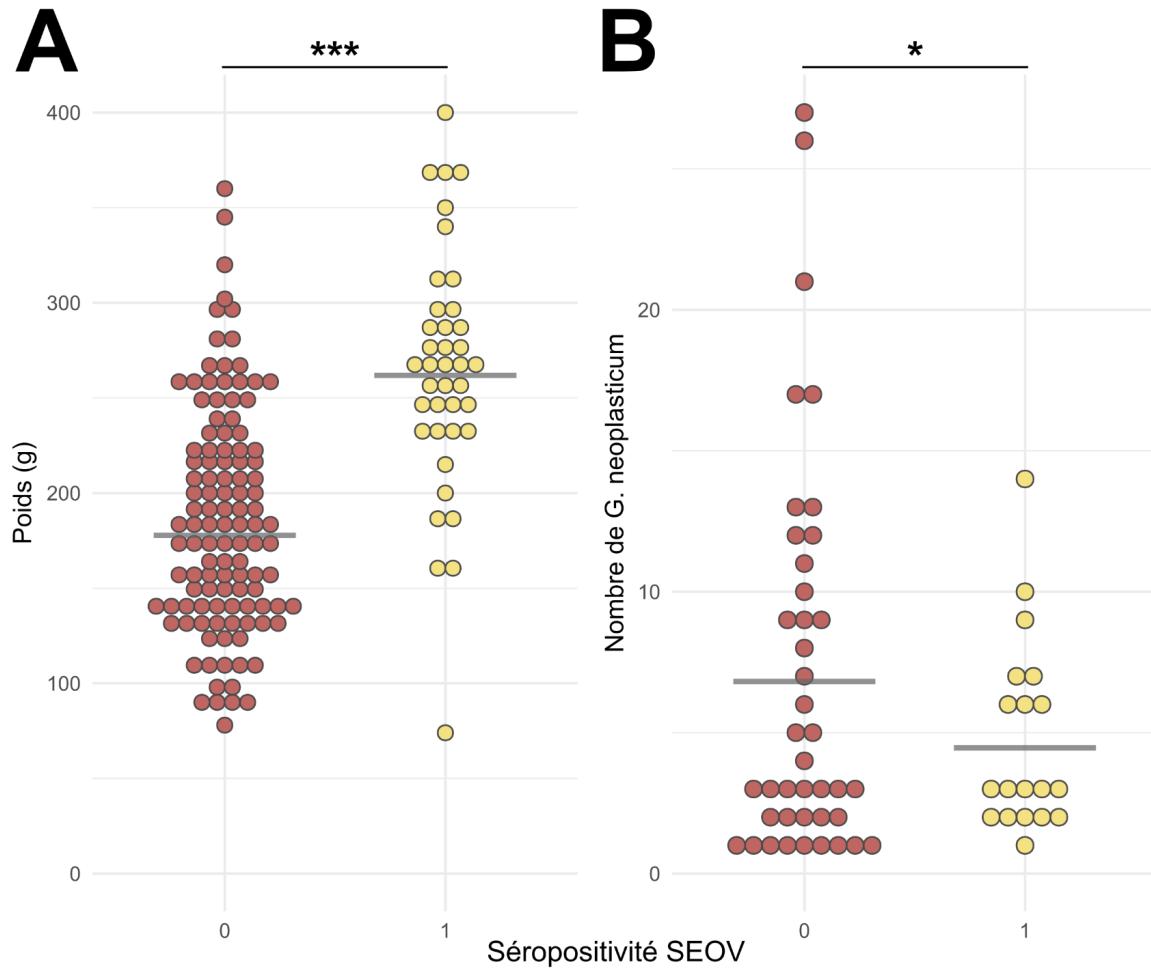


Figure 5. Différences de poids et d'intensité parasitaire (*G. neoplasticum*) entre rats séropositifs et séronégatifs à SEOV

A. Différence de poids entre statuts sérologiques des rats matures (hors femelles gestantes) sélectionnés ($n = 153$; p -valeur <0,0001). B. Différence d'intensité parasitaire des rats matures (hors femelles gestantes) parasités par *G. neoplasticum* entre statuts sérologiques ($n = 60$; p -valeur = 0,03). Des tests de maximum de vraisemblance ont été utilisés pour évaluer la significativité de l'effet étudié sur la séropositivité. Ces tests ont été effectués sur le meilleur modèle linéaire conçu pour expliquer les variations de la séropositivité. Les valeurs moyennes sont représentées par les traits horizontaux gris.

IV. DISCUSSION

Au cours de ce stage, nous avions pour objectif i) d'explorer le pathosystème des rats bruns de Bamako au travers de l'investigation de la circulation du SEOV, dont la présence a été récemment détectée chez des *Rattus* spp. de pays voisins, et des communautés d'helminthes gastro-intestinaux, puis ii) d'explorer les éventuelles associations entre le SEOV et ces communautés d'helminthes gastro-intestinaux. En effet, les interactions potentiellement entretenues entre ce virus et les autres membres du cortège parasitaire des rats restent totalement méconnues et non-étudiées, alors même qu'elles pourraient fortement impacter l'évolution, la pathogenèse ou la transmission des agents pathogènes présents au sein de l'hôte rongeur. La découverte d'associations entre ces parasites pourrait alors constituer le premier indice d'interactions prenant place lors des co-infections SEOV-helminthes, et pourrait donc avoir d'importantes répercussions sur la distribution du SEOV et la santé publique humaine.

Les résultats obtenus ont fourni la première indication d'une circulation très probable du SEOV au Mali, ainsi que la première description de la communauté d'helminthes circulant chez les rats bruns de Bamako. Toutefois, ces résultats n'ont pas apporté de preuves solides concernant des associations entre la séropositivité au SEOV et les helminthes. Néanmoins, ils suggèrent un signal potentiel lié à *G. neoplasticum*, qui nécessite une investigation plus approfondie pour être confirmé.

A. Circulation du SEOV et communautés d'helminthes

Les tests de détection sérologique par ELISA témoignent de la présence de séropositifs à SEOV dans presque tous les quartiers de Bamako. Ce résultat constitue un premier indice important de la circulation du SEOV au Mali. Cependant, il ne constitue pas une preuve sans équivoque de sa présence, car le test sérologique utilisé repose sur les réactions croisées entre orthohantavirus de *Murinae*⁹⁴. Néanmoins, la probabilité que les anticorps détectés soient spécifiquement dirigés contre le SEOV reste très élevée en raison de la grande spécificité des orthohantavirus pour leur hôte, et du fait que, jusqu'à présent, le SEOV demeure le seul orthohantavirus véritablement associé à *R. norvegicus*⁴⁸. La classification MOT (liste des micro-organismes et toxines) dans laquelle était inclus le SEOV au début du stage, empêche légalement la détention de matériel génétique de plus de 500 pb (même inactivé) sur le territoire français (sauf détention d'une autorisation très contraignante à obtenir) et oblige à la destruction des échantillons testés positifs, ce qui exclut donc toute approche de séquençage. La sortie récente (mai 2023) du SEOV de cette liste va permettre de procéder au séquençage de ces virus. De nouveaux échantillons ont d'ores et déjà été collectés dans les quartiers de Missabougou et Fadjiguila, et un séquençage est prévu à partir de l'ARN viral extrait des nouveaux individus testés séropositifs. Le séquençage de ce virus permettra de réaliser la troisième identification non ambiguë du SEOV dans un pays africain (après le Sénégal et le Bénin^{53,54}). Cela permettra aussi d'identifier les souches circulantes du virus à Bamako et de déterminer leurs origines en les comparant aux autres séquences mondiales disponibles dans les banques de données (p. ex. Genbank). Actuellement, l'observation de rats séropositifs à SEOV des deux côtés de la rive du fleuve séparant Bamako et dans la quasi-totalité des quartiers plaide pour une présence déjà bien établie et une introduction non récente du virus dans la ville.

Les résultats obtenus au cours de ce stage ont aussi permis de caractériser la diversité des helminthes gastro-intestinaux présents dans les rats bruns de Bamako. A notre connaissance, ce travail constitue une contribution originale en tant que première description des helminthes gastro-intestinaux de rats bruns en Afrique de l'Ouest. Parmi les espèces identifiées, on retrouve les parasites zoonotiques *H. nana* (*syn. Rodentolepis nana*) et *H. diminuta*⁹⁵. *H. nana* est un cestode particulièrement répandu chez les enfants vivant dans des régions aux conditions sanitaires déficientes⁹⁶. De fait, puisqu'il n'a pas besoin d'hôte intermédiaire pour accomplir son cycle biologique, cet helminthe peut être transmis directement d'humain à humain. Le rat est considéré comme un propagateur efficace du stade

infectieux humain (œufs)⁹⁵, bien que certaines études suggèrent que *H. nana* pourrait constituer un complexe d'espèces cryptiques en raison de différences observées entre les souches isolées chez l'humain et l'hôte rongeur^{97,98}. *H. diminuta*, en revanche, ne peut infecter les humains qu'au travers de l'ingestion d'un arthropode servant d'hôte intermédiaire, en conséquence les cas humains recensés sont beaucoup plus rares⁹⁹.

Malgré l'obtention de séquences de bonnes qualités, une identité moléculaire à l'échelle de l'espèce n'a pas été obtenue pour tous les helminthes (p. ex. *Pterygodermatites* spp. et *Trichostrongylidae* sp.). L'efficacité des approches de barcoding, telles que celle utilisée pour l'identification moléculaire, dépend de l'existence de bases de données contenant de nombreuses séquences couvrant tous les candidats possibles du groupe étudié pour le marqueur choisi¹⁰⁰. Dans le cas des helminthes de rongeurs, le spectre de séquences disponibles dans les bases de données publiques ne permet pas toujours d'aboutir à une identification moléculaire la plus fine possible, et les taxonomies au niveau de l'espèce restent relativement peu résolues. Afin de résoudre ces problèmes, une identification morphologique conduite par un spécialiste taxonomique (A. Ribas, Université de Barcelone) est prévue à la suite de ce stage. Cette approche permettra d'identifier à l'échelle de l'espèce les helminthes non déterminés jusqu'à ce niveau taxonomique, de compléter les bases de données publiques avec les séquences obtenues et éventuellement de décrire de nouvelles espèces. Il est également prévu d'effectuer l'identification moléculaire des morphotypes-hôtes qui n'ont pas encore été analysés en biologie moléculaire, du fait des contraintes logistiques sus-expliquées.

B. Absence d'évidence d'une forte d'association entre IgG anti-SEOV et helminthes

Notre étude ayant confirmé la circulation de ces parasites au sein des rats bruns de Bamako, nous nous sommes intéressés aux associations potentielles prenant place entre eux. Le sous-jeu de données analysé a révélé une co-circulation importante du SEOV et des helminthes. Plus de la moitié des individus y sont en situation de co-infection et la quasi-totalité des individus séropositifs SEOV est infectée par des helminthes.

L'emploi parallèle de la SCA et des analyses multivariées permet d'obtenir une vue d'ensemble initiale des associations présentes dans le jeu de données, tandis que l'utilisation des GLMMs permet d'explorer l'impact des variables liées à la présence et/ou la charge parasitaire en helminthes sur la séropositivité SEOV, tout en prenant en considération d'éventuels facteurs confondants liés à l'hôte et son environnement. En effet, l'environnement pourrait par exemple influencer la nature des contacts entre individus en modifiant leur proximité et les interactions qu'ils entretiennent dans le milieu synanthrope. Les conditions environnementales pourraient également jouer un rôle déterminant pour le maintien du SEOV hors de son hôte, et donc, conditionner la transmission horizontale indirecte entre individus, comme c'est le cas pour l'orthohantavirus Puumala^{101,102}. Enfin, les caractéristiques intrinsèques au rat (sexe, âge) pourraient grandement influencer leur niveau d'exposition ou leur sensibilité.

Les résultats obtenus à partir de ces différentes méthodes d'analyse indiquent tout d'abord qu'aucune des combinaisons exclusives SEOV - helminthes ne présente une fréquence différente de celle attendue par le hasard, ce qui suggère que la probabilité d'infection de ces combinaisons dépend uniquement des (séro-)prévalences respectives des parasites. D'autre part, ils montrent, qu'il n'y a pas de différences significatives dans la composition des infracommunautés d'helminthes entre les rats séropositifs et les rats séronégatifs à SEOV. Ceci indique que la présence d'une probable infection persistante au SEOV ne semble pas être associée à des infracommunautés d'helminthes différentes. Finalement, aucune corrélation significative entre la présence/absence ou l'abondance des helminthes et la présence d'IgG anti-SEOV n'a été observée dans les modèles générés.

C. Limites possibles de l'étude pour la détection d'associations

Aucune de ces analyses ne permet donc de mettre en exergue l'existence d'associations entre les helminthes et la présence d'IgG anti-SEOV. Cependant, ce résultat ne reflète pas nécessairement une preuve de l'absence effective

d'associations. En effet, les effectifs étudiés restent faibles, et un échantillon de taille supérieure pourrait par exemple permettre de mettre en évidence des associations qui n'ont pas été détectées.

De plus, le regroupement taxonomique effectué pour pallier les lacunes d'identification des helminthes a pu introduire un biais dans les analyses d'associations. En effet, la présence d'helminthes de différentes espèces regroupées sous une même catégorie taxonomique pourrait masquer l'existence d'associations spécifiques entre SEOV et helminthes. Parmi les helminthes parasitant le rat brun, *N. brasiliensis* ferait un bon candidat pour les associations, car il est connu pour être capable d'influencer l'immunité de son hôte¹⁰³ et les microparasites au sein de cet hôte¹⁰⁴. Cependant, sa prévalence assez faible dans notre jeu de données couplée à des difficultés d'identification nous a conduits à le regrouper avec d'autres membres du même morphotype. Cette contrainte pourrait ainsi masquer un lien éventuel entre cet helminthe et SEOV.

Par ailleurs, la résolution de l'analyse sérologique utilisée pour la détection du SEOV pourrait aussi limiter la détection d'associations, car elle ne fournit pas d'informations sur la souche infectant le rat, alors que les interactions entre parasites pourraient être souche-dépendantes. En outre, bien que la séropositivité indique de façon très probable une infection persistante au SEOV, elle ne permet pas de détecter les individus infectés récemment (moins de deux semaines environ⁶⁸) n'ayant pas encore séroconverti (séronégatifs SEOV infectés). Également, la séropositivité ne fournit pas d'information quantitative relative à la charge virale des rats au moment de leur capture, alors que cette information pourrait être précieuse dans le cadre des analyses d'associations. L'existence d'associations entre charge virale d'orthohantavirus et helminthe a d'ailleurs déjà été suggérée dans la littérature (travaux non-publiés de C. Gritzen et P. Ahola dans le cadre de leurs masters, 2012 et 2020)⁵⁷. La charge virale des orthohantavirus évolue au cours de l'infection dans les différents tissus. Elle passe d'une phase aiguë juste après l'infection⁶⁸, à une circulation à bas bruit avec de potentielles fluctuations intermittentes d'intensité lors de la phase persistante¹⁰⁵. Par conséquent, la quantité de virus pourrait varier considérablement entre les individus séropositifs. Comme mentionné précédemment, la sortie du SEOV de la liste MOT pourra faciliter la mise en place d'approches moléculaires, ce qui pourrait aboutir en la considération de la charge virale du SEOV dans les futures analyses d'associations.

Les résultats des GLMM ont démontré que certains facteurs individuels influencent la probabilité de séropositivité au SEOV. Les rats présentant un poids corporel plus élevé présentaient ainsi une probabilité significativement accrue d'être séropositifs au SEOV, ce qui concorde avec les connaissances déjà établies dans la littérature¹⁰⁶. Le sexe a également révélé un effet significatif, avec une probabilité plus élevée pour les rats femelles d'être séropositives par rapport aux mâles. Ce dernier résultat s'écarte des observations habituelles dans la littérature, où les mâles sont généralement considérés comme plus susceptibles d'être infectés par des orthohantavirus que les femelles^{106,107}. Ces résultats plaident donc en faveur d'une considération systématique, autant que possible, d'autres variables indépendantes dans les modèles. Les interactions statistiques pouvant exister entre les variables helminthes et les autres facteurs confondants n'ont pas été considérées dans les modèles réalisés ici pour des raisons d'effectifs faibles. La prise en considération de ces interactions aurait pu permettre de révéler des associations conditionnées par un contexte donné. Les déterminants génétiques, la nutrition ou encore l'expression immunitaire sont autant de variables relatives à l'hôte qui mériteraient aussi d'être prises en considération. Ces dernières peuvent modifier la probabilité des hôtes d'être infectés par des parasites et impacter les interactions entre parasites²³. Il sera intéressant dans le futur d'acquérir ce type d'informations.

De manière similaire, la composition des communautés de petits mammifères pourrait jouer un rôle essentiel dans la transmission du SEOV et affecter la présence d'associations SEOV - helminthes. En effet, cette biodiversité peut influencer les contacts entre hôtes compétents au travers de phénomènes tels que l'effet dilution¹⁰⁸. Par ailleurs, la présence avérée de *Rattus rattus* à Bamako (L. Granjon, communications personnelles) pourrait contribuer au maintien et à la propagation du virus. Bien que peu présent dans la ville et uniquement affilié à quelques quartiers, le rat noir

pourrait être un acteur de la diffusion du virus et impacter les communautés d'helminthes. Des analyses vont prochainement être réalisées en vue de détecter la circulation potentielle de SEOV dans les populations de rats noirs et de décrire les communautés d'helminthes chez cet hôte à Bamako.

Certaines des variables utilisées dans les modèles implémentés dans ce travail pourraient également être affinées. Les variables d'hygiène et de densité humaine ont été réalisées à partir de données collectées en 2009 et ne traduisent pas la réalité socio-environnementale de la ville au moment de l'échantillonnage. De plus, elles ont été construites à l'échelle du district de dénombrement (DD), ce qui ne correspond pas à l'échelle la plus fine disponible pour ces données. De manière générale, la réduction dimensionnelle des données environnementales a pu conduire à une perte d'information importante limitant le caractère explicatif de ces variables dans les analyses.

D. Une corrélation entre IgG anti-SEOV et intensité de *G. neoplasticum*

Si aucune association significative n'a été observée entre la présence/absence ou l'abondance des helminthes et la présence d'IgG anti-SEOV dans les modèles générés, l'intensité de la charge parasitaire en *Gongylonema* a montré une influence significative sur la séropositivité parmi les rats infectés par *G. neoplasticum*. Les rats dont l'intensité de l'infection par *G. neoplasticum* était plus élevée avaient une probabilité plus faible d'être séropositifs pour le SEOV. Une corrélation négative entre orthohantavirus et nématodes a déjà été observée à quelques reprises dans d'autres travaux (travaux non-publiés de C. Gritzen et P. Ahola dans le cadre de leurs masters, 2012 et 2020) et une action protectrice des nématodes semble même exister dans le cas du SNV⁵⁸.

Ces observations suggèrent donc une possible relation entre l'intensité du parasitisme de *G. neoplasticum* et la séropositivité à SEOV. A notre connaissance, l'influence d'une infection par ce nématode sur des microparasites ou sur l'immunité de son hôte n'a encore jamais été décrite. Les helminthes sont généralement connus pour influencer le compromis immunitaire Th1/Th2 en défaveur de la voie Th1, antagoniste à l'infection de microparasites. Cependant, l'infection par certains helminthes peut aussi engendrer une régulation à la hausse de la voie Th1³⁵, ce qui peut en théorie défavoriser les microparasites. Ces modulations immunitaires causées par les helminthes sont des processus extrêmement complexes qui peuvent varier et dépendre de l'espèce d'helminthe¹⁰³. Par ailleurs, il n'existe pas de résultat consensuel concernant l'influence d'une infection par des helminthes sur les microparasites et les interactions entre les helminthes et les autres parasites peuvent être médiées par d'autres facteurs que l'immunité de l'hôte¹⁵.

Il reste important de souligner que l'observation transversale des co-infections ne peut traduire qu'un lien corrélatif entre parasites lorsqu'une association est détectée, ce qui ne suffit pas à démontrer l'existence d'une interaction. En effet, bien qu'une association puisse traduire une interaction effective, elle peut aussi être le fruit d'autres phénomènes influençant la probabilité et le développement des co-infections, comme la co-exposition¹⁰⁹. Des charges parasitaires associées peuvent par exemple suggérer que des individus hôtes infectés sont plus enclins à l'infection ou que l'infection par une espèce de parasite facilite une autre espèce de parasite. Le résultat décrit ici pour l'intensité de *G. neoplasticum* nécessite des investigations supplémentaires pour établir une éventuelle relation de causalité, sachant par ailleurs qu'aucun processus biologique documenté ne permet de l'appuyer.

E. Conclusions et perspectives

A l'exception du signal marginal lié à l'intensité en *G. neoplasticum*, aucun patron significatif d'association entre helminthes gastro-intestinaux et séropositivité SEOV n'a été révélé. Cependant, les retombées de ce travail ouvrent des perspectives intéressantes pouvant orienter directement des recherches futures. Tout d'abord, la mise en œuvre de sessions complémentaires d'échantillonnages, avec des identifications taxonomiques approfondies des parasites et des mesures de charges virales, pourraient permettre d'infirmer ou de confirmer la corrélation observée. En effet, notre étude s'est concentrée sur un jeu de données de 153 rats bruns présents dans des quartiers spécifiques de

Bamako. La généralisation des phénomènes observés à d'autres populations de rats ou à d'autres lieux géographiques peut être limitée. D'autant que les interactions entre parasites peuvent parfois être contexte-dépendantes. L'analyse des associations entre le *Puumala orthohantavirus* et *Heligmosomum mixtum* dans des populations différentes de *M. glareolus* ont notamment abouti à des conclusions différentes concernant la nature de cette association (travaux non-publiés de P. Ahola dans le cadre de son master, 2020)⁵⁷. D'autres recherches portant sur des effectifs plus vastes, ou dans d'autres populations de rats, permettraient de renforcer la validité des résultats obtenus. Au contraire, elles pourraient aussi apporter des résultats divergents et témoigner de l'existence d'autres associations, notamment si elles font état de communautés d'helminthes différentes (p. ex. une plus forte prévalence en *N. brasiliensis*, helminthe candidat pour les associations).

Ensuite, les études transversales présentent une limite certaine dans la détection des associations, car elles ne permettent pas de déterminer la séquentialité des co-infections. Afin de mieux comprendre la dynamique temporelle des associations identifiées et d'observer l'impact potentiel des co-infections sur la santé globale et la survie des rats, il est donc nécessaire de mener des études longitudinales. Ces études sont souvent difficiles à réaliser en raison de leur coût élevé et de la nécessité de quantifier précisément les parasites (et potentiellement leurs effets sur la fitness et/ou l'immunité des hôtes) grâce à un suivi non invasif des hôtes. Néanmoins, ce type d'étude permettrait d'évaluer l'influence de la séquence des infections et de déterminer un lien causal, révélant ainsi l'existence d'interactions. L'emploi de méthodes expérimentales contrôlées pourrait finalement permettre de révéler les mécanismes sous-jacents des interactions décelées dans les populations naturelles¹⁰⁹.

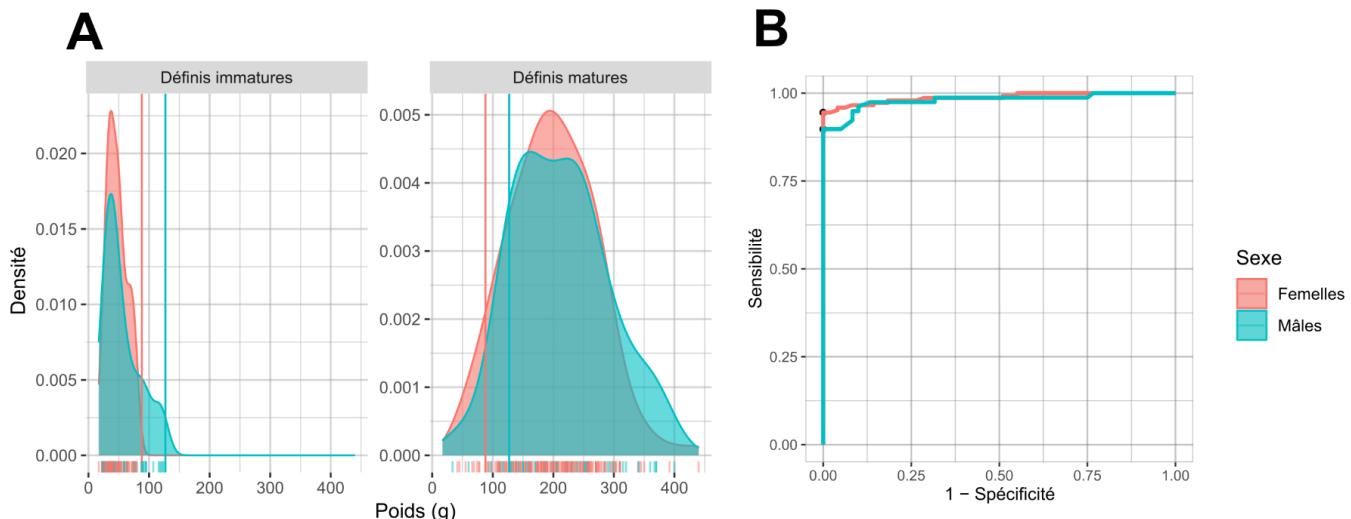
Enfin, le cadre conceptuel et analytique développé ici pourrait être élargi à l'étude de co-infections impliquant d'autres parasites *sensu lato*, comme les bactéries pour lesquelles des approches de métagénomique 16S maîtrisées au CBGP permettent de décrire la communauté à l'échelle de chaque individu hôte^{110,111}, ou d'autres virus circulant chez les rats tels que l'hépatite E, les mammarenavirus ou les orthopoxvirus. Cette généralisation de l'étude des associations helminthes - SEOV à divers agents zoonotiques pourrait avoir une résonance importante en santé publique dans le cas de l'existence démontrée d'interactions entre ces parasites chez l'humain. Les traitements antihelminthiques de masse sont couramment administrés aux populations humaines des régions tropicales. Il semble important de développer ces études d'associations/interactions pour prédire les potentiels effets de ces traitements sur le contrôle d'autres risques infectieux (p. ex. VIH et tuberculose)³⁷ et raisonner au mieux ces stratégies sanitaires.

ANNEXE

Commune	Quartier-Secteur	n°maison	n°piece	Pièce	Stock	Sol	Murs	Plafond
DB_I	Sotuba_ACI	1	1	Mag	++	C	C	Z
DB_I	Sotuba_ACI	1	2	Cui	0	Dalles/Terre	Z	Z
DB_I	Sotuba_ACI	1	3	Sal	+	C + carreaux	C	C
DB_I	Sotuba_ACI	1	4	Cour	0	Terre	C	NA
DB_I	Sotuba_ACI	3	1	Mag	0	C + Terre	C	C
DB_I	Banconi_Plateau	2	1	Cour	0	Terre	NA	NA
DB_I	Banconi_Plateau	2	2	Ch	+	C	C	Z
DB_IV	Lafiabougou_Secteur3	1	1	Sal/Ch	+	C	C	Z

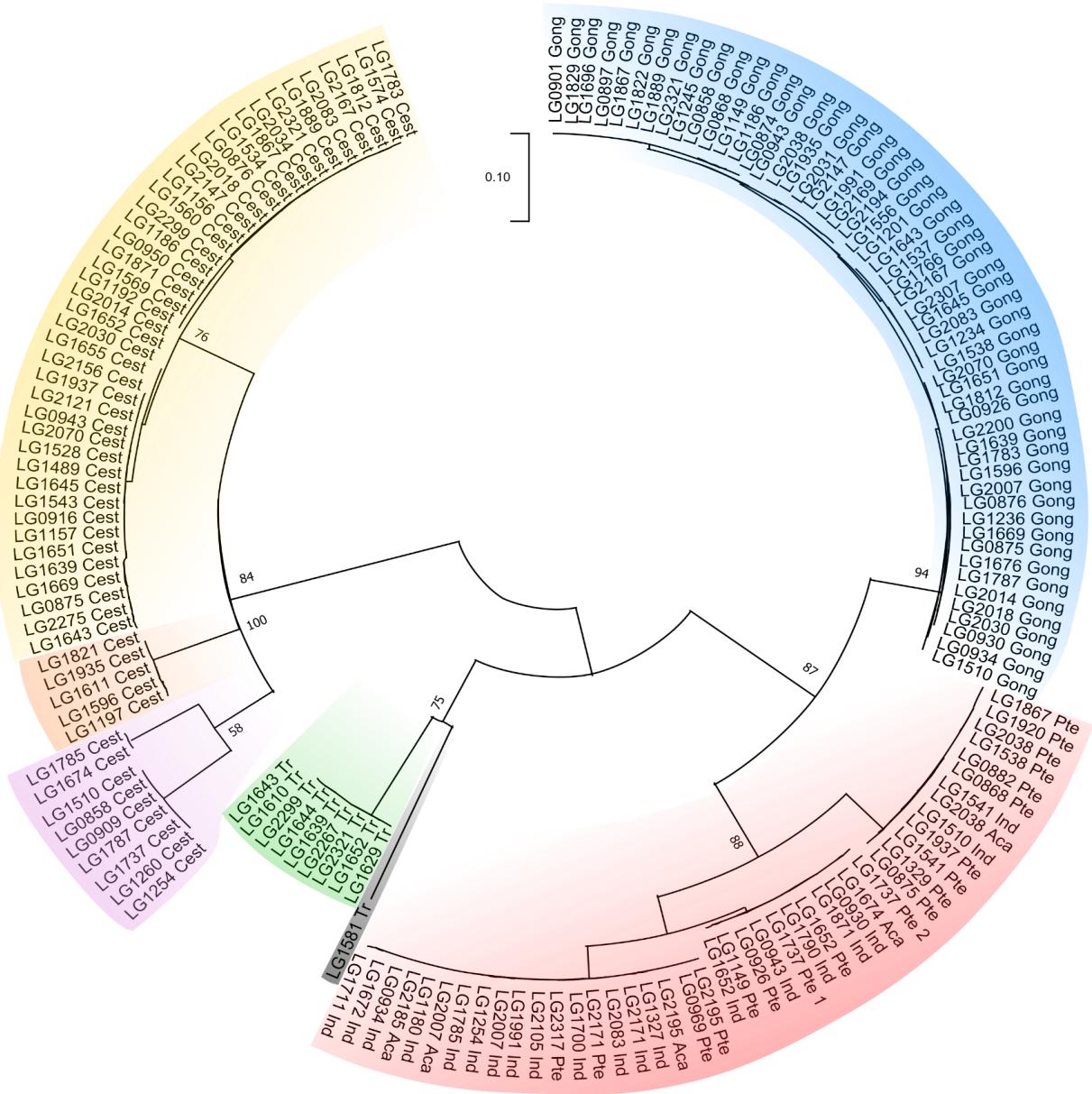
Annexe 1. Exemple de relevé des données du bâti des pièces échantillonnées lors du piégeage

Mag : Magasin, Cui : Cuisine, Sal : Salon, Ch : Chambre, + : stock faible, ++ : stock moyen, C : Ciment, Z : Zinc



Annexe 2. Détermination d'un seuil de poids pour la caractérisation de la maturité sexuelle des rats femelles et mâles

A. Densités de distribution du poids pour les individus préalablement définis comme matures ou immatures en fonction d'un ensemble de caractères sexuelles qualitatifs (développement du scrotum et des vésicules séminales pour les mâles, perforation vulvaire, développement mammaire, présence de cicatrices placentaires, et statut lactant et/ou gestant pour les femelles). La valeur seuil optimale établie pour chaque sexe est représentée par une barre verticale. **B.** Courbe ROC mesurant la performance des valeurs seuils de poids possibles. La couleur permet de distinguer la détermination du seuil entre femelles (rouge) et mâles (bleu).



Annexe 3. Arbre phylogénétique du gène CO1 des morphotypes-hôtes d'helminthe

La reconstruction phylogénétique a été effectuée en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance sur une portion d'environ 400 pb du gène CO1, à l'aide de Mega X (v.10.2.5-1). Les valeurs de bootstrap, calculées à partir de 1000 échantillons, sont indiquées aux nœuds de l'arbre. L'arbre a été réalisé à partir de toutes les séquences de bonnes qualités obtenues après le séquençage des morphotypes-hôtes sélectionnés. Après comparaison avec les bases de données publiques, les morphotypes-helminthes ont été regroupés comme suit : le groupe jaune regroupe les *H. diminuta*, le groupe orange les *H. nana*, le groupe rose les *Cestoda* spp., le groupe vert les *N. brasiliensis*, le groupe noir le *Trichonstryliidae* sp., le groupe rouge les *Pterygodermatites* spp., et le groupe bleu les *G. neoplasticum*.

BIBLIOGRAPHIE

1. Cox, F. E. G. Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology* **122**, S23–S38 (2001).
2. Poulin, R. & Morand, S. The diversity of parasites. *Q. Rev. Biol.* **75**, 277–293 (2000).
3. de Meeûs, T. & Renaud, F. Parasites within the new phylogeny of eukaryotes. *Trends Parasitol.* **18**, 247–251 (2002).
4. Petney, T. N. & Andrews, R. H. Multiparasite communities in animals and humans: frequency, structure and pathogenic significance. *Int. J. Parasitol.* **28**, 377–393 (1998).
5. Balmer, O. & Tanner, M. Prevalence and implications of multiple-strain infections. *Lancet Infect. Dis.* **11**, 868–878 (2011).
6. Viney, M. E. & Graham, A. L. Chapter Five - Patterns and Processes in Parasite Co-Infection. in *Advances in Parasitology* (ed. Rollinson, D.) vol. 82 321–369 (Academic Press, 2013).
7. Karvonen, A., Jokela, J. & Laine, A.-L. Importance of Sequence and Timing in Parasite Coinfections. *Trends Parasitol.* **35**, 109–118 (2019).
8. Levin, M. L. & Fish, D. Acquisition of Coinfection and Simultaneous Transmission of Borrelia burgdorferi and Ehrlichia phagocytophila by Ixodes scapularis Ticks. *Infect. Immun.* **68**, 2183–2186 (2000).
9. Rolain, J. M. et al. Concomitant or Consecutive Infection with Coxiella burnetii and Tickborne Diseases. *Clin. Infect. Dis.* **40**, 82–88 (2005).
10. Telfer, S. et al. Species Interactions in a Parasite Community Drive Infection Risk in a Wildlife Population. *Science* **330**, 243–246 (2010).
11. Lass, S. et al. Generating super-shedders: co-infection increases bacterial load and egg production of a gastrointestinal helminth. *J. R. Soc. Interface* **10**, 20120588 (2013).
12. Dallas, T. A., Laine, A.-L. & Ovaskainen, O. Detecting parasite associations within multi-species host and parasite communities. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **286**, 20191109 (2019).
13. Bashey, F. Within-host competitive interactions as a mechanism for the maintenance of parasite diversity. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **370**, 20140301 (2015).
14. Pedersen, A. B. & Fenton, A. Emphasizing the ecology in parasite community ecology. *Trends Ecol. Evol.* **22**, 133–139 (2007).
15. Graham, A. L. Ecological rules governing helminth–microparasite coinfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 566–570 (2008).
16. Bandilla, M., Valtonen, E. T., Suomalainen, L.-R., Aphalo, P. J. & Hakalahti, T. A link between ectoparasite infection and susceptibility to bacterial disease in rainbow trout. *Int. J. Parasitol.* **36**, 987–991 (2006).
17. Råberg, L. et al. The Role of Immune-Mediated Apparent Competition in Genetically Diverse Malaria Infections. *Am. Nat.* **168**, 41–53 (2006).
18. Bell, A. S., De Roode, J. C., Sim, D. & Read, A. F. Within-Host Competition in Genetically Diverse Malaria Infections: Parasite Virulence and Competitive Success. *Evolution* **60**, 1358–1371 (2006).
19. Buchacz, K. et al. Incidence of AIDS-Defining Opportunistic Infections in a Multicohort Analysis of HIV-infected Persons in the United States and Canada, 2000–2010. *J. Infect. Dis.* **214**, 862–872 (2016).
20. Nacher, M. et al. Ascaris lumbricoides infection is associated with protection from cerebral malaria. *Parasite Immunol.* **22**, 107–113 (2000).
21. Abbate, J. L. et al. Disentangling complex parasite interactions: Protection against cerebral malaria by one helminth species is jeopardized by co-infection with another. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **12**, e0006483 (2018).
22. Thumib, S. M. et al. Parasite Co-Infections and Their Impact on Survival of Indigenous Cattle. *PLOS ONE* **9**, e76324 (2014).
23. Ezenwa, V. O. & Jolles, A. E. From Host Immunity to Pathogen Invasion: The Effects of Helminth Coinfection on the Dynamics of Microparasites. *Integr. Comp. Biol.* **51**, 540–551 (2011).
24. Ezenwa, V. O. & Jolles, A. E. Opposite effects of anthelmintic treatment on microbial infection at individual versus population scales. *Science* **347**, 175–177 (2015).
25. Hudson, P. J., Dobson, A. P. & Newborn, D. Prevention of Population Cycles by Parasite Removal. *Science* **282**, 2256–2258 (1998).
26. Alizon, S., de Roode, J. C. & Michalakis, Y. Multiple infections and the evolution of virulence. *Ecol. Lett.* **16**, 556–567 (2013).
27. Gibson, W. et al. Genetic Recombination between Human and Animal Parasites Creates Novel Strains of Human Pathogen. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, e0003665 (2015).
28. Borlase, A., Webster, J. P. & Rudge, J. W. Opportunities and challenges for modelling epidemiological and evolutionary dynamics in a multihost, multiparasite system: Zoonotic hybrid schistosomiasis in West Africa. *Evol. Appl.* **11**, 501–515 (2018).
29. McDonald, S. M., Nelson, M. I., Turner, P. E. & Patton, J. T. Reassortment in segmented RNA viruses: mechanisms and outcomes. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 448–460 (2016).

30. Baker, K. S. *et al.* Horizontal antimicrobial resistance transfer drives epidemics of multiple *Shigella* species. *Nat. Commun.* **9**, 1462 (2018).
31. Friesen, T. L. *et al.* Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. *Nat. Genet.* **38**, 953–956 (2006).
32. Jones, K. E. *et al.* Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* **451**, 990–993 (2008).
33. Smith, K. F. *et al.* Global rise in human infectious disease outbreaks. *J. R. Soc. Interface* **11**, 20140950 (2014).
34. van Riet, E., Hartgers, F. C. & Yazdanbakhsh, M. Chronic helminth infections induce immunomodulation: Consequences and mechanisms. *Immunobiology* **212**, 475–490 (2007).
35. Maizels, R. M. *et al.* Helminth parasites – masters of regulation. *Immunol. Rev.* **201**, 89–116 (2004).
36. Osborne, L. C. *et al.* Virus-helminth coinfection reveals a microbiota-independent mechanism of immunomodulation. *Science* **345**, 578–582 (2014).
37. Salgame, P., Yap, G. S. & Gause, W. C. Effect of helminth-induced immunity on infections with microbial pathogens. *Nat. Immunol.* **14**, 1118–1126 (2013).
38. Ezenwa, V. O. Helminth-microparasite co-infection in wildlife: lessons from ruminants, rodents and rabbits. *Parasite Immunol.* **38**, 527–534 (2016).
39. Han, B. A., Schmidt, J. P., Bowden, S. E. & Drake, J. M. Rodent reservoirs of future zoonotic diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 7039–7044 (2015).
40. Mendoza, H., Rubio, A. V., García-Peña, G. E., Suzán, G. & Simonetti, J. A. Does land-use change increase the abundance of zoonotic reservoirs? Rodents say yes. *Eur. J. Wildl. Res.* **66**, 6 (2019).
41. Cavia, R., Cueto, G. R. & Suárez, O. V. Changes in rodent communities according to the landscape structure in an urban ecosystem. *Landsc. Urban Plan.* **90**, 11–19 (2009).
42. Dalecky, A. *et al.* Range expansion of the invasive house mouse *Mus musculus domesticus* in Senegal, West Africa: a synthesis of trapping data over three decades, 1983–2014. *Mammal Rev.* **45**, 176–190 (2015).
43. Etougbéché, J. *et al.* Genetic diversity and origins of invasive black rats (*Rattus rattus*) in Benin, West Africa. *J. Vertebr. Biol.* **69**, 20014.1 (2020).
44. Ecke, F. *et al.* Population fluctuations and synanthropy explain transmission risk in rodent-borne zoonoses. *Nat. Commun.* **13**, 7532 (2022).
45. Goeijenbier, M. *et al.* Rodent-borne hemorrhagic fevers: under-recognized, widely spread and preventable – epidemiology, diagnostics and treatment. *Crit. Rev. Microbiol.* **39**, 26–42 (2013).
46. Laenen, L. *et al.* Hantaviridae: Current Classification and Future Perspectives. *Viruses* **11**, 788 (2019).
47. Hepojoki, J., Strandin, T., Lankinen, H. & Vaheri, A. Hantavirus structure – molecular interactions behind the scene. *J. Gen. Virol.* **93**, 1631–1644 (2012).
48. Milholland, M. T. *et al.* Global Diversity and Distribution of Hantaviruses and Their Hosts. *EcoHealth* **15**, 163–208 (2018).
49. Lin, X.-D. *et al.* Migration of Norway Rats Resulted in the Worldwide Distribution of Seoul Hantavirus Today. *J. Virol.* **86**, 972–981 (2012).
50. Avšič-Županc, T., Saksida, A. & Korva, M. Hantavirus infections. *Clin. Microbiol. Infect.* **21**, e6–e16 (2019).
51. Kuhn, J. & Schmaljohn, C. A Brief History of Bunyaviral Family Hantaviridae. *Diseases* **11**, 38 (2023).
52. Feng, A. Y. T. & Himsworth, C. G. The secret life of the city rat: a review of the ecology of urban Norway and black rats (*Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*). *Urban Ecosyst.* **17**, 149–162 (2014).
53. Diagne, M. M. *et al.* Seoul Orthohantavirus in Wild Black Rats, Senegal, 2012–2013. *Emerg. Infect. Dis.* **26**, 2460–2464 (2020).
54. Castel, G. *et al.* Genetic Characterization of Seoul Virus in the Seaport of Cotonou, Benin. *Emerg. Infect. Dis.* **27**, 2704–2706 (2021).
55. Castel, G., Filippone, C., Tatard, C., Vigan, J. & Dobigny, G. Role of Seaports and Imported Rats in Seoul Hantavirus Circulation, Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **29**, 20–25 (2023).
56. Vandegrift, K. J. & Hudson, P. J. Could parasites destabilize mouse populations? The potential role of Pterygodermatites peromysci in the population dynamics of free-living mice, *Peromyscus leucopus*. *Int. J. Parasitol.* **39**, 1253–1262 (2009).
57. Salvador, A. R. *et al.* Concomitant influence of helminth infection and landscape on the distribution of Puumala hantavirus in its reservoir, *Myodes glareolus*. *BMC Microbiol.* **11**, 30 (2011).
58. Sweeny, A. R. *et al.* Experimental parasite community perturbation reveals associations between Sin Nombre virus and gastrointestinal nematodes in a rodent reservoir host. *Biol. Lett.* **16**, 20200604 (2020).
59. Granjon, L. *et al.* Commensal small mammal trapping data in Southern Senegal, 2012–2015: where invasive species meet native ones. *Ecology* **102**, e03470 (2021).
60. Mills, J. N. *et al.* Guidelines for Working with Rodents Potentially Infected with Hantavirus. *J. Mammal.* **76**, 716–722 (1995).
61. Centre de Biologie pour la Gestion des Populations (INRAE - IRD - CIRAD - Institut Agro|Montpellier SupAgro). CBGP - Small mammal Collection. (2022) doi:10.15454/WWNUPO.

62. Lê, S., Josse, J. & Husson, F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *J. Stat. Softw.* **25**, 1–18 (2008).
63. Greenacre, M. & Blasius, J. *Multiple Correspondence Analysis and Related Methods*. (CRC Press, 2006).
64. Dohmae, K., Koshimizu, U. & Nishimune, Y. In utero and mammary transfer of hantavirus antibody from dams to infant rats. *Lab. Anim. Sci.* **43**, 557–561 (1993).
65. Sengupta, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int. J. Prev. Med.* **4**, 624–630 (2013).
66. Thiele, C. & Hirschfeld, G. cutpointr: Improved Estimation and Validation of Optimal Cutpoints in R. *J. Stat. Softw.* **98**, 1–27 (2021).
67. Meyer, B. J. & Schmaljohn, C. S. Persistent hantavirus infections: characteristics and mechanisms. *Trends Microbiol.* **8**, 61–67 (2000).
68. Easterbrook, J. D. & Klein, S. L. Immunological Mechanisms Mediating Hantavirus Persistence in Rodent Reservoirs. *PLoS Pathog.* **4**, e1000172 (2008).
69. Klein, S. L. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunol.* **26**, 247–264 (2004).
70. Ribas, A. *et al.* Isolating helminths in rodents. in 32–35 (2011). doi:10.13140/2.1.2353.4406.
71. Anderson, R., Chabaud, A. & Willmott, S. *Keys to the nematode parasites of vertebrates : Archival Volume*. (2009).
72. Khalil, L., Jones, A. & Bray, R. *Keys to the Cestode Parasites of Vertebrates*. (1994).
73. Diagne, C. Communautés de parasites, immunité et succès d'invasion des rongeurs commensaux : le cas de la souris domestique du rat noir au Sénégal. (Montpellier, 2015).
74. Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S. & deWaard, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. Biol. Sci.* **270 Suppl 1**, S96–99 (2003).
75. Chan, A. H. E., Chaisiri, K., Saralamba, S., Morand, S. & Thaenham, U. Assessing the suitability of mitochondrial and nuclear DNA genetic markers for molecular systematics and species identification of helminths. *Parasit. Vectors* **14**, 233 (2021).
76. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* **35**, 1547–1549 (2018).
77. Sayers, E. W. *et al.* Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res.* **50**, D20–D26 (2022).
78. Ratnasingham, S. & Hebert, P. D. N. bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Mol. Ecol. Notes* **7**, 355–364 (2007).
79. Zuur, A. F., Ieno, E. N. & Elphick, C. S. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods Ecol. Evol.* **1**, 3–14 (2010).
80. Vaumourin, E. *et al.* To be or not to be associated: power study of four statistical modeling approaches to identify parasite associations in cross-sectional studies. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**, (2014).
81. Oksanen, J. *et al.* vegan: Community Ecology Package. (2022).
82. Kruskal, J. B. Nonmetric multidimensional scaling: a numerical method. *Psychometrika* **29**, 115–129 (1964).
83. Anderson, M. J. Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA). in *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online* 1–15 (John Wiley & Sons, Ltd, 2017). doi:10.1002/9781118445112.stat07841.
84. Harrison, X. A. *et al.* A brief introduction to mixed effects modelling and multi-model inference in ecology. *PeerJ* **6**, e4794 (2018).
85. Bolker, B. M. *et al.* Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends Ecol. Evol.* **24**, 127–135 (2009).
86. Bates, D., Mächler, M., Bolker, B. & Walker, S. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J. Stat. Softw.* **67**, 1–48 (2015).
87. Akaike, H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Autom. Control* **19**, 716–723 (1974).
88. *Model Selection and Multimodel Inference*. (Springer, 2004). doi:10.1007/b97636.
89. Bartoń, K. MuMin: Multi-Model Inference. (2023).
90. Hartig, F. DHARMA: residual diagnostics for hierarchical (multi-level/mixed) regression models. (2022).
91. Fox, J. & Monette, G. Generalized Collinearity Diagnostics. *J. Am. Stat. Assoc.* **87**, 178–183 (1992).
92. Nakagawa, S., Johnson, P. C. D. & Schielzeth, H. The coefficient of determination R² and intra-class correlation coefficient from generalized linear mixed-effects models revisited and expanded. *J. R. Soc. Interface* **14**, 20170213 (2017).
93. Lüdecke, D., Ben-Shachar, M. S., Patil, I., Waggoner, P. & Makowski, D. performance: An R Package for Assessment, Comparison and Testing of Statistical Models. *J. Open Source Softw.* **6**, 3139 (2021).
94. Yasuda, S. P. *et al.* Application of Truncated Nucleocapsid Protein (N) for Serotyping ELISA of Murinae-Associated Hantavirus Infection in Rats. *J. Vet. Med. Sci.* **74**, 215–219 (2012).
95. Galán-Puchades, M. T. *et al.* First survey on zoonotic helminthosis in urban brown rats (*Rattus norvegicus*) in Spain and associated public health considerations. *Vet. Parasitol.* **259**, 49–52 (2018).

96. Mirdha, B. R. & Samantray, J. C. *Hymenolepis nana*: A Common Cause of Paediatric Diarrhoea in Urban Slum Dwellers in India. *J. Trop. Pediatr.* **48**, 331–334 (2002).
97. Macnish, M. G., Morgan, U. M., Behnke, J. M. & Thompson, R. C. A. Failure to infect laboratory rodent hosts with human isolates of Rodentolepis (= *Hymenolepis*) *nana*. *J. Helminthol.* **76**, 37–43 (2002).
98. Macnish, M. G., Morgan-Ryan, U. M., Monis, P. T., Behnke, J. M. & Thompson, R. C. A. A molecular phylogeny of nuclear and mitochondrial sequences in *Hymenolepis nana* (Cestoda) supports the existence of a cryptic species. *Parasitology* **125**, 567–575 (2002).
99. Panti-May, J. A., Rodríguez-Vivas, R. I., García-Prieto, L., Servián, A. & Costa, F. Worldwide overview of human infections with *Hymenolepis diminuta*. *Parasitol. Res.* **119**, 1997–2004 (2020).
100. Moritz, C. & Cicero, C. DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. *PLOS Biol.* **2**, e354 (2004).
101. Kallio, E. R. *et al.* Prolonged survival of Puumala hantavirus outside the host: evidence for indirect transmission via the environment. *J. Gen. Virol.* **87**, 2127–2134 (2006).
102. Linard, C., Tersago, K., Leirs, H. & Lambin, E. F. Environmental conditions and Puumala virus transmission in Belgium. *Int. J. Health Geogr.* **6**, 55 (2007).
103. Cortés, A., Muñoz-Antoli, C., Esteban, J. G. & Toledo, R. Th2 and Th1 Responses: Clear and Hidden Sides of Immunity Against Intestinal Helminths. *Trends Parasitol.* **33**, 678–693 (2017).
104. Potian, J. A., Bhatt, K., Liu, Z., Gause, W. & Salgame, P. Helminthic infection enhances susceptibility to tuberculosis in a murine coinfection model (43.31). *J. Immunol.* **178**, S42 (2007).
105. Bernshtain, A. D. *et al.* Dynamics of Puumala hantavirus infection in naturally infected bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Arch. Virol.* **144**, 2415–2428 (1999).
106. Cueto, G. R., Cavia, R., Bellomo, C., Padula, P. J. & Suárez, O. V. Prevalence of hantavirus infection in wild *Rattus norvegicus* and *R. rattus* populations of Buenos Aires City, Argentina. *Trop. Med. Int. Health* **13**, 46–51 (2008).
107. Klein, S. L. *et al.* Differential expression of immunoregulatory genes in male and female Norway rats following infection with Seoul virus. *J. Med. Virol.* **74**, 180–190 (2004).
108. Civitello, D. J. *et al.* Biodiversity inhibits parasites: Broad evidence for the dilution effect. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 8667–8671 (2015).
109. Hellard, E., Fouchet, D., Vavre, F. & Pontier, D. Parasite–Parasite Interactions in the Wild: How To Detect Them? *Trends Parasitol.* **31**, 640–652 (2015).
110. Bouilloud, M. *et al.* Three-way relationships between gut microbiota, helminth assemblages and bacterial infections in wild rodent populations. *Peer Community J.* **3**, (2023).
111. Diagne, C. *et al.* Ecological and sanitary impacts of bacterial communities associated to biological invasions in African commensal rodent communities. *Sci. Rep.* **7**, 14995 (2017).