

## LES HANTAVIRUS : ÉVOLUTION MOLÉCULAIRE ET ÉPIDÉMIOLOGIE DE L'INFECTION

S. Escutenaire, B. Brochier, P.-P. Pastoret

*Service d'immunologie-vaccinologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Liège, Bât. B43 bis, 20, boulevard de Colonster, 4000 Liège, Belgique*

**KEYWORDS:** Hantavirus - Bunyaviridae - Rongeur - Fièvre hémorragique avec syndrome rénal - Syndrome pulmonaire à Hantavirus

### **ABSTRACT**

Les hantavirus appartiennent à la famille des Bunyaviridae et sont responsables chez l'homme de maladies appelées fièvre hémorragique avec syndrome rénal (FHSR) en Europe et en Asie, et syndrome pulmonaire à hantavirus (SPH) en Amérique. À la différence des autres Bunyaviridae, ils ne sont pas transmis par l'intermédiaire d'arthropodes et ont pour réservoir des rongeurs sauvages. Ces virus à ARN ont co-évolué avec leurs hôtes depuis plusieurs millions d'années. La diversité génétique observée parmi les hantavirus est liée à la spécificité des réservoirs et à leur distribution géographique. Les rongeurs sont infectés chroniquement et excrètent le virus dans la salive, l'urine et les matières fécales. L'homme se contamine généralement par inhalation de particules virales provenant de matériel infecté. Les épidémies de FHSR et de SPH se produisent lors de pullulations de rongeurs qui font généralement suite à des conditions écologiques inhabituelles. En Europe, les virus responsables de FHSR sont Puumala (PUU) et Dobrava (DOB). Alors que PUU est responsable d'une forme atténuée de la maladie, appelée néphropathie épidémique (NE), DOB est à l'origine de symptômes plus sévères pouvant entraîner la mort des patients. Aucun vaccin n'est actuellement disponible en Europe contre les hantavirus.

Véhiculés par des rongeurs sauvages, les hantavirus sont responsables de maladies humaines appelées fièvre hémorragique avec syndrome rénal (FHSR) en Europe et en Asie, et syndrome pulmonaire à hantavirus (SPH) en Amérique. Ils appartiennent à la famille des *Bunyaviridae* dont les autres membres sont transmis par l'intermédiaire d'arthropodes et sont classés en quatre genres désignés Bunyavirus (*Bunyamwera*, *California encephalitis*, La Crosse, Akabane), Nairovirus (*Crimean-Congo haemorrhagic fever*, *Nairobi sheep disease*), Phlebovirus (*sandfly fever*, *Rift Valley fever*, Uukuniemi) et Tospovirus (*tomato spotted wilt*) [1].

Avant que le terme général de FHSR soit proposé par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) en 1983, la maladie a connu plusieurs dénominations dont la *Songo fever* en Chine, *l'épidémie haemorrhagic fever* au Japon, en Chine et en Europe de l'Est, la *Korean haemorrhagic fever* (KHF) en Corée ou la *nephropathia epidemica* (NE) en Scandinavie. La reconnaissance du SPH en Amérique est plus récente : la première épidémie décrite date de 1993 où 40 à 50 % des patients ont succombé au choc et à la détresse respiratoire.

## Les hantavirus

### PROPRIÉTÉS ET NOMENCLATURE

Les hantavirus sont des virus enveloppés dont le génome est constitué d'un ARN simple brin tri-segmenté, de polarité négative. Les virions sont sphériques ou ovales, de 90 à 120 nm de diamètre, et contiennent trois nucléocapsides circulaires, chacune constituée d'un segment d'ARN, de nucléoprotéines et de polyméras (figure 1, A) [2]. Les segments d'ARN sont désignés L (*large*), M (*medium*) et S (*small*) (figure 1, B). Le segment L comprend environ 6 500 nucléotides (nt) et code pour l'ARN polymérase ARN-dépendante. Le segment M, d'environ 3 600 nt, code pour les glycoprotéines G1 et G2 qui forment une structure en damier à la surface de l'enveloppe lipidique. Le segment S, dont la longueur est comprise entre 1 700 et 2 100 nt, code pour la nucléoprotéine (N). Une région chevauchante avec la phase de lecture ouverte de la nucléoprotéine et codant pour une protéine non structurale (NSs) a également été mise en évidence chez certains hantavirus sans que cette protéine n'ait été détectée dans les cellules infectées.

Les hantavirus ont été initialement différenciés en quatre sérotypes principaux : Hantaan (HTN), Séoul (SEO), Puumala (PUU) et Prospect Hill (PH). D'autres virus, tels que Dobrava (DOB), Khabarovsk (KBR), Sin Nombre (SN) ou Black Creek Canal (BCC), ont également été isolés en culture cellulaire et reconnus sérologiquement distincts. L'utilisation de la RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*) et l'analyse des séquences d'ADN amplifié ont facilité la différenciation des hantavirus. Plus de 30 génotypes ont ainsi été reconnus en utilisant ces dernières méthodes (tableau). En raison de l'importante variabilité génétique parmi les souches au sein d'un même génotype et du nombre croissant de lignées et de sous-lignées phylogéniques

mises au jour, trois critères principaux ont été proposés pour distinguer les espèces d'hantavirus : le critère sérologique, selon lequel un rapport de quatre au minimum doit être observé entre les titres de séroneutralisation, le critère écologique, selon lequel chaque espèce doit posséder son propre réservoir animal, et le critère moléculaire, selon lequel les séquences en acides aminés (aa) des différentes espèces virales doivent diverger d'au minimum 7 % pour la nucléoprotéine et les glycoprotéines [7]. L'absence de réassortiment entre les souches sauvages d'espèces différentes pourrait représenter un critère supplémentaire.

## CYCLE DE MULTIPLICATION VIRALE ET MORPHOGENÈSE

Chez les rongeurs et chez l'homme, le virus se multiplie principalement dans les cellules endothéliales et les macrophages. Le cycle de multiplication débute par l'entrée du virus dans la cellule par endocytose [9]. Des études récentes ont montré que les  $\beta_3$  intégrines, récepteurs présents à la surface des plaquettes sanguines, des cellules endothéliales et des macrophages, intervenaient dans la pénétration cellulaire de virus responsables de la FHSR (PUU, HTN et SEO) et du SPH (SN et New York ou NY) [10, 11]. Les  $\beta_1$  intégrines sont, quant à elles, impliquées dans l'entrée dans la cellule de virus non pathogènes pour l'homme tels que PH ou Tula (TUL). Après libération des nucléocapsides dans le cytoplasme, la transcription primaire des ARN messagers (ARNm) est initiée à l'aide d'un oligonucléotide coiffé de 10 à 18 nt obtenu de la même façon que pour le virus influenza, c'est-à-dire par clivage (*cap-snatching*) de l'extrémité 5' d'un ARNm cellulaire [9]. La traduction des ARNm se déroule au niveau des ribosomes libres pour les segments S et L, et au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (RER) pour le segment M. Une première glycosylation des protéines G1 et G2 a lieu dans le RER où elles sont associées en hétérodimères. Des ARN complémentaires ou antigénomiques servant de matrices pour la réplication sont ensuite synthétisés. La deuxième glycosylation des glycoprotéines et l'assemblage des virions ont lieu au niveau de l'appareil de Golgi. L'assemblage des virions serait déclenché par l'interaction entre les nucléoprotéines et la portion cytoplasmique des glycoprotéines virales qui sont en position transmembranaire dans les vésicules golgiennes. L'association de la nucléoprotéine sous forme de trimères semblerait jouer un rôle dans le processus d'assemblage [12]. Ce dernier mécanisme a lieu à la surface de la membrane plasmique pour BCC et SN. La libération du virus s'effectue par exocytose.

## ÉVOLUTION ET DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE

Chaque hantavirus a pour hôte naturel un rongeur, à l'exception de Thottapalayam (TPM) qui a été isolé en Inde chez une musaraigne (*Suncus murinus*). Les espèces de rongeurs qui véhiculent les hantavirus appartiennent à trois sous-familles de Muridés : les Murinés, les Arvicolinés et les Sigmodontinés, qui sont, respectivement, les réservoirs de HTN, PUU et SN ainsi que des virus qui leur sont apparentés (figure 2, A). Des analyses basées sur l'étude de séquences génomiques virales et d'ADN mitochondrial des rongeurs ont permis de montrer une évolution parallèle des hantavirus avec leurs réservoirs, depuis plusieurs millions d'années [13, 14]. Bien que cette co-spéciation ait été constatée pour la plupart des hantavirus identifiés jusqu'à présent, un

changement d'hôte semble toutefois s'être produit chez certains virus au cours de l'évolution. La position inattendue dans les arbres phylogéniques de KBR et de Topografov (TOP) (figure 2, A) pourrait suggérer ce type de phénomène. Parmi les Arvicolinés, *Clethrionomys glareolus* véhicule PUU, des *Microtus* sont les réservoirs de TUL, PH, Isla Vista (ILV) et KBR et *Lemmus sibiricus* transmet TOP. Bien que son réservoir appartienne au genre *Microtus*, KBR est génétiquement plus proche de PUU que de TUL. Une hypothèse a été émise selon laquelle la souche à l'origine de KBR aurait été véhiculée initialement par l'ancêtre des *Clethrionomys*, puis transmise à une espèce de *Microtus* [15]. Un phénomène semblable dans l'évolution de TOP pourrait expliquer sa position dans le groupe des virus apparentés à PUU.

Au sein d'une même espèce d'hantavirus, la variabilité génétique parmi les souches est directement liée à leur origine géographique. En Europe, différentes lignées représentées par des variants provenant respectivement de Finlande, de Suède, de Norvège, du Danemark, de Russie, d'Autriche, de Belgique et d'Allemagne ont été mises en évidence dans le groupe PUU (figure 2, B). La relation entre la parenté génétique et l'origine géographique des souches est liée aux mouvements limités des espèces réservoir et aux barrières géographiques empêchant la migration des animaux ou la transmission du virus à d'autres populations de rongeurs. Toutefois, plus que l'origine géographique, la spécificité de l'hôte détermine les relations génétiques entre les hantavirus. En Suède, l'adaptation de souches PUU à deux sous-espèces distinctes de campagnols roussâtres semble avoir engendré une divergence génétique considérable entre ces virus présentant pourtant une zone de distribution géographique commune. Basé sur l'analyse de séquences en aa de G2, le groupement phylogénique des virus BCC et Bayou (BAY), originaires respectivement de Floride et de Louisiane, avec les virus sud-américains en est un exemple supplémentaire : les réservoirs de BCC et de BAY sont en effet génétiquement plus proches des rongeurs d'Amérique du Sud que de ceux d'Amérique du Nord [23].

Outre le réassortiment [24-26] et la recombinaison [27], le principal mécanisme assurant l'évolution des hantavirus semble être la dérive génétique, par accumulation de substitutions, de délétions et d'insertions. La grande hétérogénéité des populations de virus à ARN est liée à l'absence d'activité correctrice de leur polymérase. L'étude de souches PUU, TUL et SN sauvages a montré que les rongeurs étaient infectés par des populations virales hétérogènes constituées de variants génétiquement proches ou quasi-espèces. La comparaison de séquences de virus PUU ou SN prélevés dans une même localité à une dizaine d'années d'intervalle a montré des pourcentages de divergence génétique de l'ordre de 1 % pour les segments S et M [21, 28]. Une telle dérive génétique ne semble pas être le résultat de la seule accumulation de mutations ponctuelles au cours du temps. Elle trouverait également son origine dans la dynamique des populations de rongeurs : une diminution sévère de la taille de la population peut en effet conduire à l'extinction des virus qui dominaient jusque-là et à l'établissement de nouveaux variants véhiculés par les rongeurs qui auront survécu au déclin. Ce phénomène, appelé effet de fondation [29], se produit au hasard, est indépendant d'une quelconque sélection positive et peut être à l'origine du remplacement d'une population virale par une autre. Il est toutefois intéressant de noter que la plupart des mutations nucléotidiques observées étaient silencieuses et que les substitutions en aa étaient neutres. Cette dernière observation suggère qu'au sein d'une même

espèce les hantavirus se caractérisent par une stabilité phénotypique importante et que leur évolution s'opère principalement par l'accumulation de mutations neutres ou quasi-neutres.

La variabilité génétique parmi les différentes espèces d'hantavirus est comprise entre 30 et 40 % pour l'ensemble du génome [2]. Les séquences en aa des protéines de différentes espèces d'hantavirus présentent une diversité comprise entre 10 et 30 % pour la polymérase, entre 15 et 40 % pour la nucléoprotéine et entre 20 et 50 % pour les glycoprotéines G1 et G2. Au sein d'une même espèce d'hantavirus, le segment M peut présenter une variabilité génétique atteignant 20 % pour HTN et 7 % pour SEO. Des valeurs de 13 à 14 % ont été observées entre des virus SN pour le segment S. Parmi les hantavirus, les souches PUU se montrent les plus variables, avec une diversité génétique avoisinant 20 % pour la région codante du segment S et 30 % pour la région non codante de son extrémité 3' [7].

## La fièvre hémorragique avec syndrome rénal (FHSR) et le syndrome pulmonaire à hantavirus (SPH)

### ASPECTS ÉPIDÉMIOLOGIQUES

Le groupe des hantavirus pathogènes pour l'homme comprend HTN et SEO en Asie (des cas sporadiques de FHSR associés à SEO ont également été documentés en Europe et en Amérique), PUU et DOB en Europe, SN, BAY, BCC, Monongahela (MGL) et NY en Amérique du Nord, et Andes (AND) et les virus qui lui sont apparentés en Amérique du Sud. Le taux de mortalité de la FHSR varie entre 0,1 et 0,2 % pour une infection causée par PUU et entre 10 et 15 % pour les cas associés à HTN et DOB [30, 31]. Les hantavirus responsables du SPH, également appelé récemment syndrome cardio-pulmonaire à hantavirus (SCPH), entraînent une mortalité plus élevée qui atteint en moyenne 45 %. Dans beaucoup de pays, la FHSR et le SPH représentent un problème grave de santé publique. En Chine, entre 150 et 200 000 cas de FHSR sont répertoriés chaque année. Dans le Nord de l'Europe, l'incidence annuelle de la NE varie entre 100 et 300 cas en Suède et atteint le millier de cas en Finlande. En France, en Allemagne, aux Pays-Bas et en Belgique, des anticorps dirigés contre PUU ont été détectés chez 1 à 2 % de la population testée. En Amérique du Nord, plus de 300 cas de SPH ont été documentés depuis 1993 dans 29 états des États-Unis et dans quatre provinces du Canada. Des épidémies et des cas sporadiques ont également été rapportés en Amérique du Sud et, récemment, en Amérique centrale. La transmission de l'hantavirose chez l'homme résulte de l'inhalation de particules virales provenant de la salive, de l'urine ou des déjections de rongeurs infectés. Plus rarement, la contamination a aussi été associée à une morsure. L'apparition des cas d'hantavirose est généralement saisonnière et dépend des fluctuations de densité de population des rongeurs et des activités humaines. L'hantavirose est plus fréquemment observée chez les hommes et atteint principalement les individus âgés de 25 à 50 ans.

En Asie, l'incidence de la FHSR causée par le virus HTN présente généralement un pic principal à la fin de l'automne et au début de l'hiver, et est liée aux activités agricoles qui augmentent le risque de contact avec *Apodemus agrarius*. Le virus SEO est véhiculé par les rats (*Rattus norvegicus* et *Rattus rattus*) et les cas de FHSR qui lui sont associés en Asie apparaissent toute l'année dans les zones urbaines.

En Europe, le virus DOB possède deux variants dont les hôtes respectifs sont *Apodemus flavicollis* et *Apodemus agrarius agrarius*. Le virus véhiculé par *Apodemus agrarius agrarius*, dont le prototype est la souche Saaremaa (SAA) isolée en Estonie, est à l'origine d'une forme modérée de FHSR dont aucun cas mortel n'a été rapporté. Le virus transmis par *Apodemus flavicollis* est responsable d'une maladie plus grave qui atteint principalement les agriculteurs et les travailleurs forestiers, les gardiens de troupeaux et les militaires. Présentant à la fois une pathogénie de l'infection et des hôtes naturels différents, ces deux virus DOB semblent en réalité appartenir à deux espèces d'hantavirus distinctes [7].

L'incidence de la NE est la plus élevée dans le Nord de l'Europe où les densités de population de *Clethrionomys glareolus* (ou campagnol roussâtre) (figure 3) varient de façon cyclique sur des périodes de trois ou quatre ans. Les cas de NE sont essentiellement observés en milieu rural. Des épidémies de NE ont également été rapportées entre 1983 et 1996 dans plusieurs pays de l'Ouest de l'Europe dont la France, l'Allemagne, les Pays-Bas et la Belgique. Deux épidémies se sont produites simultanément en France et en Belgique en 1992-1993 et en 1995-1996 [32-34]. La plupart des cas ont été recensés de part et d'autre de la frontière entre les deux pays : dans les départements de l'Aisne et des Ardennes en France, et dans la région de l'Entre-Sambre-et-Meuse en Belgique où une troisième épidémie s'est produite en 1999. L'abondance des forêts de feuillus dans cette région constitue un environnement favorable pour le campagnol roussâtre. L'exposition à des déjections de rongeurs ou la capture de ces derniers, l'ouverture d'une pièce restée fermée pendant l'hiver, la coupe de bois, des activités prolongées en forêt ou des efforts intenses dans un lieu contaminé représentent des facteurs de risque pour développer une NE. Le virus PUU a également été détecté chez le campagnol de Sundevall (*Clethrionomys rufocanus*) au Japon, sans que cet agent ait été associé à une pathologie chez l'homme.

L'épidémie de SPH décrite en 1993 aux États-Unis est survenue suite à des modifications climatiques qui ont engendré dans la région semi-désertique de Four Corners une pullulation de *Peromyscus maniculatus*, réservoir de SN [35, 36]. Le SPH est généralement rapporté en zone rurale, chez des agriculteurs ou des personnes ayant occupé des espaces fermés infestés de rongeurs.

Bien qu'aucune transmission nosocomiale des virus responsables de la FHSR n'ait été rapportée, une contamination entre individus a été suspectée en Argentine lorsque plusieurs personnes, dont un médecin, en contact avec des malades ont développé un SPH alors qu'elles n'avaient pas visité la zone épidémique [37, 38]. L'hypothèse de transmission du virus entre individus a été confirmée par l'analyse de séquences du génome viral provenant des différents patients.

## SYMPTÔMES ET PATHOGÉNIE

La période d'incubation de la FHSR dure généralement deux à trois semaines [30, 31]. La maladie débute ensuite par de la fièvre, des maux de tête, des myalgies, des nausées, des vomissements et des douleurs abdominales et lombaires. Des manifestations hémorragiques peuvent alors être observées, telles que le purpura au niveau du visage, du cou et des membres antérieurs. L'analyse sanguine révèle une thrombocytopénie, une augmentation du nombre de globules blancs et une hémococoncentration. Dans les cas les plus graves, les symptômes classiques du choc (tachycardie, pouls filant, hypotension) peuvent apparaître et engendrer la mort des patients. Une augmentation du taux d'urée et de créatinine dans le sang et une acidose métabolique associées à une insuffisance rénale sont régulièrement rapportées. La convalescence peut durer plusieurs mois et la récupération est complète chez la plupart des patients. Dans le tableau clinique de la NE, les symptômes associés à l'insuffisance rénale prédominent alors que les manifestations hémorragiques sont discrètes ou inexistantes. Une infection par PUU peut également être asymptomatique ou simplement caractérisée par des symptômes grippaux. Dans le SPH, les manifestations hémorragiques sont absentes et les troubles sont essentiellement cardiaques et respiratoires. L'œdème pulmonaire est à l'origine de la détresse respiratoire dont la sévérité est associée à un pronostic sombre. L'analyse sanguine révèle également une hémococoncentration, une thrombocytopénie et une leucocytose. La plupart des symptômes observés pendant la FHSR et le SPH ont été associés à l'augmentation de perméabilité des capillaires [39, 40]. Ce phénomène serait à l'origine des troubles systémiques, tels que l'hypotension et le choc, et de l'insuffisance rénale dans le cas de la FHSR. Les hémorragies dans la FHSR seraient le résultat d'une consommation plaquettaire accrue associée aux lésions vasculaires, à un mécanisme immun et/ou à l'interaction des hantavirus avec les  $\beta_3$  intégrines. Ces molécules jouent en effet un rôle important dans l'adhésion et l'activation plaquettaire, mais aussi dans la régulation de la perméabilité vasculaire. Aucun effet cytopathogène n'a été montré au niveau des cellules endothéliales où les hantavirus se multiplient. Le développement de la réponse immune primaire dès l'apparition des symptômes, l'activation des lymphocytes T  $CD8^+$  et l'augmentation dans le sang du taux de cytokines telles que l'interféron-gamma, le *tumor necrosis factor-alpha* et les interleukines 1, 2, 6 et 10 suggèrent un rôle prépondérant du système immunitaire dans la pathogénie de l'hantavirose dont l'augmentation de la perméabilité vasculaire [39-41]. De plus, dans le cas de la FHSR, la circulation de complexes immuns et une activation du complément ont été observées. Finalement, une relation a été établie entre la gravité de la NE et la présence chez les patients des allèles HLA B8, DQ2 et DR3 [42].

## DIAGNOSTIC, TRAITEMENT ET VACCINS

Le diagnostic de la FHSR et du SPH est basé sur l'anamnèse et les symptômes, et est confirmé par un test sérologique. Les immunoglobulines M (IgM) spécifiques sont détectées dès la première semaine de la maladie et peuvent persister chez le patient pendant plusieurs mois [43]. Les immunoglobulines G (IgG) dirigées contre les hantavirus apparaissent un peu plus tard que les IgM et sont détectables pendant plusieurs dizaines d'années. Les immunoglobulines A (IgA) spécifiques

atteignent des taux élevés dans le sang pendant la phase aiguë de la maladie et leur dosage pourrait faciliter le diagnostic précoce de l'infection dans les cas où la réponse en IgM est faible. De plus, la recherche dans la salive des IgA dirigées contre les hantavirus s'avérerait utile dans les cas où une prise de sang ne peut être réalisée, notamment pour des motifs culturels. La nucléoprotéine est hautement immunogène et induit une réponse en anticorps non neutralisants qui reconnaissent les nucléoprotéines de plusieurs espèces d'hantavirus. Les anticorps dirigés contre les glycoprotéines G1 et G2 sont quant à eux neutralisants, inhibent l'hémagglutination et réagissent plus spécifiquement envers les différentes souches virales. À l'origine, les anticorps dirigés contre les hantavirus étaient détectés par immunofluorescence et par Elisa (*enzyme-linked immunosorbent assay*) en utilisant des lysats de cellules infectées comme antigènes. La multiplication des hantavirus en milieu cellulaire étant relativement lente et nécessitant une infrastructure à haut niveau de biosécurité, la recherche diagnostique s'est davantage tournée vers l'utilisation d'antigènes recombinants. Des tests basés sur l'utilisation de nucléoprotéine recombinante exprimée en système baculovirus ou par *Escherichia coli* ont été développés au cours de ces dernières années pour le diagnostic précoce de la maladie. Des tests de séroneutralisation sont également utilisés pour déterminer de façon précise le sérotype incriminé dans l'infection. L'utilisation de la RT-PCR pour la détection d'ARN viral dans le sérum, l'urine, le liquide de lavage trachéo-bronchique ou les organes de patients a aussi été documentée et permet notamment de caractériser rapidement la souche virale à l'origine de l'infection.

Bien que l'on ait montré que l'administration par voie intraveineuse de ribavirine réduit le taux de mortalité et la gravité des symptômes de la FHSR en Chine, aucun traitement spécifique n'existe pour soigner l'hantavirose chez l'homme. Les cas graves de FHSR requièrent une hospitalisation, des soins intensifs pendant la phase aiguë, une fluidothérapie adaptée et l'administration de substances vasotoniques. La dialyse peut être employée dans les cas graves d'insuffisance rénale. Le traitement du SPH requiert également une hospitalisation, une fluidothérapie, l'administration de substances vasotoniques et une assistance respiratoire. La ribavirine n'a montré aucune efficacité dans le traitement du SPH.

En Asie, des vaccins inactivés, dérivés de cultures cellulaires ou de cerveaux de rongeurs infectés avec les virus HTN et/ou SEO, ont été développés et testés contre la FHSR. Un tel vaccin dirigé contre le virus HTN (Hantavax™) est commercialisé en Corée du Sud depuis 1990. Des vaccins basés sur l'utilisation du virus de la vaccine, du virus Sindbis ou de baculovirus recombinés permettant l'expression des glycoprotéines G1 et G2 de HTN ou SEO se sont montrés efficaces chez les rongeurs en induisant une réponse en anticorps neutralisants et protecteurs. Récemment, le virus de la vaccine recombiné permettant l'expression de la nucléoprotéine et des glycoprotéines de HTN a été inoculé à des volontaires parmi lesquels 72 % (31/43) ont développé des anticorps neutralisants [44]. La nucléoprotéine recombinante de différentes souches d'hantavirus, exprimée par des bactéries, en système baculovirus ou comme particule de la capsid du virus de l'hépatite B, s'est également montrée efficace dans la protection de rongeurs, en dépit de l'absence d'anticorps neutralisants. Finalement, des anticorps neutralisants et protecteurs ont été développés chez des rongeurs vaccinés avec de l'ADN nu codant pour les glycoprotéines G1 et G2 de SEO [45]. Des fragments d'ADN codant pour une partie des glycoprotéines G1 et G2 et la

nucléoprotéine de SN ont également induit une réponse immune chez des souris, suggérant la possible utilisation d'ADN nu dans l'élaboration d'un vaccin contre cette souche responsable de SPH [46].

Les vaccins basés sur l'utilisation de virus de la vaccine recombiné et d'ADN nu exprimant respectivement les glycoprotéines de HTN et de SEO ont montré une protection croisée contre des virus génétiquement proches (SEO et HTN/DOB), mais pas contre PUU [47]. En Europe, comme aux États-Unis, aucun vaccin contre PUU ou SN n'a été commercialisé jusqu'à présent.

## L'hantavirose chez les rongeurs

### BIOLOGIE DE L'INFECTION ET PERSISTANCE VIRALE

L'hantavirose chez les rongeurs sauvages est chronique et apparemment asymptomatique, bien que des inoculations de souriceaux et de rats nouveau-nés avec les virus HTN ou SEO se soient révélées fatales. L'infection chez les rongeurs est suivie d'une virémie qui dure généralement environ une semaine. Le virus est alors distribué dans différents organes dont les principaux sont les poumons et les reins. Des anticorps apparaissent ensuite et persistent pendant toute la vie de l'individu, sans empêcher l'expression des antigènes viraux dans les organes. L'excrétion prolongée du virus dans la salive, l'urine et les matières fécales assure son maintien dans les zones où l'hantavirose est enzootique : l'exposition au nid contaminé, le toilettage et les blessures par morsure sont en effet autant de sources de contamination pour les animaux. Les rongeurs nouveau-nés sont apparemment protégés par les anticorps maternels. Des expériences réalisées chez *Sigmodon hispidus* ont toutefois montré récemment la présence de virus infectieux chez certains nouveau-nés dont les mères avaient été inoculées avec BCC [48]. La présence du virus a également été détectée chez des fœtus, suggérant la possibilité d'une transmission verticale de BCC.

Chez les espèces réservoir, les hantavirus sont maintenus de façon persistante dans l'organisme (principalement au niveau des poumons, des reins et de la rate) et ce en dépit de la présence d'anticorps neutralisants dans le sang. Cette infection chronique pourrait être le résultat d'une variation antigénique du virus, d'une régulation de l'expression virale ou d'une modulation de la réponse immune de l'hôte [49]. La phase aiguë de l'infection, qui dure trois à quatre semaines, est caractérisée par la présence de grandes quantités de virus infectieux dans de nombreux organes. En revanche, pendant la phase de persistance proprement dite, le virus n'est plus détecté qu'en quantité limitée et de façon intermittente dans certains tissus ou sécrétions. Ces observations suggèrent qu'une régulation du cycle de multiplication virale intervient lorsque la phase de persistance est établie. La détection chez les virus TUL et SEO de délétions dans les segments S, M et L au niveau des extrémités supposées jouer un rôle dans l'initiation de la transcription et de la réplication pourrait étayer cette hypothèse [50, 51]. L'entrée en compétition des segments d'ARN délétés, ne pouvant être ni transcrits ni répliqués, avec les segments complets pourrait entraver

l'expression des protéines virales et limiter la multiplication du virus. Libérés par les cellules en quantité réduite et de façon intermittente pendant la phase de persistance, les hantavirus contourneraient de cette façon la réponse immune de leur hôte [49]. La présence des hantavirus sous forme de population hétérogène chez un même rongeur infecté a également été proposée récemment comme facteur intervenant dans la persistance virale : en assurant des modifications antigéniques, la variation génétique des virus pourrait en effet leur permettre d'échapper au système immunitaire de l'hôte [52].

## DYNAMIQUE DE L'INFECTION DANS LES POPULATIONS DE RONGEURS

Les épidémies de FHSR et de SPH sont généralement associées à une forte augmentation des densités de population des rongeurs (figure 4). Ce phénomène facilite la propagation du virus parmi les animaux et augmente ainsi les risques pour l'homme de contacts avec des rongeurs ou du matériel contaminé. Les facteurs écologiques tels que les conditions climatiques, l'abondance de la nourriture, la présence de prédateurs et d'agents pathogènes interviennent dans les fluctuations de densité de population des rongeurs et peuvent par conséquent être déterminants dans l'apparition de l'hantavirose chez l'homme. Une abondance exceptionnelle de faines et/ou de glands et des conditions climatiques favorables ont probablement été à l'origine de la prolifération des campagnols roussâtres observée lors des trois épidémies de NE en Belgique [32, 53]. Ces modifications importantes de densité de population se sont accompagnées de fortes augmentations de la prévalence de l'infection qui dépassait 40 % chez les campagnols roussâtres en mai 1999 (figure 5). Dans le Sud-Ouest des États-Unis, l'épidémie de SPH en 1993 a été associée aux précipitations abondantes occasionnées par *El Niño*. Ces conditions climatiques ont en effet engendré une production importante de pignons de pin, conduisant à la pullulation de *Peromyscus maniculatus* [35, 36]. En dehors des périodes épidémiques, il ne semble pas exister une relation directe entre la prévalence de l'infection chez les rongeurs et leur densité de population au même moment. De plus, la distribution des animaux positifs se présente alors généralement sous forme de foyers isolés. Des résidents infectés de façon permanente et excréteurs du virus et un seuil de densité de population seraient, parmi d'autres, des facteurs nécessaires pour assurer le maintien du virus dans les foyers endémiques.

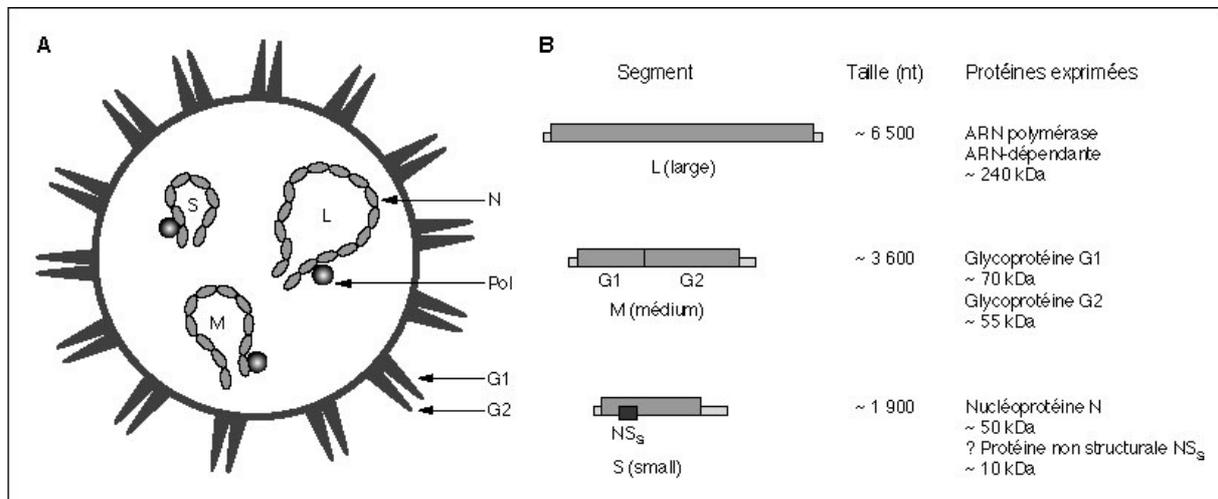
La prévalence de l'infection chez les espèces réservoir est généralement plus élevée chez les mâles adultes dont l'agressivité accrue et la taille du domaine vital augmentent probablement les risques d'exposition au virus [54]. L'isolement des femelles pendant la période de reproduction et leurs mouvements limités au lieu de nidification pourraient expliquer leur rôle secondaire dans le maintien du cycle enzootique du virus. La transmission du virus par voie sexuelle n'a pas été montrée jusqu'à présent mais les contacts entre les rongeurs pendant la copulation peuvent toutefois constituer un mode de contamination pour les animaux.

## Conclusion

Les médecins occidentaux ont réalisé pour la première fois l'importance de la FHSR en santé publique lors de la guerre de Corée où plus de 3 000 soldats des Nations Unies ont contracté la maladie qui a été fatale pour 10 à 15 % d'entre eux. Par la suite, des cas humains d'hantavirose ont été décrits dans de nombreux pays à travers le monde, la reconnaissance du SPH en Amérique étant la plus récente. Dans le Nord et l'Ouest de l'Europe, seuls des cas humains associés au virus PUU ont été identifiés. Toutefois, la détection d'anticorps dirigés contre DOB chez certains patients dans l'Est de l'Allemagne [8], des résultats sérologiques douteux obtenus notamment en Belgique chez *Apodemus sylvaticus* et *Apodemus flavicollis* [53], et la mise en évidence d'antigènes viraux chez *Rattus norvegicus* pourraient suggérer que DOB, SEO et/ou un hantavirus apparenté et non encore identifié, circulent parmi les rongeurs dans cette partie du continent.

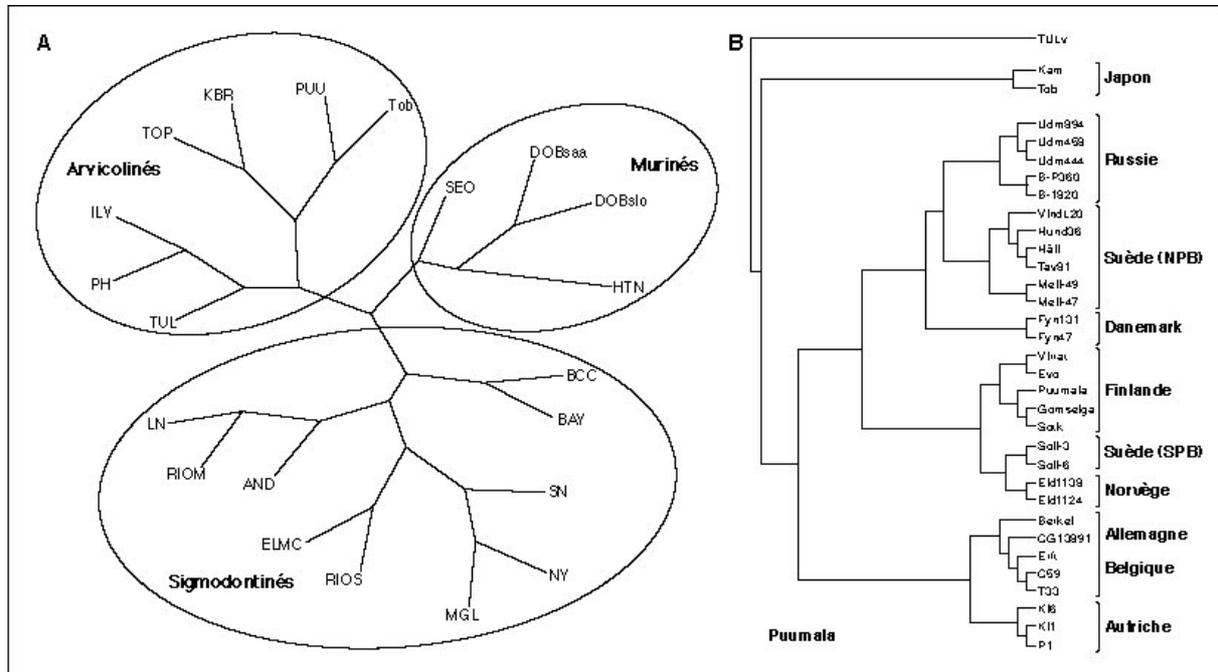
La classification des hantavirus est fondée notamment sur la distinction entre les espèces de rongeurs réservoir. Par espèce distincte, on entend d'un point de vue phylogénique la plus petite unité taxonomique isolée génétiquement, c'est-à-dire dont la reproduction se limite à l'espèce, et présentant une distribution géographique et écologique déterminée [28]. Des imprécisions dans la taxonomie des rongeurs rendent parfois difficile l'application d'une telle définition et compliquent par conséquent la classification des hantavirus. C'est le cas notamment pour les virus SN et MGL qui sont véhiculés par deux types différents de *Peromyscus maniculatus* initialement considérés comme appartenant à la même espèce mais distingués récemment par l'analyse de leur ADN mitochondrial [7]. D'autre part, la transmission de virus à d'autres espèces animales (*spill-over*), notamment pendant les périodes épidémiques, ou l'adaptation d'un hantavirus à un nouvel hôte (*host-switch*) au cours de l'évolution risquent également de créer une certaine confusion lors de la distinction entre les espèces virales ou lors de l'interprétation des données phylogéniques. L'étude de l'évolution des hantavirus semble donc être indissociable de celle de leurs hôtes puisque, en outre, la distribution géographique des virus et leur diversité génétique sont le résultat des phénomènes de spéciation et de migration chez les rongeurs et de leur adaptation à des niches écologiques spécifiques.

Figure 1.



Légende de la figure 1. Représentation schématique d'un hantavirus. B. Organisation génomique des hantavirus et protéines virales exprimées. G1, G2 : glycoprotéines d'enveloppe ; N : nucléoprotéine associée aux ARN S, M et L ; Pol : ARN polymérase ARN-dépendante. (Rectangle gris) : région non codante ; kDa : kilodaltons

Figure 2. Les arbres ont été construits à l'aide du package Phylip [22]. Pour chaque analyse, 500 données simulées des séquences ont été générées et un arbre consensus a été déterminé après l'application de la fonction algorithmique Neighbor Joining (NJ).



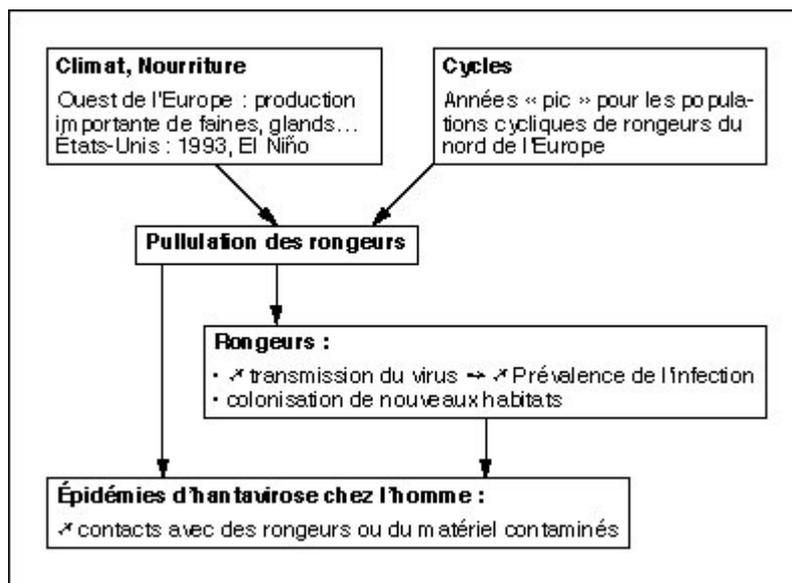
Légende de la figure 2. Relations phylogéniques entre les hantavirus établies sur la base de l'analyse de la région codante du segment S (nt 43-1345) et représentation des sous-familles de rongeurs réservoir. Les abréviations sont présentées dans le tableau ; DOB slo : Dobrava Slovénie. B. Phylogénie basée sur la comparaison de séquences du segment S (nt 361-968) de souches Puumala européennes et japonaises [13, 16-21]. TULv : Tula, souche Moravia/5302v/95 ; Kam : Kamiiso-8Cr-95 ; Tob : Tobetsu/60Cr/93 ; Udm894 : Udmurtia/894Cg/91 ; Udm458 : Udmurtia/458Cg/88 ; Udm444 : Udmurtia/444Cg/88 ; B-P360 : Bashkiria/P360 ; B-1820 : Bashkiria/CG1820 ; VindL20 : Vindeln/L20Cg/83 ; Hund36 : Hundberget/36Cg/94 ; Häll : Hallnäs B1 ; Tav81 : Tavelsjö/81Cg/94 ; Mell-49 : Mellansel/49Cg/94 ; Mell-47 :

Mellansel/47Cg/94 ; Fyn131 : Fyn/Cg131/00 ; Fyn47 : Fyn/Cg47/00 ; Virrat : Virrat/25Cg/95 ; Evo : Evo/15Cg/93 ; Puumala : Puumala/1324Cg/79 ; Gomselga : Gomselga/Cg4/95 ; Sotk : Sotkamo ; Soll-3, Sollefteå/3Cg/94 ; Soll-6 : Sollefteå/6Cg/95 ; Eid1138 : Eidsvoll/1138Cg/87 ; Eid1124 : Eidsvoll/1124v ; Berkel : PUU/Berkel ; CG13891 : PUU/CG13891 ; Erft : PUU/Cg-Erft ; C59 : PUU/Couvin/59Cg/97 ; T33 : PUU/Thuin/33Cg/96 ; K16 : PUU/Cg-Klippitztörl6 ; K11 : PUU/Cg-Klippitztörl1 ; P1, PUU/Cg-Preitenegg1 ; VNPB : north of the bank vole population border ; SPB : south of the bank vole population border.

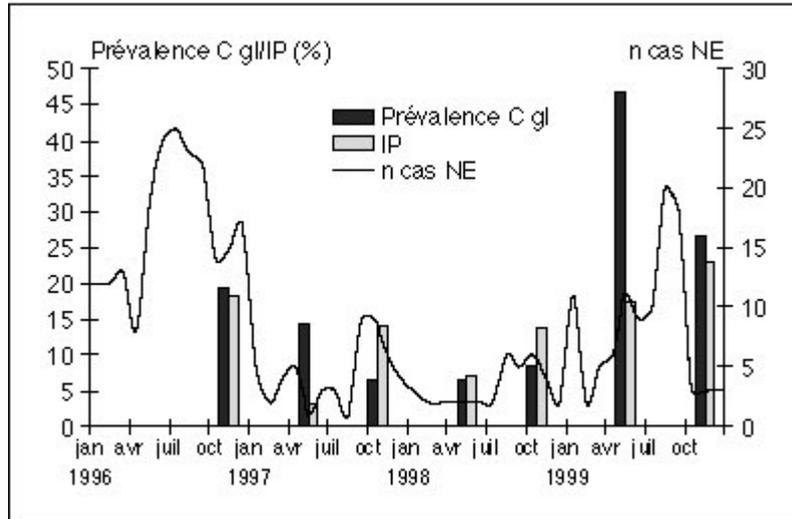
**Figure 3.** Campagnol roussâtre (*Clethrionomys glareolus*), espèce réservoir du virus Puumala.



**Figure 4.** Processus à l'origine de l'apparition d'épidémies d'hantavirose chez l'homme.



**Figure 5.** Relation entre l'index de piégeage (IP) et la prévalence de l'hantavirose chez les campagnols roussâtres (*C gl*) capturés dans l'Entre-Sambre-et-Meuse et le nombre de cas (*n cas*) de NE enregistrés entre 1996 et 1999 en Belgique. D'après [53] ; Research Laboratory for Vector-Borne Diseases, Hôpital Militaire de Bruxelles.



**Tableau.** Réservoir, pathogénicité pour l'homme et distribution géographique des principaux hantavirus identifiés. D'après [3-8]

Hantavirus	Réservoir	Maladie	Distribution
	<b>Ordre des rongeurs</b>		
	<b>Famille des Muridés</b>		
	<b>Sous-famille des Murinés</b>		
Hantaan (HTN)	<i>Apodemus agrarius manchuricus</i>	FHSR sévère <sup>1</sup>	Asie (Chine, Corée, Japon, Russie)
Séoul (SEO)	<i>Rattus rattus</i> , <i>R. norvegicus</i>	FHSR modérée	Mondiale
Dobrava (DOB)	<i>Apodemus flavicollis</i>	FHSR sévère	Balkans, Slovaquie
DOB Estonie : Saaremaa (SAA)	<i>Apodemus agrarius agrarius</i>	FHSR modérée	Estonie, Russie, Slovaquie, Hongrie, Allemagne
Thailand (THAI)	<i>Bandicota indica</i>	Non rapportée	Thaïlande
	<b>Sous-famille des Arvicoles</b>		
Puumala (PUU)	<i>Clethrionomys glareolus</i>	NE <sup>2</sup>	Europe
PUU Japon : Tobetsu (TOB)	<i>Clethrionomys rufocanus</i>	Non rapportée	Japon
Tula (TUL)	<i>Microtus arvalis</i> , <i>M. rossiaemeridionalis</i>	Non rapportée	Russie, République Tchèque, Slovaquie, Autriche, Pologne, Suisse
Topografov (TOP)	<i>Lemmus sibiricus</i>	Non rapportée	Sibérie
Khabarovsk (KBR)	<i>Microtus fortis</i>	Non rapportée	Est de la Russie
Prospect Hill (PH)	<i>Microtus pennsylvanicus</i>	Non rapportée	États-Unis, Canada
Isla Vista (ILV)	<i>Microtus californicus</i>	Non rapportée	États-Unis
Bloodland Lake (BLL)	<i>Microtus ochrogaster</i>	Non rapportée	États-Unis
	<b>Sous-famille des Sigmodontines</b>		
Sin Nombre (SN)	<i>Peromyscus maniculatus</i> (prairie)	SPH <sup>3</sup>	États-Unis, Canada, Mexique
New York (NY)	<i>Peromyscus leucopus</i> (est)	SPH	États-Unis
Blue River (BR)	<i>Peromyscus leucopus</i> (sud-ouest, nord-ouest)	Non rapportée	États-Unis
Bayou (BAY)	<i>Oryzomys palustris</i>	SPH	États-Unis
Black Creek Canal (BCC)	<i>Sigmodon hispidus</i>	SPH	États-Unis
Monongahela (MGL)	<i>Peromyscus maniculatus</i> (forêt)	SPH	États-Unis, Canada
El Moro Canyon (ELMC)	<i>Reithrodontomys megalotis</i>	Non rapportée	États-Unis, Mexique
Mulshoe (MUL)	<i>Sigmodon hispidus</i>	Non rapportée	États-Unis
Rio Segundo (RIOS)	<i>Reithrodontomys mexicanus</i>	Non rapportée	Costa Rica
Andes (AND)	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	SPH	Argentine, Chili
Laguna Negra (LN)	<i>Calomys laucha</i>	SPH	Paraguay, Chili, Bolivie
Oran (ORN)	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	SPH	Argentine
Pergamino (PRG)	<i>Akodon azarae</i>	Non rapportée	Argentine
Maciel (MAC)	<i>Bolomys obscurus</i>	Non rapportée	Argentine
Bermejo (BMJ)	<i>Oligoryzomys chacoensis</i>	Non rapportée	Argentine
Lechiguana (LEC)	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	SPH	Argentine
Rio Mamore (RIOM)	<i>Oligoryzomys microtis</i>	Non rapportée	Bolivie, Pérou
Cano Delgadito (CDG)	<i>Sigmodon alstoni</i>	Non rapportée	Venezuela
Juquitiba (JUQ)	Inconnu	SPH	Bésil
Araraquara (ARA)	Inconnu	SPH	Bésil
Castelo dos Sonhos (CAS)	Inconnu	SPH	Bésil
Choco (CHO)	<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	SPH	Panama
Calabazo	<i>Zygodontomys brevicauda</i>	Non rapportée	Panama
	<b>Ordre des Insectivores</b>		
Thottapalayam (TPM)	<i>Suncus murinus</i>	Non rapportée	Inde

<sup>1</sup> Fièvre hémorragique avec syndrome rénal.

<sup>2</sup> Néphropathie épidémique.

<sup>3</sup> Syndrome pulmonaire à hantavirus.

## References

1. Calisher CH. History, classification, and taxonomy of viruses in the family *Bunyaviridae*. In : Elliott RM, ed. *The Bunyaviridae*. New York : Plenum Press, 1996 : 1-18.
2. Schmaljohn CS. Molecular biology of hantaviruses. In : Elliott RM, ed. *The Bunyaviridae*. New York : Plenum Press, 1996 : 63-90.
3. Schmaljohn CS, Hjelle B. Hantaviruses : a global disease problem. *Emerg Infect Dis* 1997 : 3 : 95-104.
4. Levis S, Morzunov SP, Rowe JE, et al. Genetic diversity and epidemiology of hantaviruses in Argentina. *J Infect Dis* 1998 : 177 : 529-38.
5. Young JC, Mills JN, Enria DA, Dolan NE, Khan AS, Ksiazek TG. New World hantaviruses. *Br Med Bull* 1998 : 54 : 659-73.
6. Vincent MJ, Quiroz E, Gracia F, et al. Hantavirus pulmonary syndrome in Panama : identification of novel hantaviruses and their likely reservoirs. *Virology* 2000 : 277 : 14-9.
7. Plyusnin A, Morzunov S. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. *Curr Top Microbiol Immunol* 2001 : 256 : 47-75.
8. Sibold C, Ulrich R, Labuda M, et al. Dobrava hantavirus causes hemorrhagic fever with renal syndrome in Central Europe and is carried by two different *Apodemus* mice species. *J Med Virol* 2001 : 63 : 158-67.
9. Schmaljohn CS. *Bunyaviridae* : the viruses and their replication. In : Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Helnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE, eds. *Fields virology*. Philadelphia : Lippincott - Raven Publishers, 1996 : 1447-71.
10. Gavrilovskaya IN, Shepley M, Shaw R, Ginsberg MH, Mackow ER. Beta3 integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 : 95 : 7074-9.
11. Gavrilovskaya IN, Brown EJ, Ginsberg MH, Mackow ER. Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by beta3 integrins. *J Virol* 1999 : 73 : 3951-9.
12. Alfadhli A, Love Z, Arvidson B, Seeds J, Willey J, Barklis E. Hantavirus nucleocapsid protein oligomerization. *J Virol* 2001 : 75 : 2019-23.
13. Plyusnin A, Vapalahti O, Vaheri A. Hantaviruses : genome structure, expression and evolution. *J Gen Virol* 1996 : 77 : 2677-87.
14. Morzunov SP, Rowe JE, Ksiazek TG, Peters CJ, St Jeor SC, Nichol ST. Genetic analysis of the diversity and origin of hantaviruses in *Peromyscus leucopus* mice in North America. *J Virol* 1998 : 72 : 57-64.
15. Vapalahti O, Lundkvist A, Fedorov V, et al. Isolation and characterization of a hantavirus from *Lemmus sibiricus* : evidence for host switch during hantavirus evolution. *J Virol* 1999 : 73 : 5586-92.
16. Bowen MD, Gelbmann W, Ksiazek TG, Nichol ST, Nowotny N. Puumala virus and two genetic variants of Tula virus are present in Austrian rodents. *J Med Virol* 1997 : 53 : 174-81.
17. Lundkvist A, Wiger D, Hörling J, et al. Isolation and characterization of Puumala hantavirus from Norway : evidence for a distinct phylogenetic sublineage. *J Gen Virol* 1998 : 79 : 2603-14.

18. Heiske A, Anheier B, Pilaski J, Volchkov VE, Feldmann H. A new *Clethrionomys*-derived hantavirus from Germany : evidence for distinct genetic sublineages of Puumala viruses in Western Europe. *Virus Res* 1999 : 61 : 101-12.
19. Kariwa H, Yoshimatsu K, Sawabe J, et al. Genetic diversities of hantaviruses among rodents in Hokkaido, Japan and Far East Russia. *Virus Res* 1999 : 59 : 219-28.
20. Asikainen K, Hänninen T, Henttonen H, et al. Molecular evolution of Puumala hantavirus in Fennoscandia : phylogenetic analysis of strains from two recolonization routes, Karelia and Denmark. *J Gen Virol* 2000 : 81 : 2833-41.
21. Escutenaire S, Chalon P, Heyman P, et al. Genetic characterisation of Puumala hantavirus strains from Belgium : evidence for a distinct phylogenetic lineage. *Virus Res* 2001 : 74 : 1-15.
22. Felsenstein J. *Phylip* (Phylogeny Inference Package) (1993), version 3.5c.
23. Johnson AM, de Souza LTM, Ferreira IB, et al. Genetic investigation of novel hantaviruses causing fatal HPS in Brazil. *J Med Virol* 1999 : 59 : 527-35.
24. Henderson WW, Monroe MC, St Jeor SC, et al. Naturally occurring Sin Nombre virus genetic reassortants. *Virology* 1995 : 214 : 602-10.
25. Li D, Schmaljohn AL, Anderson K, Schmaljohn CS. Complete nucleotide sequences of the M and S segments of two hantavirus isolates from California : evidence for reassortment in nature among viruses related to hantavirus pulmonary syndrome. *Virology* 1995 : 206 : 973-83.
26. Rodriguez LL, Owens JH, Peters CJP, Nichol ST. Genetic reassortment among viruses causing hantavirus pulmonary syndrome. *Virology* 1998 : 242 : 99-106.
27. Sibold C, Meisel H, Krueger DH, et al. Recombination in Tula hantavirus evolution : analysis of genetic lineages from Slovakia. *J Virol* 1999 : 73 : 667-75.
28. Monroe MC, Morzunov SP, Johnson AM, et al. Genetic diversity and distribution of *Peromyscus*-borne hantaviruses in North America and comparison with other hantaviruses. *Emerg Infect Dis* 1999 : 5 : 75-86.
29. Domingo E, Holland J, Biebricher C, Eigen M. Quasi-species : the concept and the word. In : Gibbs A, Calisher CH, Garcia-Arenal F, eds. *Molecular basis of virus evolution*. Cambridge : university Press, 1995 : 81-191.
30. Mertz GJ, Hjelle BL, Bryan RT. Hantavirus infection. *Dis Mon* 1998 : 44 : 85-138.
31. Peters CJ, Simpson GL, Levy H. Spectrum of hantavirus infection : hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome. *Annu Rev Med* 1999 : 50 : 531-45.
32. Clement J, McKenna P, Colson P, et al. Hantavirus epidemic in Europe, 1993. *Lancet* 1994 : 343 : 114.
33. Le Guenno B, Camprasse MA, Guilbaut JC, Lanoux P, Hoen B. Hantavirus epidemic in Europe, 1993. *Lancet* 1994 : 343 : 114-5.
34. Heyman P, Vervoort T, Colson P, Chu YK, Avsic-Zupanc T, Lundkvist A. A major outbreak of hantavirus infection in Belgium in 1995 and 1996. *Epidemiol Infect* 1999 : 122 : 447-53.
35. Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, et al. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* 1993 : 262 : 914-7.

36. Duchin JS, Koster FT, Peters CJ, et al. Hantavirus pulmonary syndrome : a clinical description of 17 patients with a newly recognized disease. *N Engl J Med* 1994 : 330 : 949-55.
37. Wells RM, Sosa Estani S, Yadon ZE, et al. An unusual hantavirus outbreak in southern Argentina : person-to-person transmission ? *Emerg Infect Dis* 1997 : 3 : 171-4.
38. Padula PJ, Edelstein A, Miguel SD, Lopez NM, Rossi CM, Rabinovich RD. Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina : molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. *Virology* 1998 : 241 : 323-30.
39. Cosgriff TM. Mechanisms of disease in hantavirus infection : pathophysiology of hemorrhagic fever with renal syndrome. *Rev Infect Dis* 1991 : 13 : 97-107.
40. Zaki SR, Greer PW, Coffield LM, et al. Hantavirus pulmonary syndrome. Pathogenesis of an emerging infectious disease. *Am J Pathol* 1995 : 146 : 552-79.
41. Linderholm M, Ahlm C, Settergren B, Waage A, Tärnvik A. Elevated plasma levels of tumor necrosis factor (TNF)-alpha, soluble TNF receptors, interleukin (IL)-6, and IL-10 in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Infect Dis* 1996 : 173 : 38-43.
42. Mustonen J, Partanen J, Kanerva M, et al. Genetic susceptibility to severe course of nephropathia epidemica caused by Puumala hantavirus. *Kidney Int* 1996 : 49 : 217-21.
43. Hjelle B, Jenison SA, Goade DE, Green WB, Feddersen RM, Scott AA. Hantaviruses : clinical, microbiologic, and epidemiologic aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1995 : 32 : 469-508.
44. McClain DJ, Summers PL, Harrison SA, Schmaljohn AL, Schmaljohn CS. Clinical evaluation of a vaccinia-vectored Hantaan virus vaccine. *J Med Virol* 2000 : 60 : 77-85.
45. Hooper JW, Kamrud KI, Elgh F, Custer D, Schmaljohn CS. DNA vaccination with hantavirus M segment elicits neutralizing antibodies and protects against seoul virus infection. *Virology* 1999 : 255 : 269-78.
46. Bharadwaj M, Lyons CR, Hjelle B. Intramuscular inoculation of Sin Nombre hantavirus cDNAs induces cellular and humoral immune responses in BALB/c mice. *Vaccine* 1999 : 17 : 2836-43.
47. Hooper JW, Li D. Vaccines against hantaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 2001 : 256 : 171-91.
48. Hutchinson KL, Rollin PE, Shieh WJ, Zaki S, Greer PW, Peters CJ. Transmission of Black Creek Canal virus between cotton rats. *J Med Virol* 2000 : 60 : 70-6.
49. Meyer BJ, Schmaljohn CS. Persistent hantavirus infections : characteristics and mechanisms. *Trends Microbiol* 2000 : 8 : 61-7.
50. Kukkonen SK, Vaheri A, Plyusnin A. Completion of the Tula hantavirus genome sequence : properties of the L segment and heterogeneity found in the 3' termini of S and L genome RNAs. *J Gen Virol* 1998 : 79 : 2615-22.
51. Meyer BJ, Schmaljohn C. Accumulation of terminally deleted RNAs may play a role in Seoul virus persistence. *J Virol* 2000 : 74 : 1321-31.
52. Feuer R, Boone JD, Netski D, Morzunov SP, St Jeor SC. Temporal and spatial analysis of Sin Nombre virus quasispecies in naturally infected rodents. *J Virol* 1999 : 73 : 9544-54.
53. Escutenaire S, Chalon P, Verhagen R, et al. Spatial and temporal dynamics of Puumala hantavirus infection in red bank vole (*Clethrionomys glareolus*) populations in Belgium. *Virus Res* 2000 : 67 : 91-107.

54. Hjelle B, Yates T. Modeling hantavirus maintenance and transmission in rodent communities. *Curr Top Microbiol Immunol* 2001 ; 256 : 77-90.