



# Bilan et perspectives des recherches du groupe *Zoonoses* sur le virus Puumala en France

**Guillaume Castel**

Réunion Rongeurs - 27/09/2016

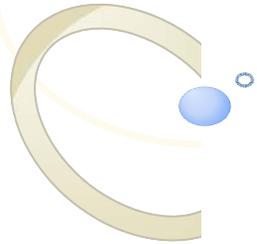


**INRA** IRD



**cirad** SupAgro

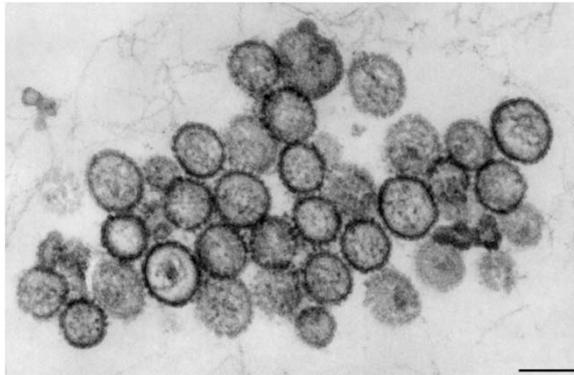
Montpellier



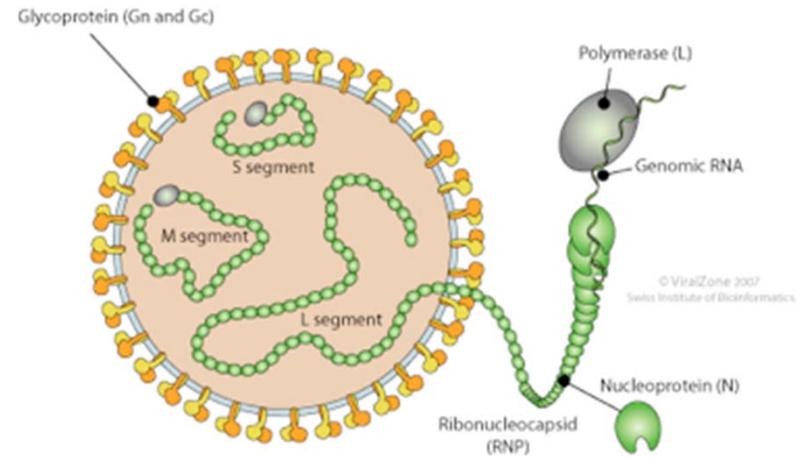
- 1- Présentation
- 2- Epidémiologie
- 3- Phylogénie
- 4- Microévolution dans les Ardennes
- 5- Phylogéographie
- 6- Approches expérimentales
- 7- Etude des co-infections
- 8- Diversité intra hôtes
- 9- Mécanismes évolutifs de la protéine NSs

Le virus Puumala (PUUV):

- ✓ Famille : *Bunyaviridae*
- ✓ Genre : Hantavirus



Génome : ARN (-) segmenté (3 segments)



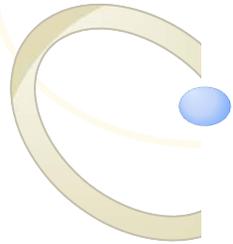
Hôte: Le campagnol roussâtre (*Myodes glareolus*)



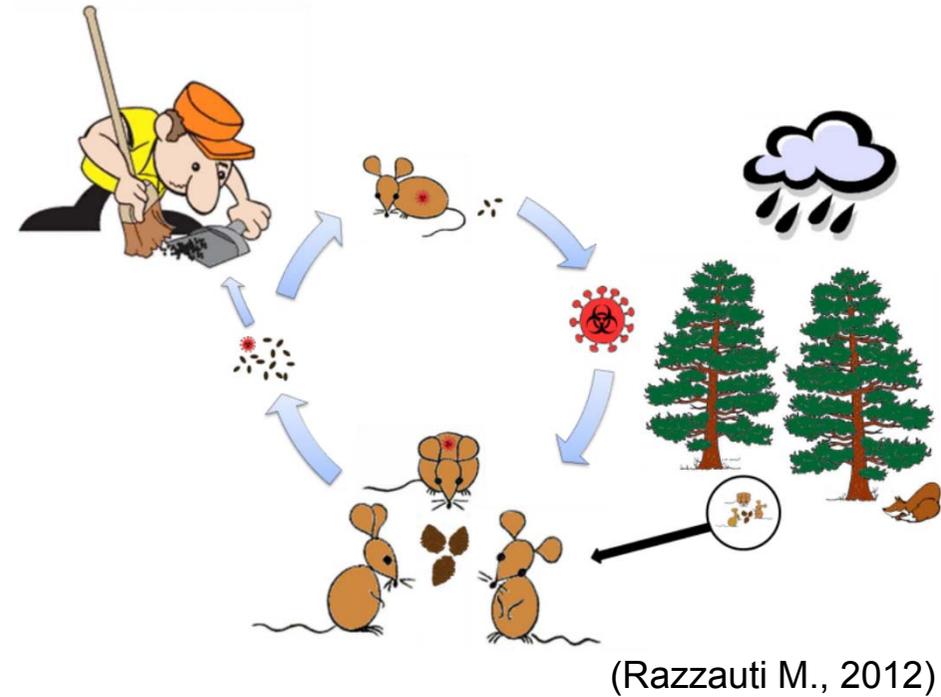
- ✓ Milieu forestier
- ✓ Très répandu dans toute l'Europe
- ✓ Présent partout en France sauf sur le pourtour méditerranéen.



IUCN (International Union for Conservation of Nature) 2008. *Myodes glareolus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-4

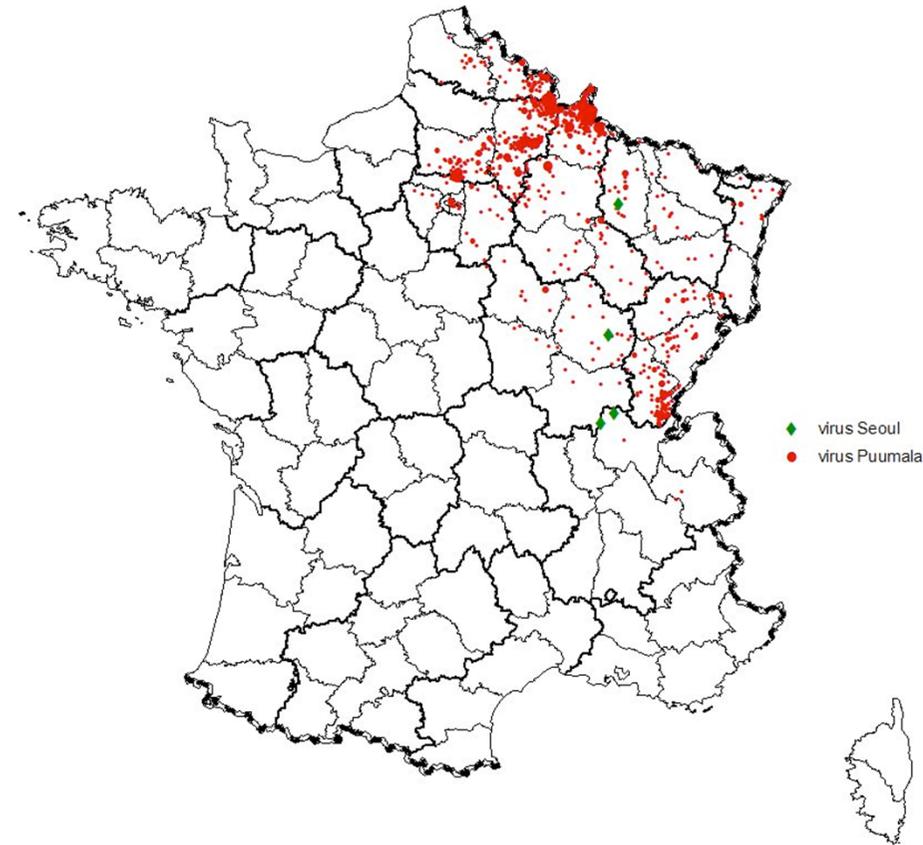


- ✓ Infections chroniques et asymptomatiques chez le campagnol roussâtre
- ✓ Néphropathie épidémique (Fièvre hémorragique avec syndrome rénal) chez l'Homme
- ✓ Contamination essentiellement par voie aérienne (aérosols de poussières contaminées par des excréta de campagnols infectés), par contact des muqueuses ou des lésions cutanées avec des matières infectieuses.
- ✓ Pas de transmission interhumaine





- ✓ Cas humains localisés dans le quart N.E.
- ✓ Moyenne de 50 à 200 cas/an, dont environ 40 % dans le massif ardennais.
- ✓ Touche les professions forestières, agricoles, le bâtiment.
- ✓ Zone d'endémie en progression vers le sud (Reynes et al, 2015)

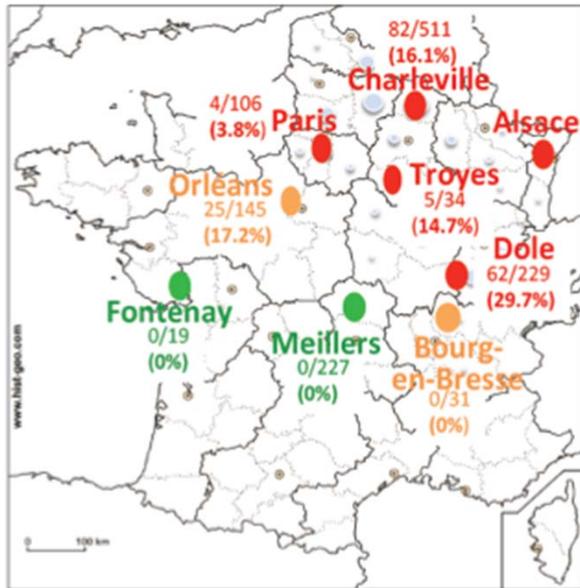


(source: INRS et CNR 2016)



Question : La situation épidémiologique de PUUV est elle corrélée avec celle de la NE ?

✓ Echantillonnage en région endémique (◆), péri-endémique (◆) et non endémique (◆).



Séroprévalence chez le campagnol  
(Castel et al, 2015)

	Total of trapping rodents	Number of <i>Myodes glareolus</i> (%)	Number of <i>Apodemus flavicollis</i> (%)	Number of infected <i>Myodes glareolus</i> (%)
2012	416	223 (0.54 ± 0.048)	193 (0.46 ± 0.048)	8 (0.036 ± 0.024)
2013	32	9 (0.28 ± 0.16)	23 (0.71 ± 0.16)	0
2014	78	21 (0.27 ± 0.1)	57 (0.73 ± 0.1)	0
2015	359	251 (0.7 ± 0.05)	108 (0.3 ± 0.05)	10 (0.04 ± 0.024)

Suivi temporel de la séroprévalence chez le campagnol en Alsace (Monchatre et al, en préparation)

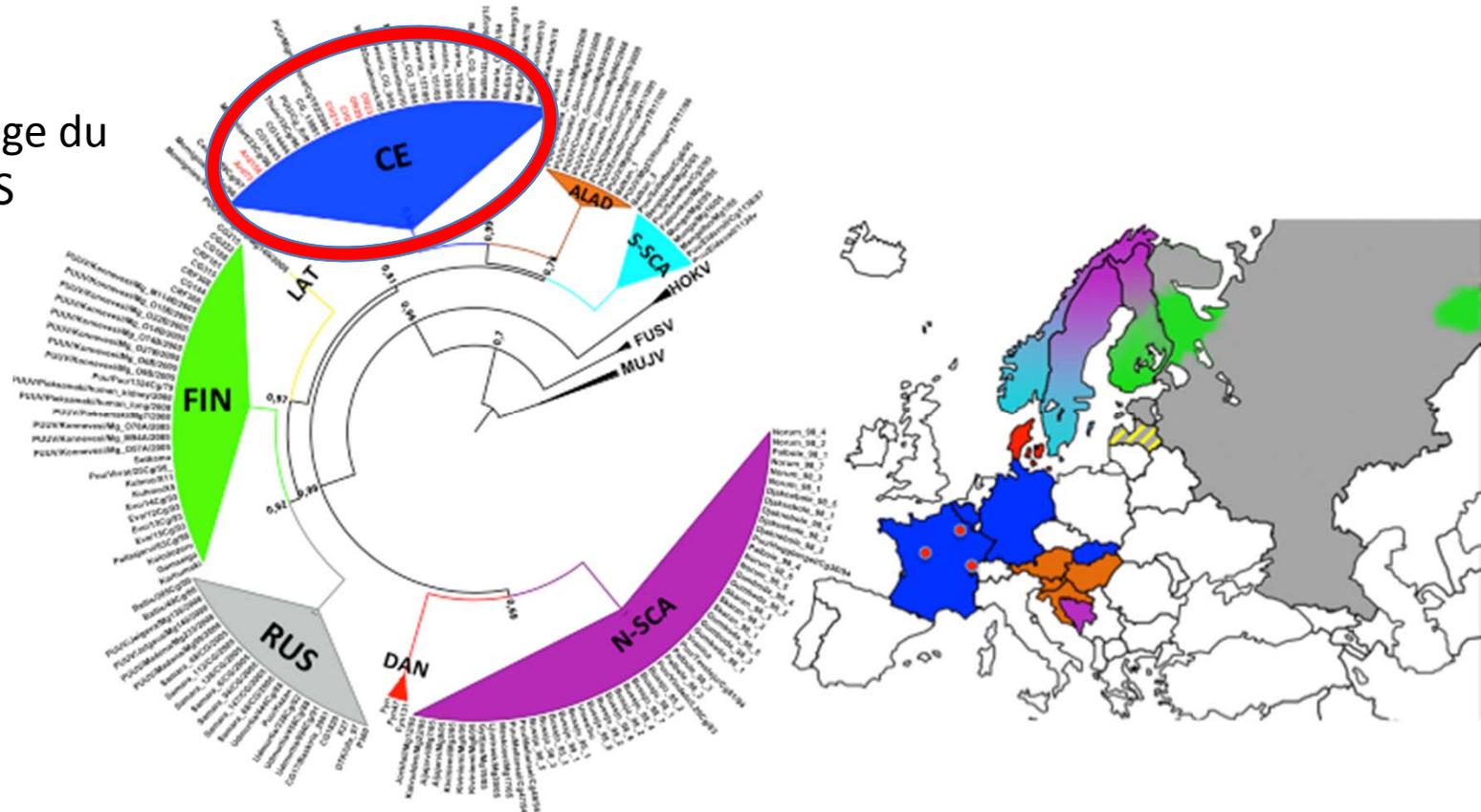
- En zones d'endémie les fortes séroprévalences chez le rongeurs sont assez bien corrélées avec le nombre de cas humains
- Le virus circule avec de fortes prévalence dans des régions péri-endémiques (Orléans, Sologne)
- Densités de populations cycliques, idem pour les séroprévalences



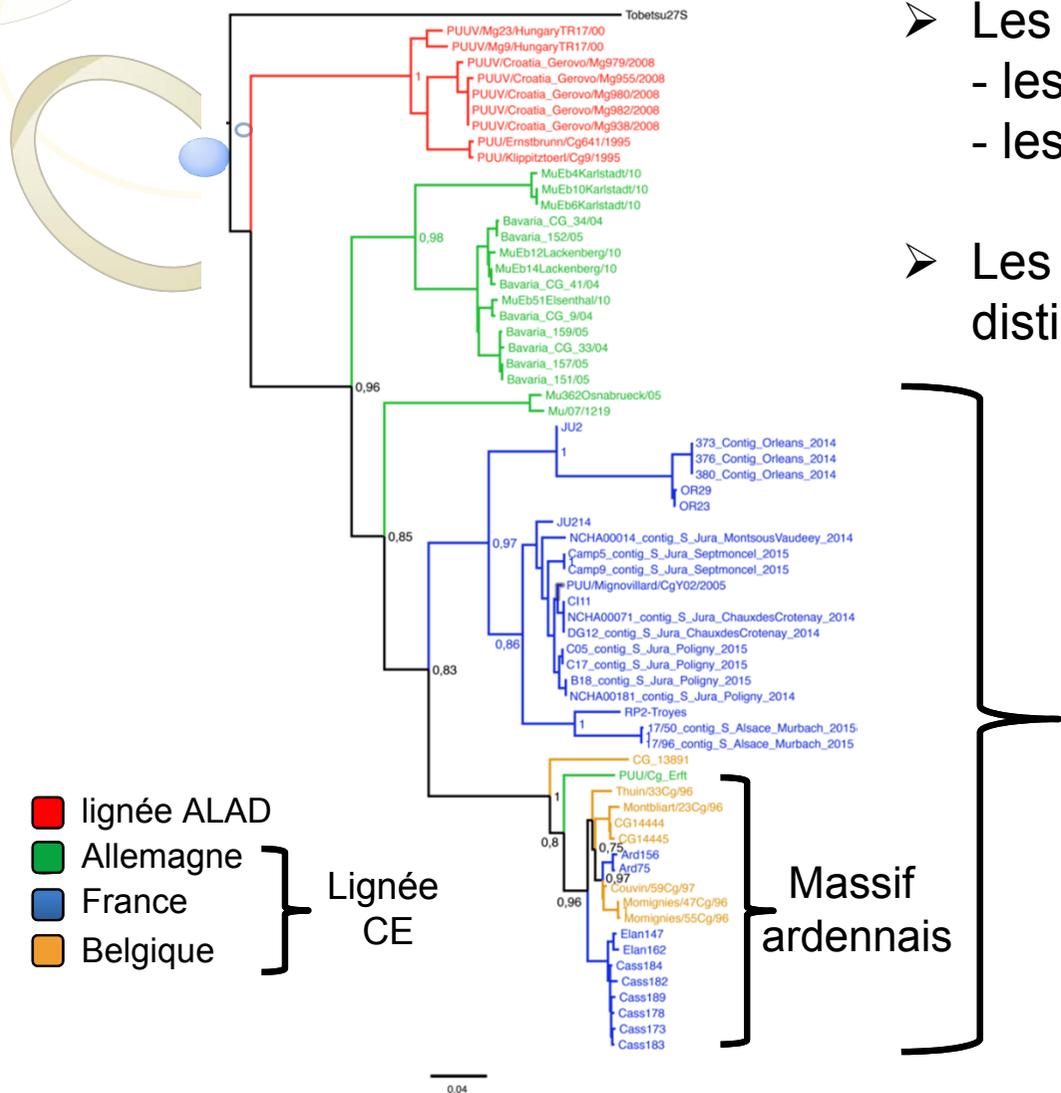
Questions :

- Comment les souches françaises se situent dans la phylogénie de PUUV ?
- Existe t'il des spécificités génétiques des souches isolées en zone péri-endémique ?

- ✓ Séquençage du segment S complet

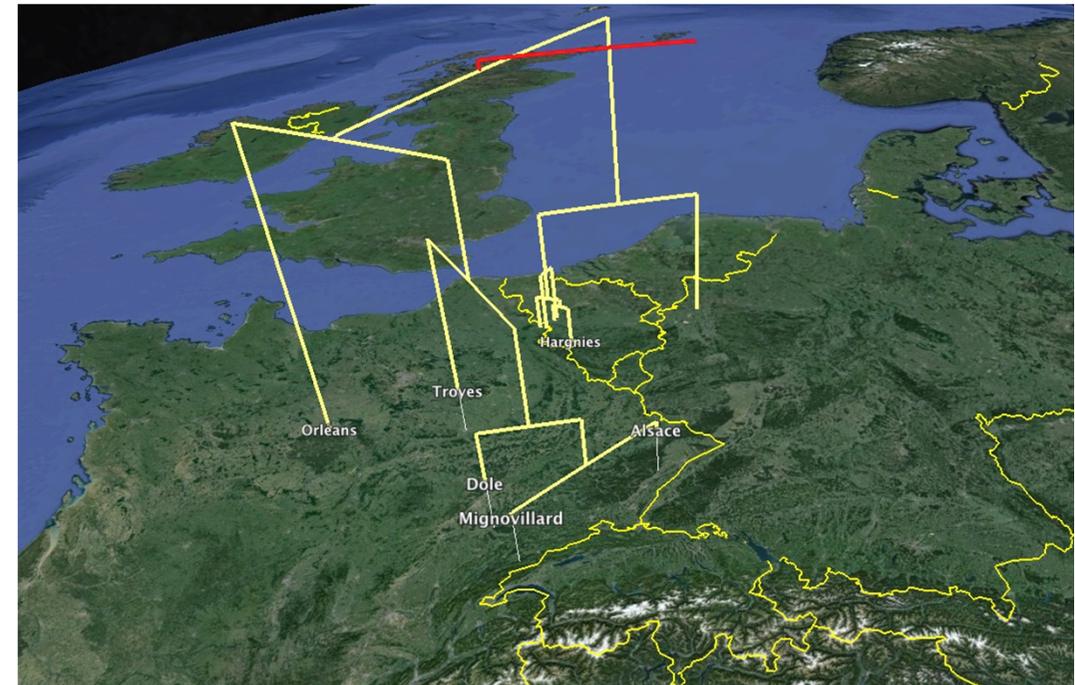


- Les souches françaises appartiennent toutes à la lignée « Europe Centrale »



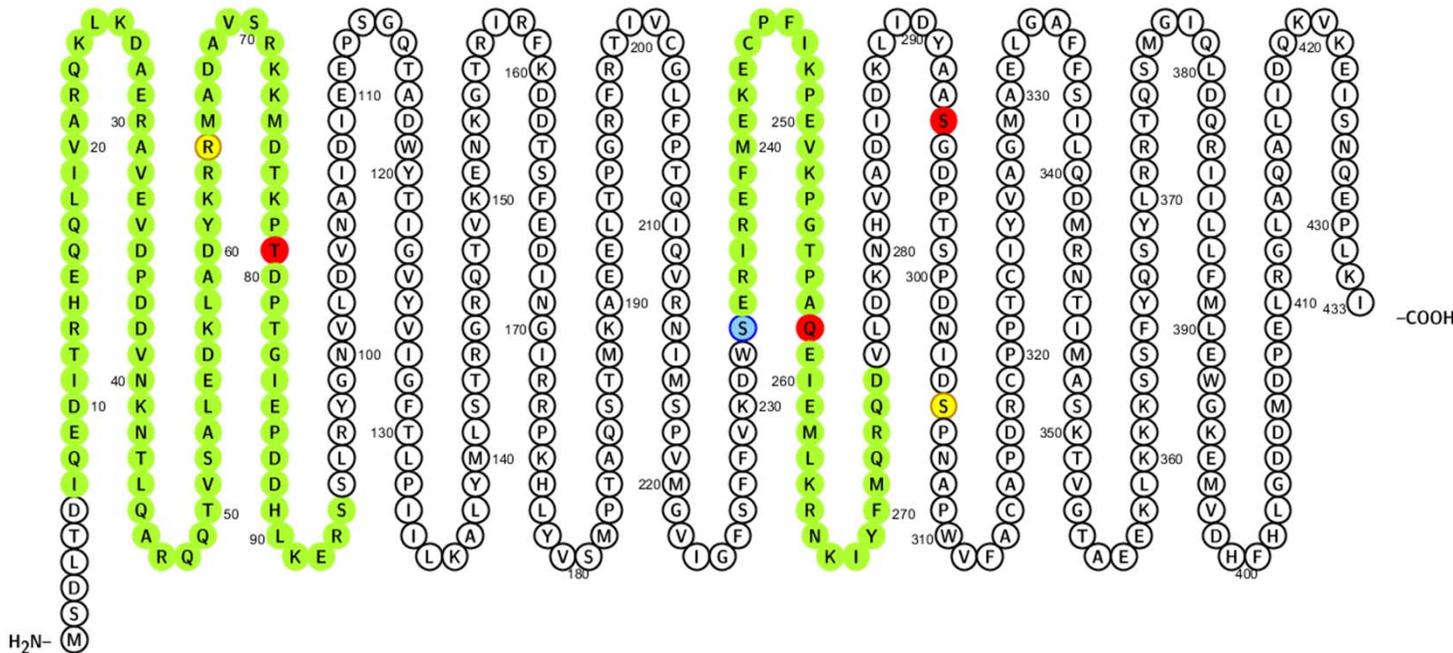
- Les souches françaises sont divisées en 2 clusters
  - les souches ardennaises (avec les belges)
  - les souches du reste de la France

- Les souches d'Orléans forment un sous groupe bien distinct





✓ Recherche de signature amino-acides au sein de la lignée CE (segment S):



- Principaux domaines antigeniques
- Isolats Jura/Aube/Alsace
- Isolats des Ardennes
- Isolats d'Orleans

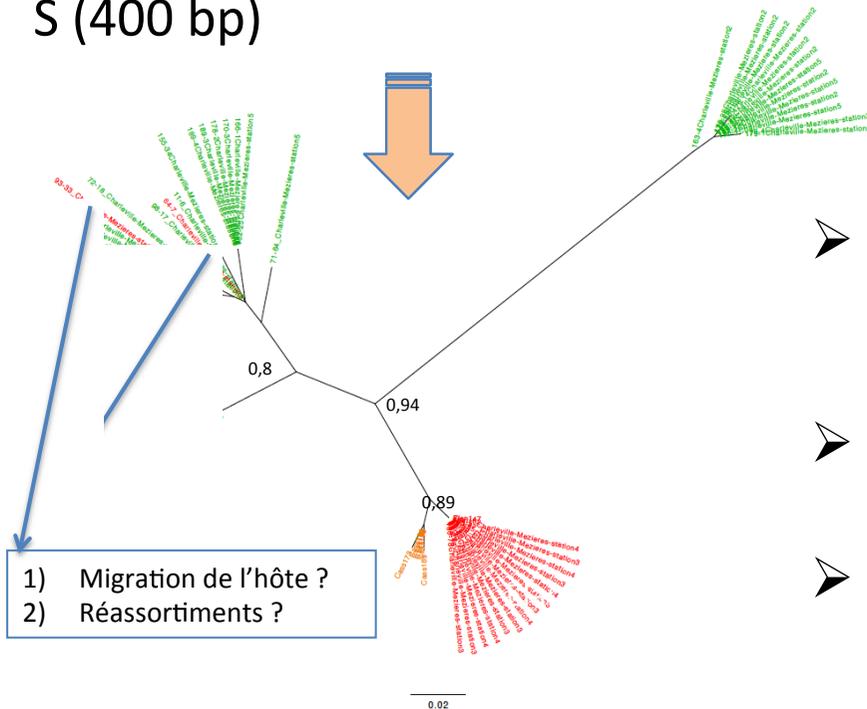
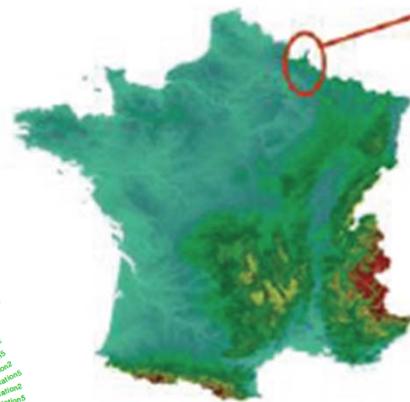
(Castel et al, 2015, Monchatre-Leroy et al, en préparation)

- Les souches des différentes régions ont des signatures aa spécifiques au sein de la lignée CE
- Beaucoup sont situées dans les principaux domaines antigeniques de la N
- Autres protéines virales (notamment les protéines de surfaces): en cours d'étude.
- Lien avec l'épidémiologie de la NE en France ?



Question: Influence des paysages sur la diversité génétique de PUUV et l'évolution de celle-ci dans les forêts ?

- ✓ Piégeages sur 10 ans dans 2 forêts proches (2 sites par forêts)
- ✓ Sérologies
- ✓ PCR + séquençage des segments S (400 bp)

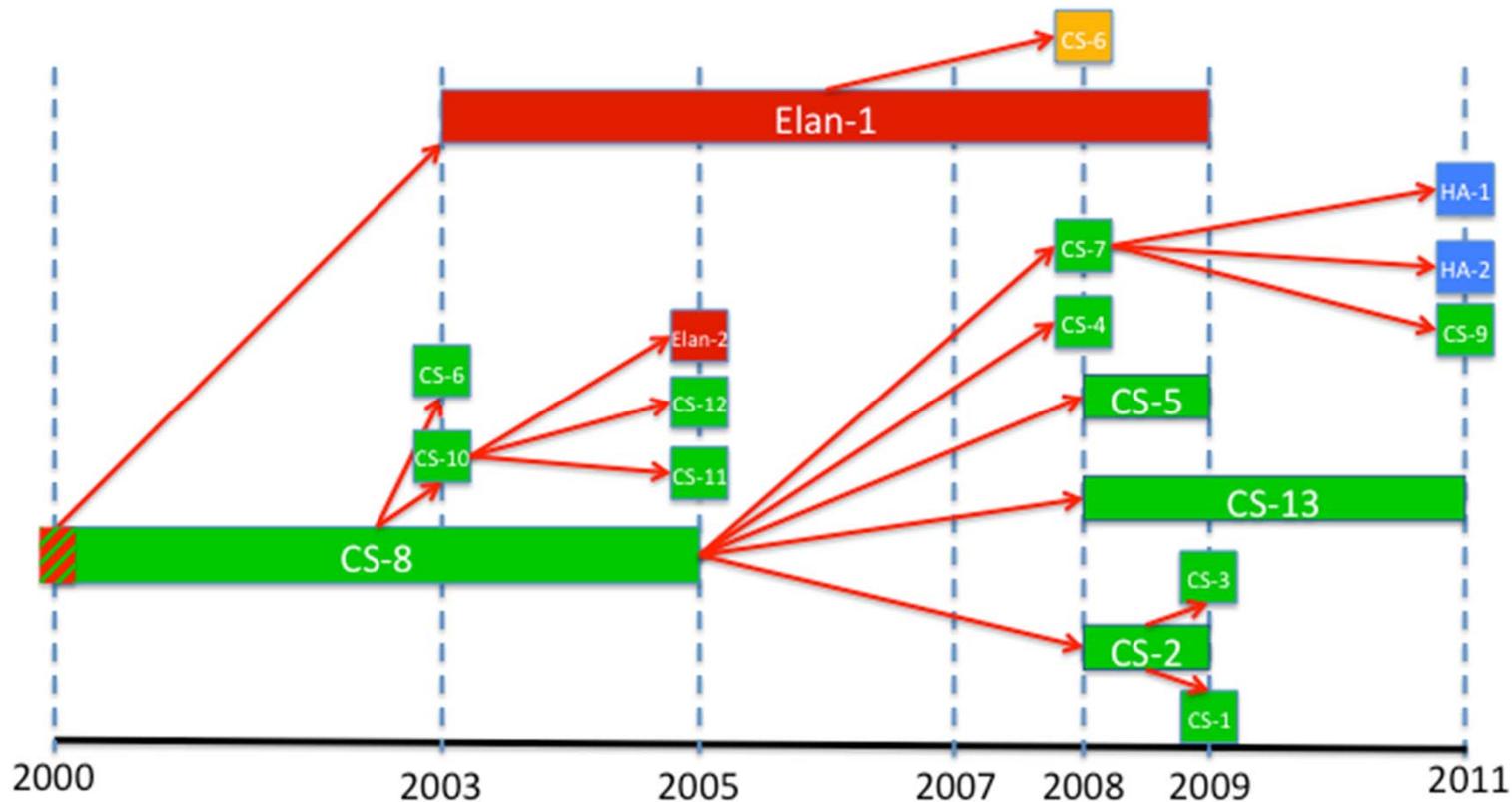


- Différents génotypes circulent très localement
- La distance génétique peut atteindre 8% (nt)
- Forte structuration géographique à une petite échelle

Elan/Cassine  
Croix-Scaille



Dynamique des principaux génotypes:



- Diversification importante des génotypes en forêt de Croix Scaille
- Le même génotype est retrouvé sur 6 ans en forêt d'Elan
- Deux dynamiques d'évolution différentes observées dans ces deux forêts très proches



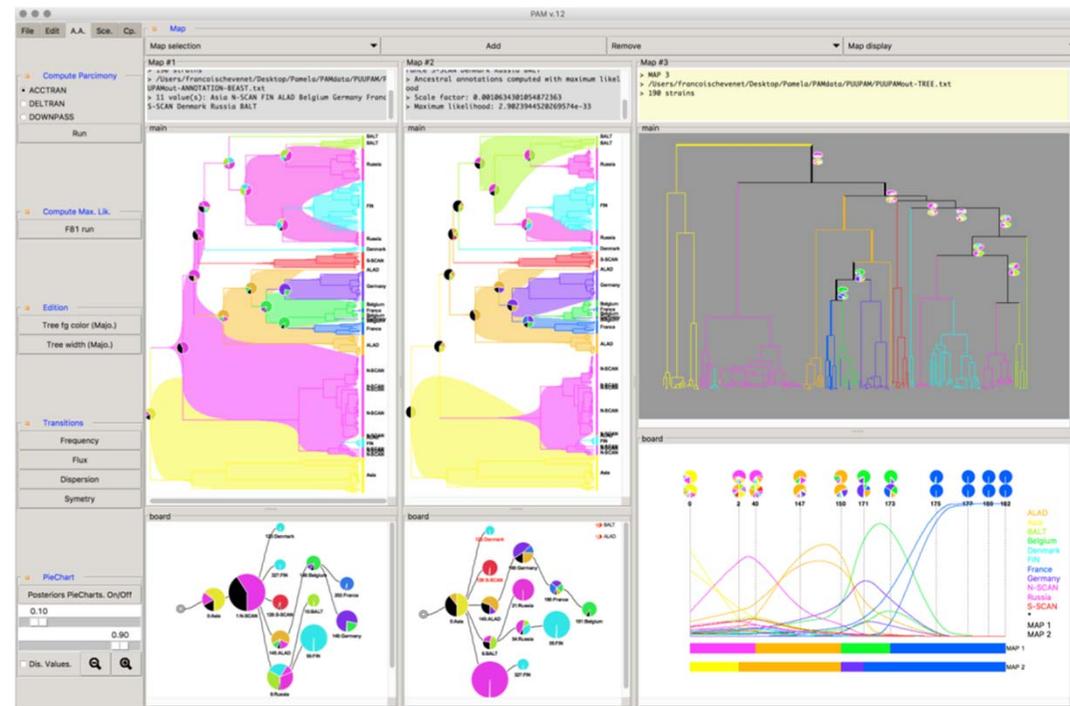
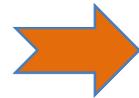
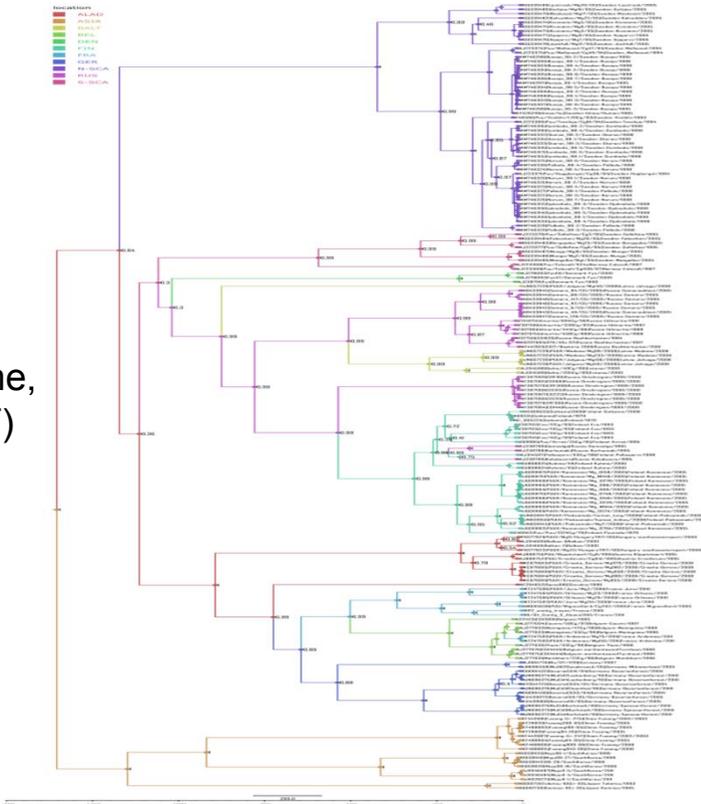
Questions :

- Origine des souches françaises de PUUV ?
- Comment se propage PUUV au cours du temps en Europe ?

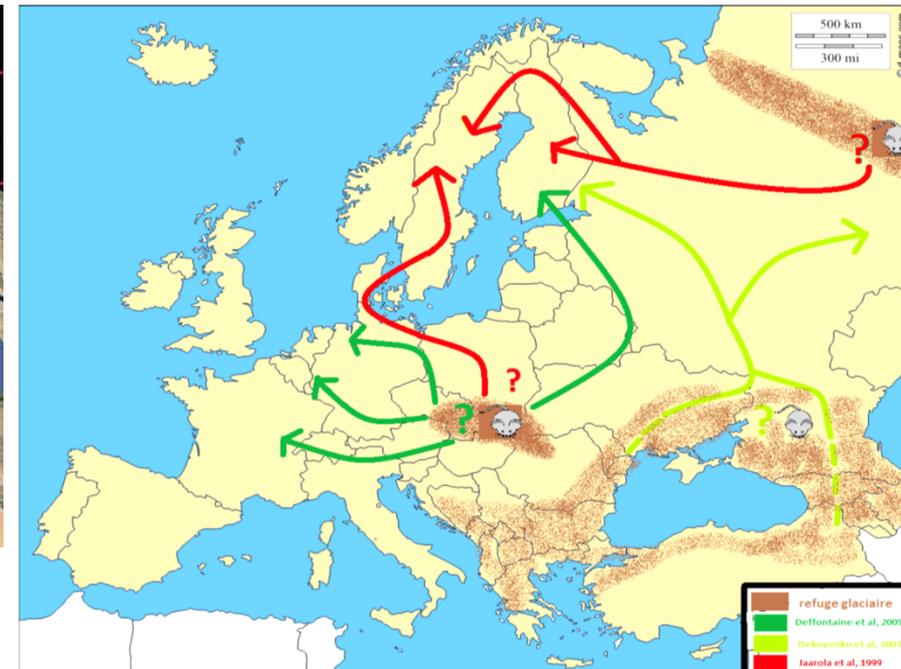
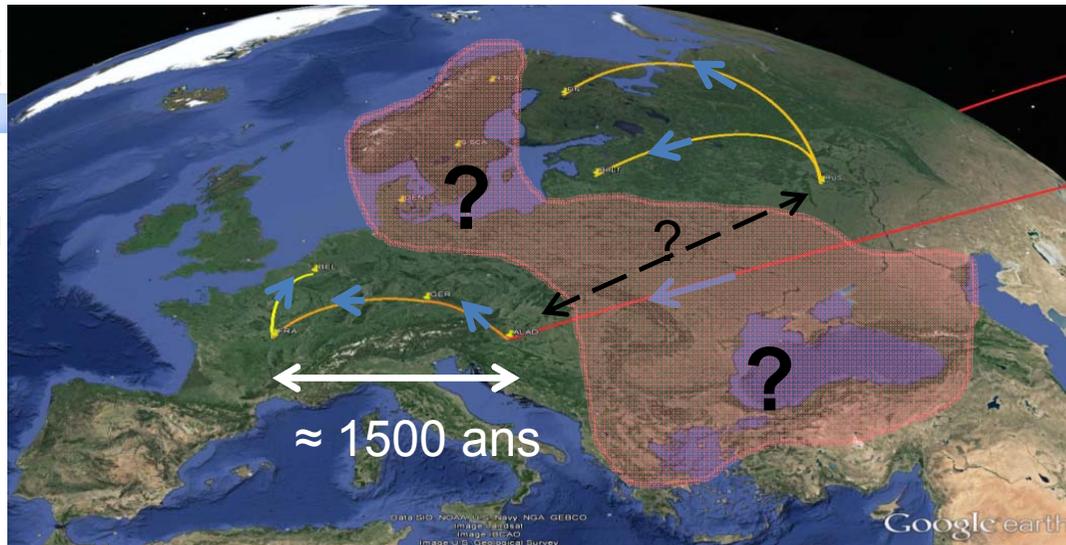
✓ Reconstruction des aires géographiques ancestrales par approche bayésienne

✓ Analyse des résultats BEAST par des méthodes d'aide à la décision (Logiciel PAMELA, en cours de développement au LIRMM)

(Chronogramme, logiciel BEAST)



- ✓ Origine asiatique des hantavirus européens (Bennett et al, 2014, Guo et al, 2013).



Voies de dispersion hypothétique de *Myodes glareolus* en Europe suite à la dernière période glaciaire (-12000/-9000 ans)

- Porte d'entrée de PUUV en Europe de l'ouest = zone ALAD
- Incertitudes concernant la propagation de PUUV à travers l'Europe centrale et l'histoire de son arrivée sur le continent européen
- Compatible avec les routes de recolonisation de *M. glareolus*
- Incertitude sur la durée cette dissémination :
  - ≈ 1 500 ans selon taux d'évolution de PUUV seul (mais intervalle large, 500 à 8000 ans...)
  - ≈ 10 000 ans si hypothèse d'une dissémination par des campagnols infectés au cours de la recolonisation post glaciaire



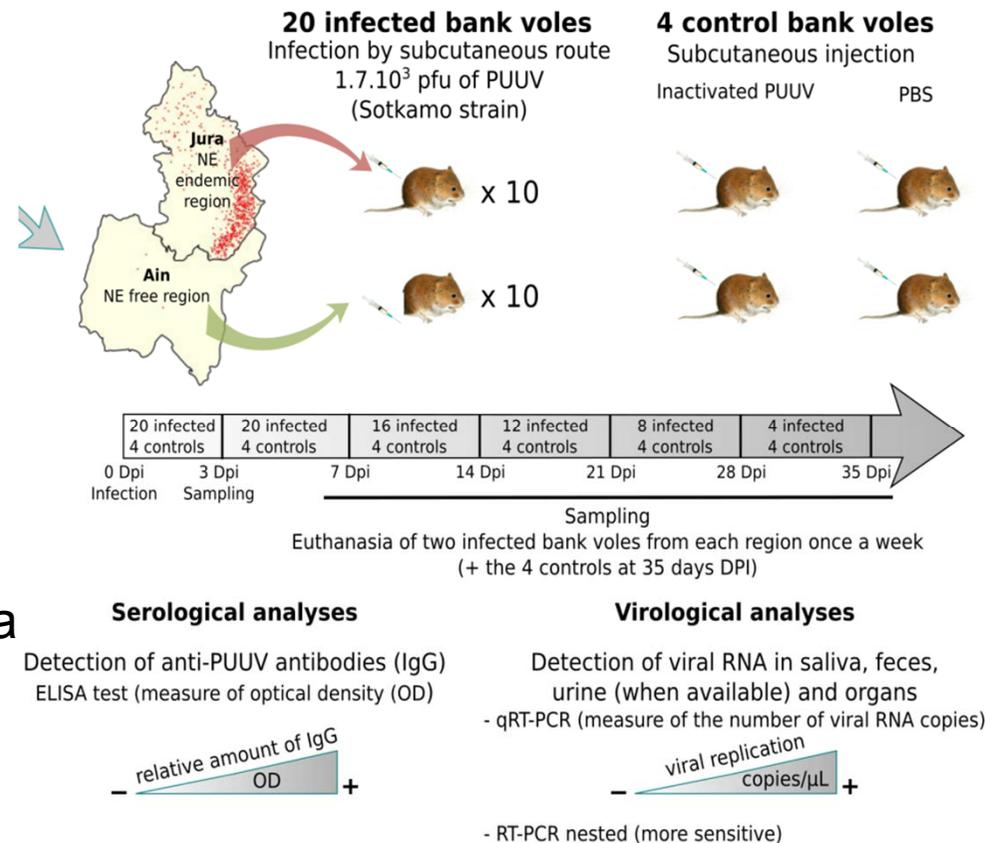
Questions:

- Les campagnols issus de zone non endémique sont ils sensibles à PUUV?
- Existe t'il des différences dans la réponse immunitaire des campagnols issus de zone endémique et non endémique à l'infection par PUUV ?
- Observe t'on des différences entre ces deux zones dans la réplication/excrétion du virus ?

→ Thèse d'Adélaïde Dubois

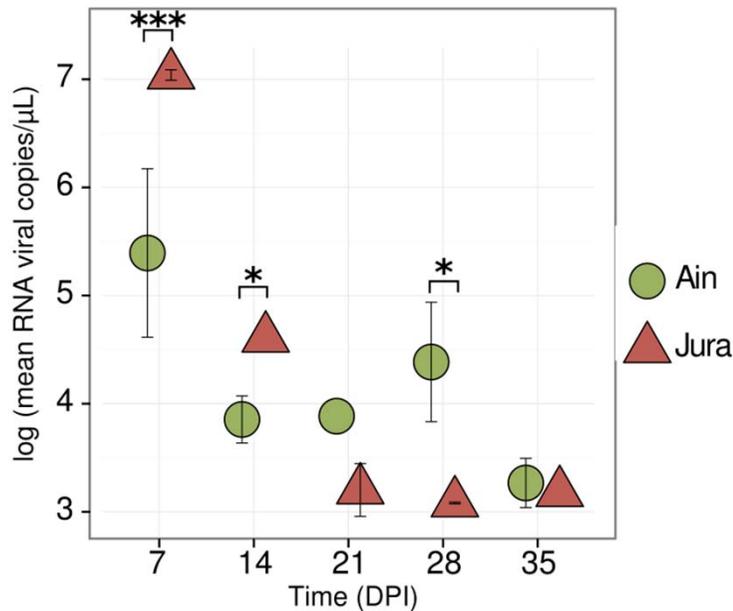


- ✓ Infections expérimentales en animalerie A3 (Anses, Lyon):
- Campagnols sauvages de l'ain ou du jura
- Souche de laboratoire PUUV-Sotkamo





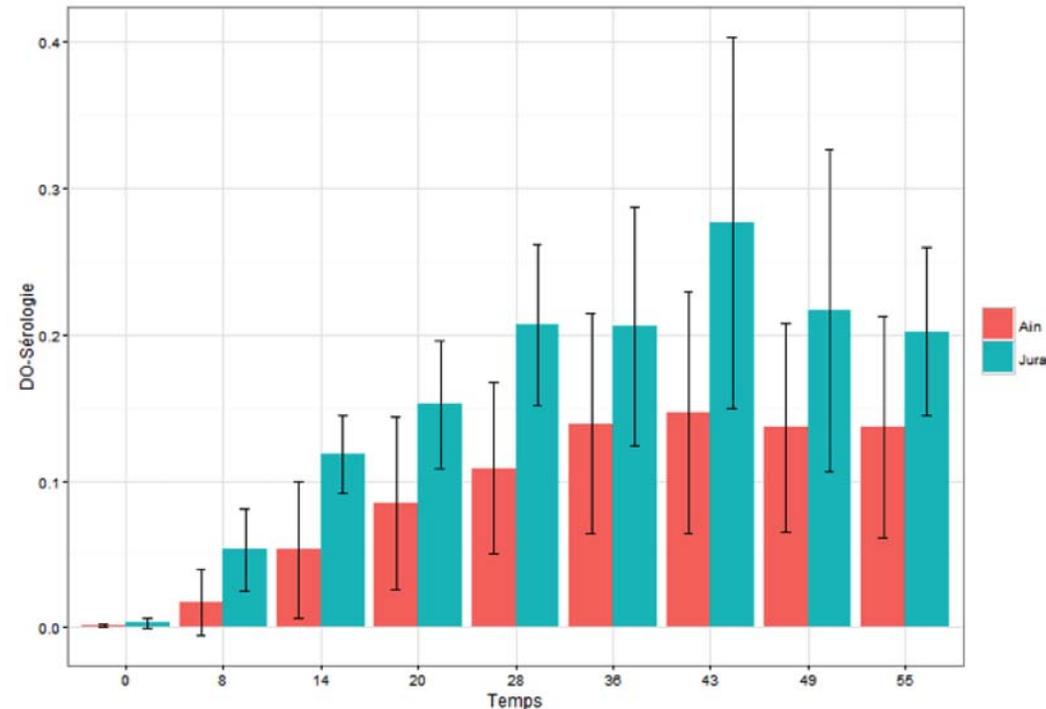
- ✓ Réplication de PUUV dans les poumons



- Les campagnols de l'Ain sont sensibles à PUUV
- La réplication virale est supérieure dans les poumons des campagnols du Jura au début de l'infection

(Dubois et al, soumis à *J Gen Virol*)

- ✓ Cinétique de la production d'anticorps anti-PUUV



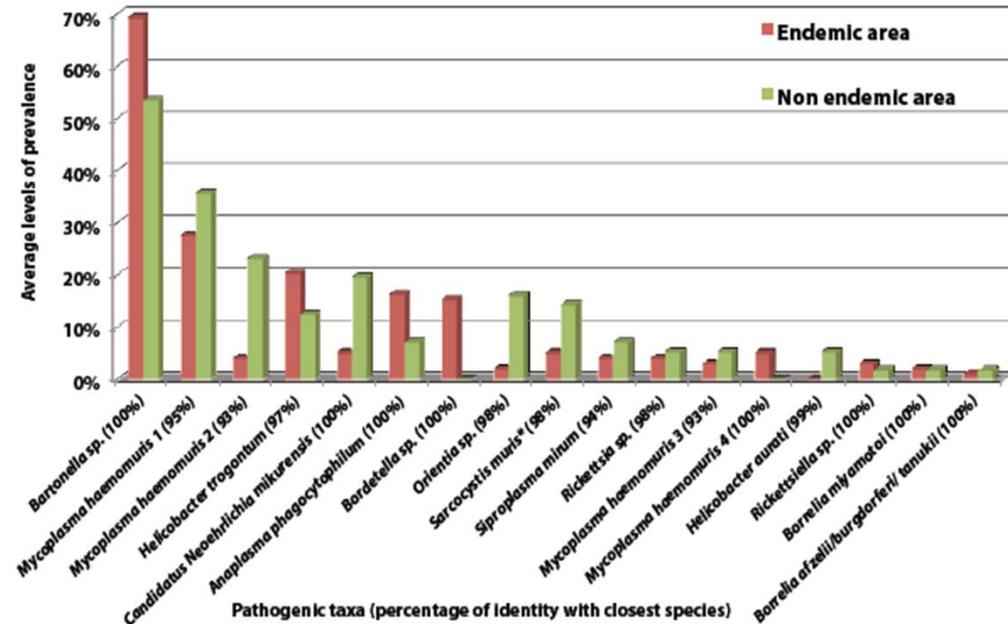
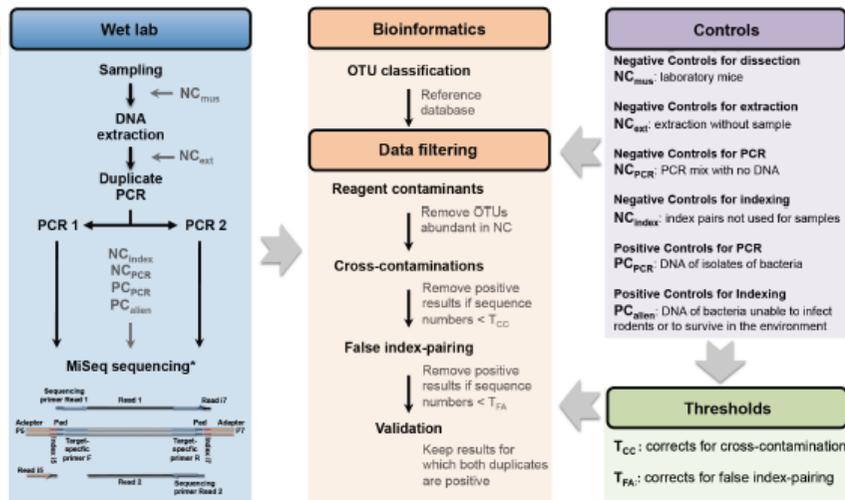
- La production d'anticorps anti-PUUV est supérieure chez les campagnols du Jura tout au long de l'infection (meilleure réponse adaptative ?)

(Dubois et al, en préparation)



Question: Le pathobiome de *M. glareolus* influence t'il sa sensibilité/réponse à l'infection par PUUV (projet Hantagulomic) ?

✓ Approche métagénomique bactérienne (16S)



- Différentes structures de communautés bactériennes sont observées en zones d'endémie et de non endémie
- Voir présentation de Nathalie et Max à 12h !



## Questions:

- La diversité intra hôte de PUUV est elle différente selon la zone d'échantillonnage ?
- Selon les différents organes ?
- Comment évolue t'elle dans le temps ?

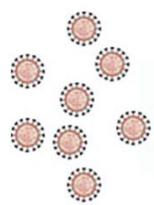
✓ Séquençage du segment S complet (1830 nt) codant la nucléoprotéine (N)



- ✓ Analyse des prélèvements réalisés dans le cadre des infections expérimentales
- Inoculum (=T0)
  - Echantillons prélevés = Poumons et excréta  
→ Ain et Jura  
→ à J7, 14, 21, 28, 35
  - Segment S cloné (contrôle)



✓ Test de trois méthodes de séquençage haut débit



Viral RNA extraction

RT-PCR

Séquençage haut débit



MiSeq



PacBio



MinION Mk 1B

MinION



« Single Molécule » Sequencing



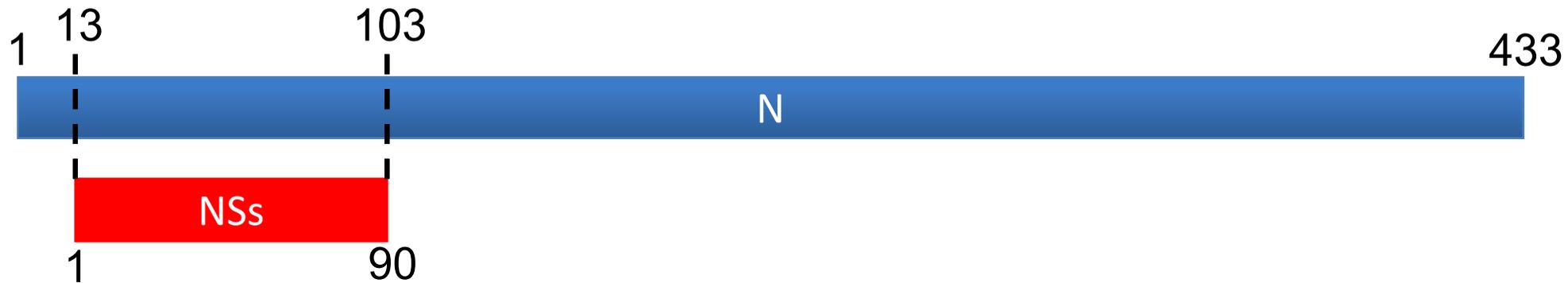
- La technique MiSeq offre une profondeur de séquençage importante → fréquence des mutations
- Les techniques PacBio et MinION permettent de séquencer les génomes dans leur totalité → phasage d'haplotype



Question:

- Comment évolue cette protéine virale non structurale ?
- Est elle impliquée dans les différences entre zone d'endémie et de non endémie ?

✓ Codée par le même segment que la N mais dans un cadre de lecture différent

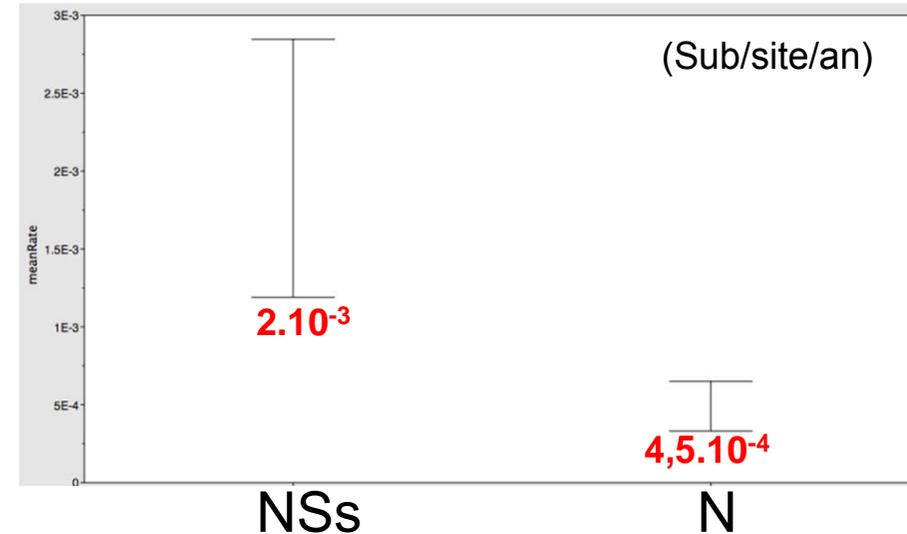


- ✓ Joue un rôle dans l'inhibition de la réponse IFN (Jaaskelainen et al, 2007)
- ✓ Des souches présentant notamment des mutations dans la NSs montrent des taux de réplication différents en culture cellulaire (mais pas sur cellules KO pour l'IFN) (Sundstrom et al, 2011)

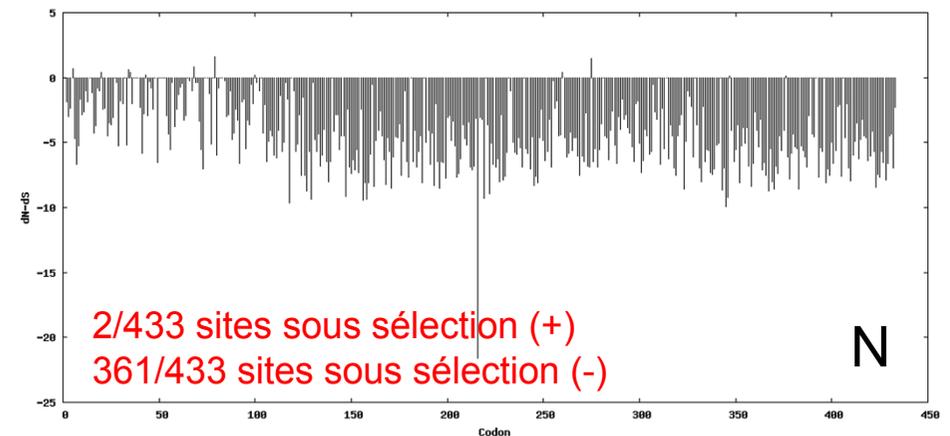
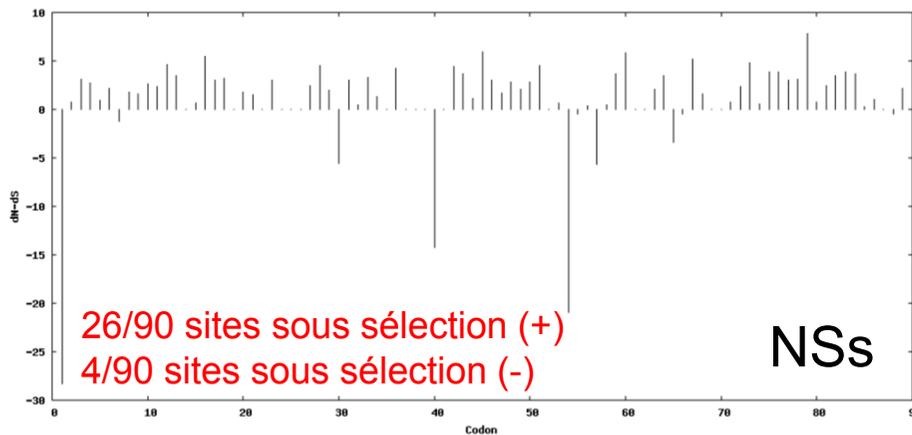


✓ Calcul des taux d'évolution (séquences aa)

➤ La protéine NSs évolue plus rapidement que la N (et que les autres protéines virales)



✓ Recherche de sites sous sélection positive (DataMonkey)



➤ Contrairement aux autres protéines virales, NSs est soumis à une forte sélection positive

CBGP

- A. Dubois
- C. Tatard
- N. Charbonnel
- A. Loiseau
- L. Benoit
- T. Paradis
- M. Razzauti
- J. Pisano
- M. Galan
- JF. Martin

Unité de Virologie, Anses, Lyon

- P. Marianneau
- S. Murri

CNRS-Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive

- JB Pons
- F. Sauvage

Haartman Institute, Helsinki, Finlande

- A. Plyusnin

Institut Pasteur

- N. Tordo
- C. Fillipone
- C. Jallet

INRA, UR346 d'Epidemiologie Animale

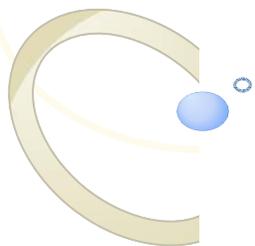
- L. Crespin

CNRS, LIRMM, Montpellier

- O. Gascuel
- F. Chevenet

Laboratoire de la rage et de la faune sauvage, Anses, Nancy.

- E. Monchatre-Leroy
- F. Boué



Merci pour votre attention !

