

Immunoecology in the lab

&

how it helps (or not)

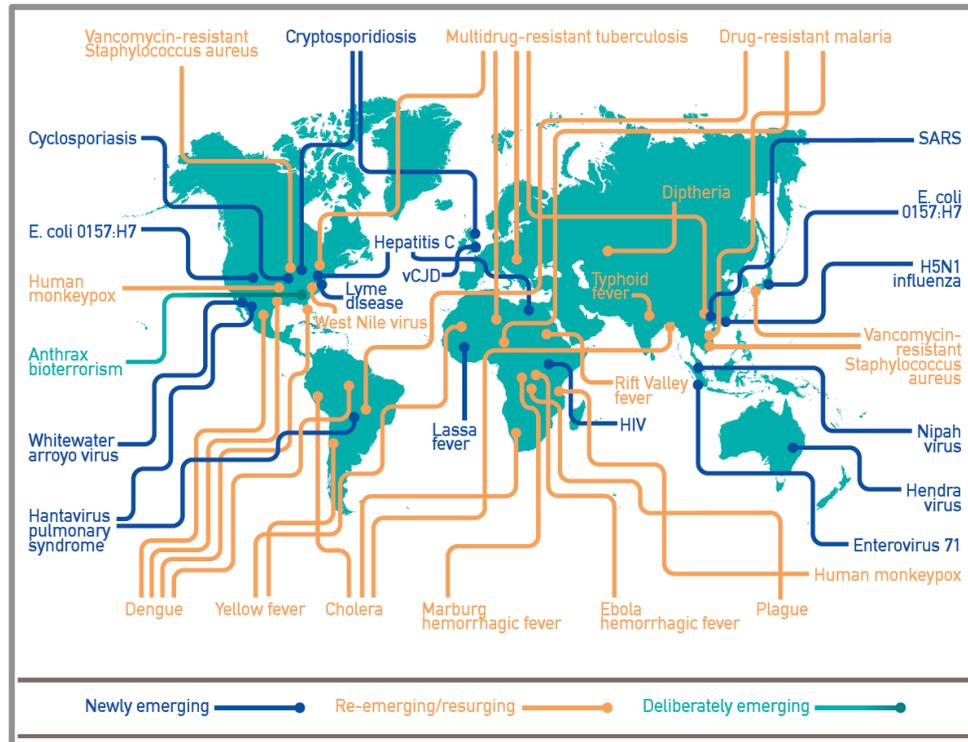
to understand the diversity of Puumala virus / bank vole
interactions

Doctorat de A. Dubois

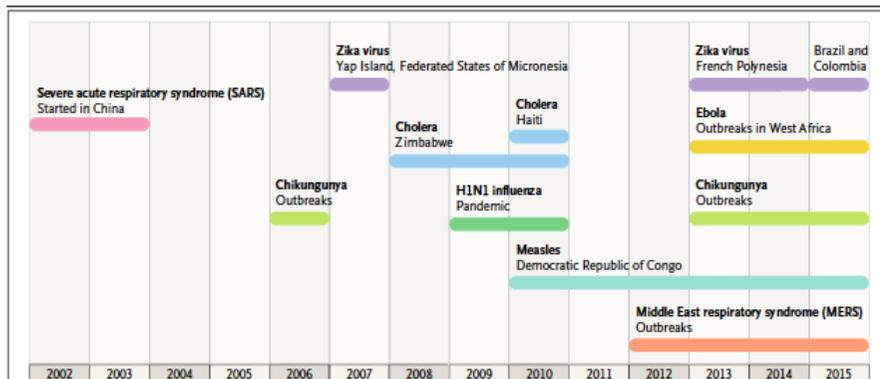
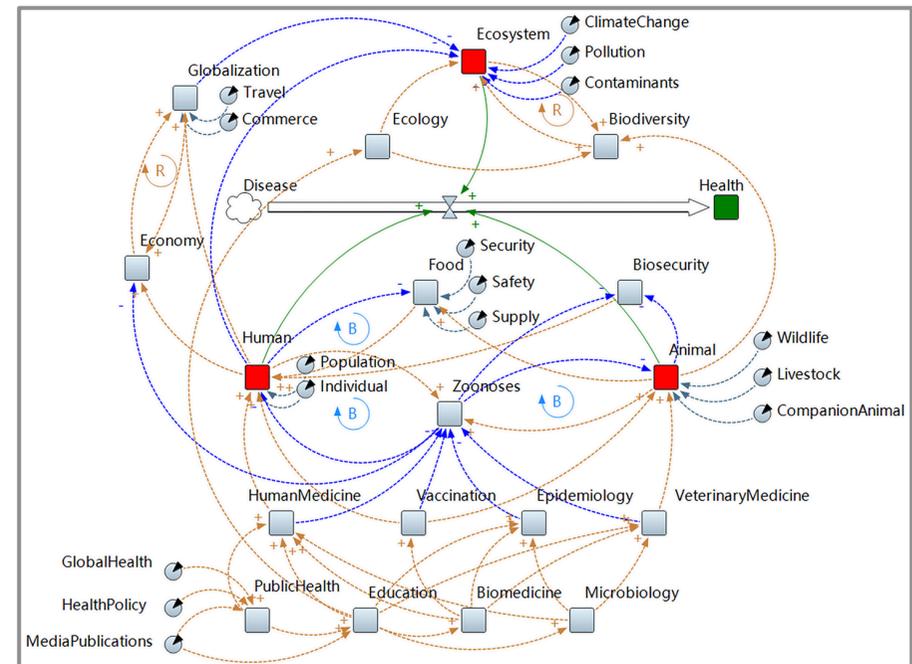
CBGP : N. Charbonnel, G. Castel, M. Galan, L. Benoit, A. Loiseau, C. Tatard

ANSES Virologie Lyon : P. Marianneau, S. Murri, C. Pudalo

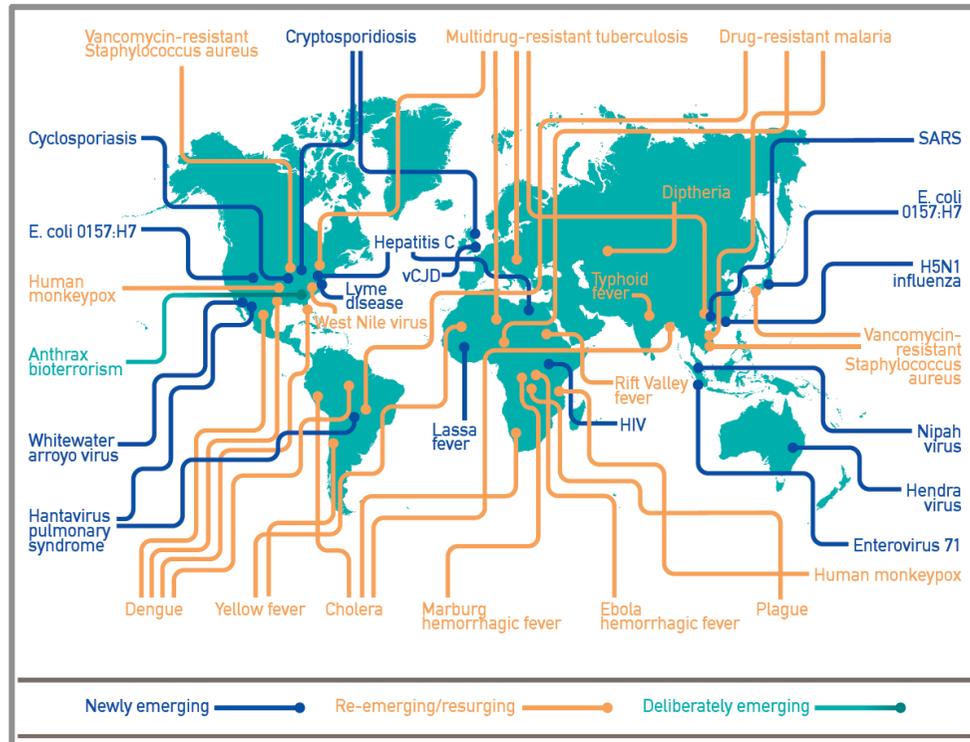
Un défi majeur actuel = Comprendre, prévoir et gérer l'émergence des maladies infectieuses zoonotiques



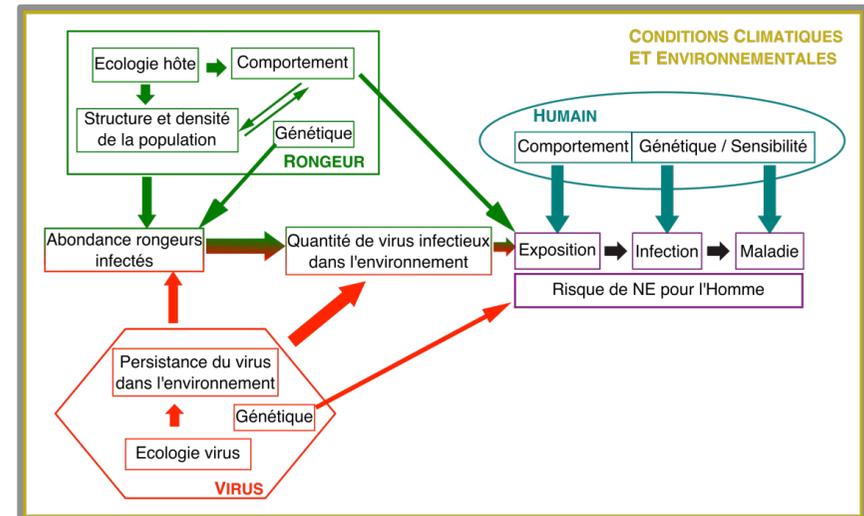
Approche 'One Health'



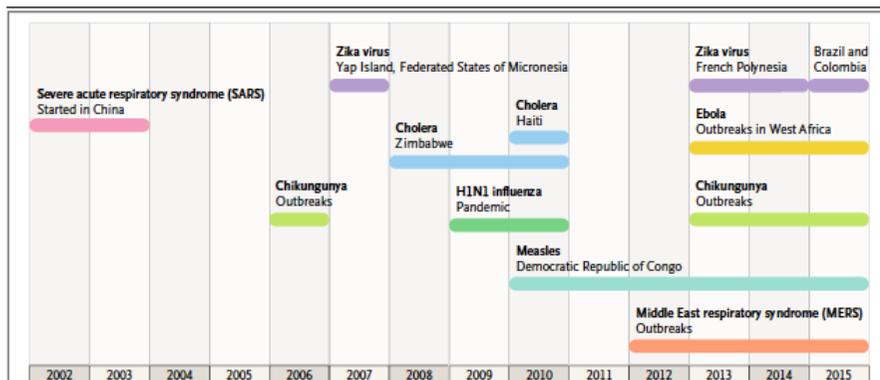
Un défi majeur actuel = Comprendre, prévoir et gérer l'émérgence des maladies infectieuses zoonotiques



Approche 'One Health'



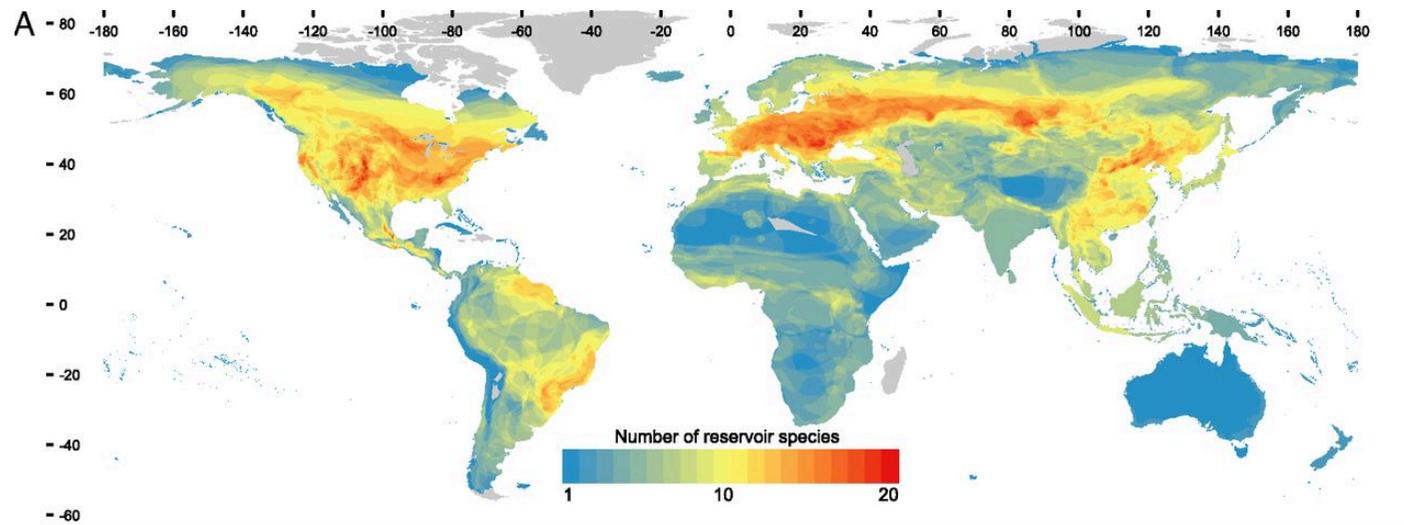
Heyman et al. 2013



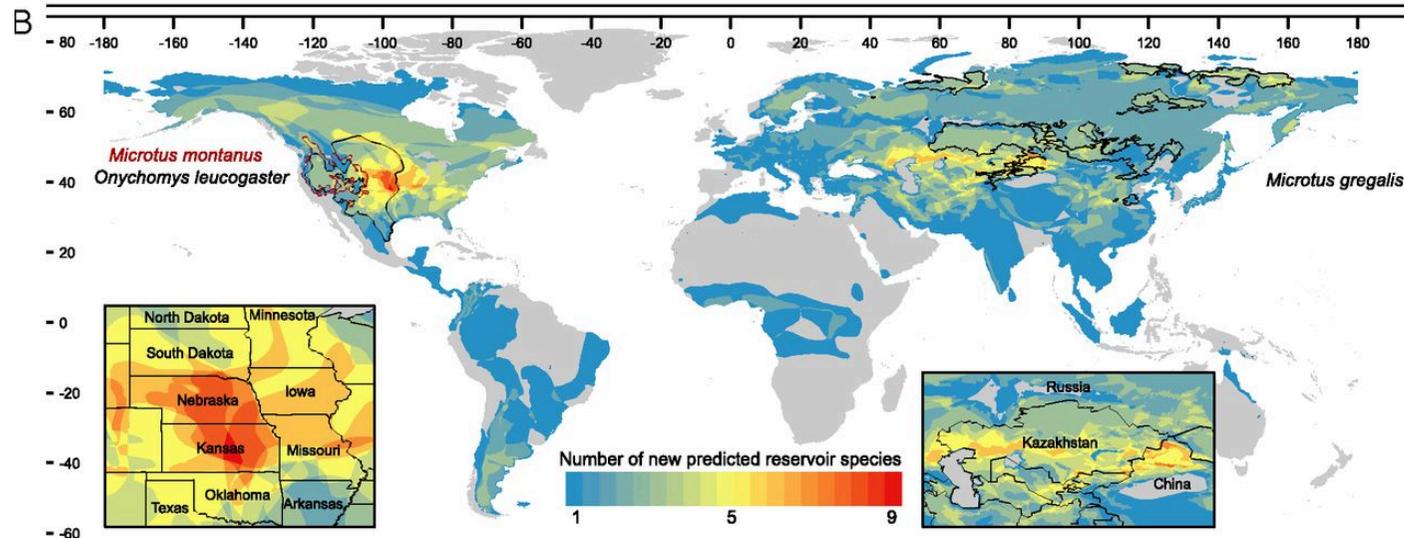
Apport de l'immunoécologie :

Qui est / pourra être infecté, dans quelles régions ?

Ex: à l'échelle interspécifique, prédire les espèces pouvant être réservoir d'un ou plusieurs agents zoonotiques



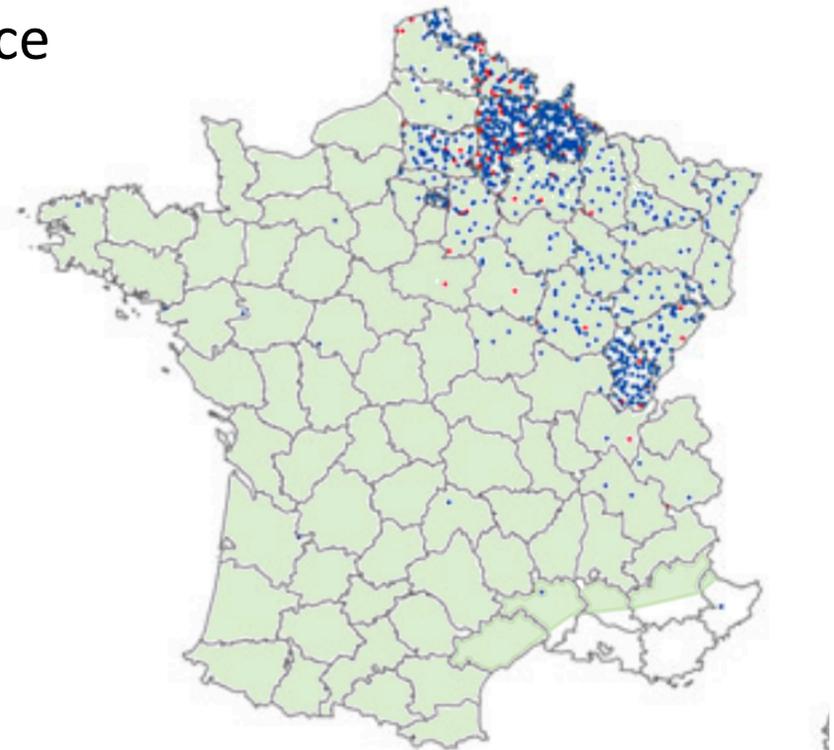
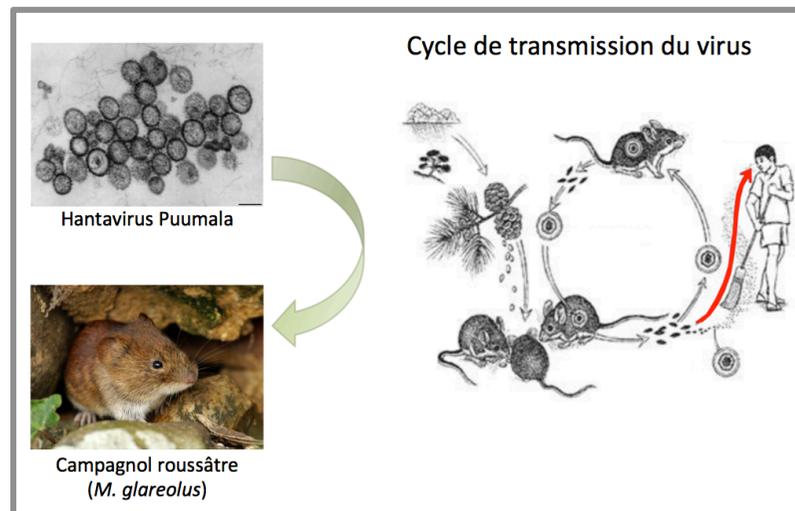
Rodent reservoir diversity



Prediction of novel reservoir species

Modèle d'étude :

Risque d'émergence d'une zoonose liée aux rongeurs,
la néphropathie épidémique, en France

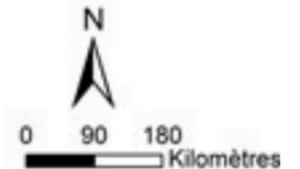


Cas d'infections à hantavirus (Données CNR Hantavirus)

● 2005-2013

● 2014

■ Distribution de *M. glareolus*



Présence du réservoir en France, sauf sur une partie du littoral méditerranéen

Cas de NE uniquement dans le quart nord-est de la France

Possibilité d'émergence de la NE au sud de la zone d'endémie ?

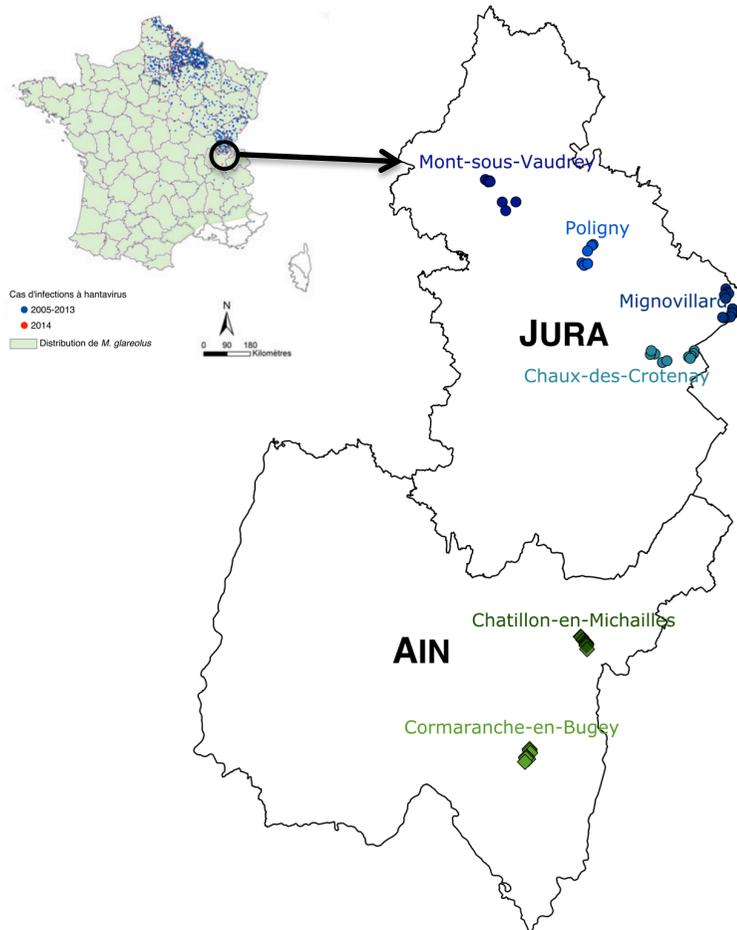
Conditions pour qu'il puisse y avoir émergence :

- Présence du réservoir
- Introduction possible du virus
- Sensibilité du réservoir au virus =
infection, réplication et excrétion du virus
- Contacts Homme / Réservoirs & excréta

Objectifs :

- Sensibilité à l'infection des campagnols roussâtres de la zone de non-endémie ?
Hyp H0 : sensibilité H1 : résistance (pas de succès de l'infection)
- Variabilité dans les réponses à l'infection chez les campagnols entre zone d'endémie et de non-endémie ?
Hyp H0 : pas de variabilité H1 : plus de résistants dans l'Ain
- Variabilité due à des différences génotypiques chez le campagnol ?
Hyp H0 : pas de sélection directionnelle Jura/Ain H1 : sélection sur gènes d'immunité

Premières observations sur les populations naturelles de campagnols



⇒ Le virus Puumala peut être introduit dans les populations de l'Ain

Statut épidémiologique des populations

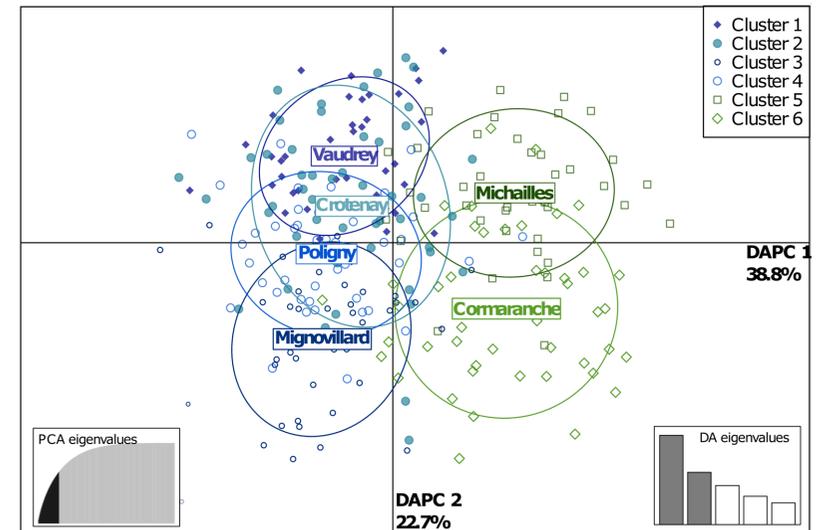
4 sites dans le Jura

Jusqu'à 8.7% de séroprévalence

2 sites dans l'Ain

0% de séroprévalence

Flux de gènes entre populations



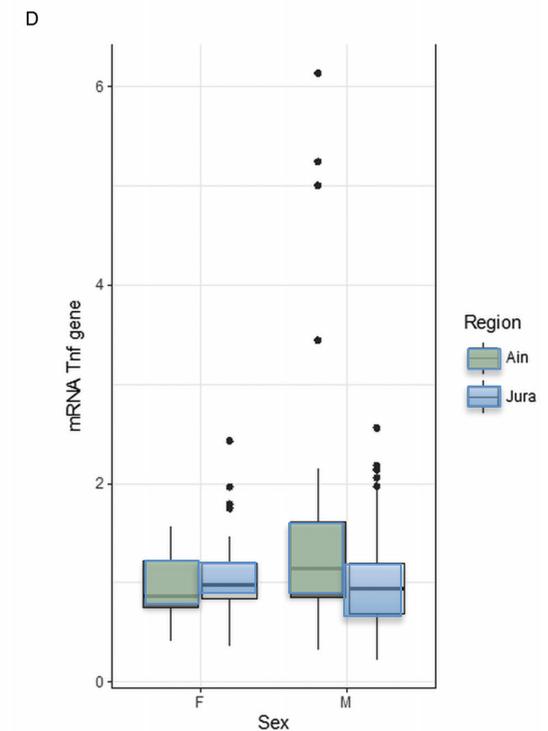
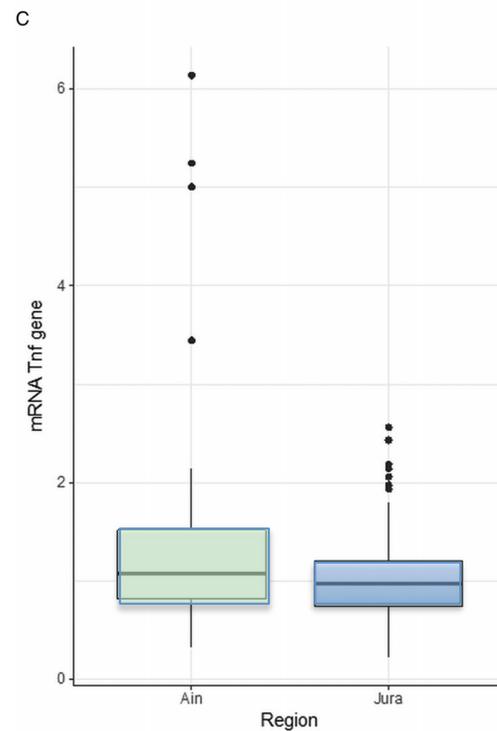
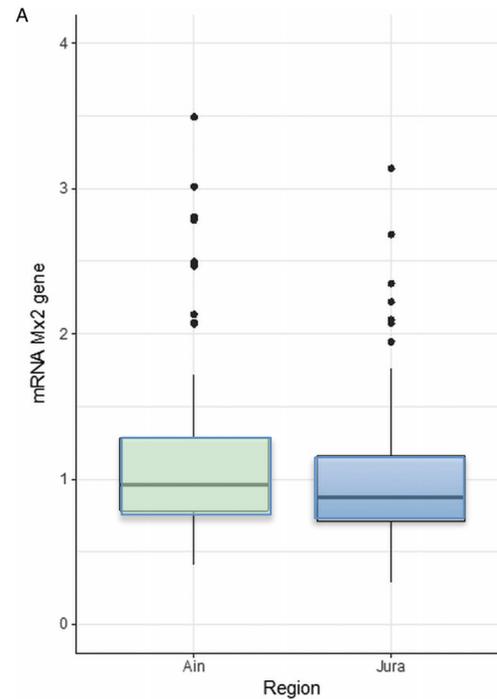
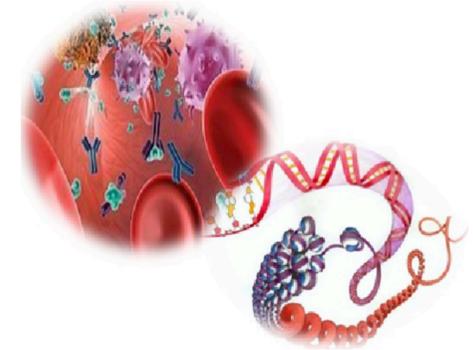
Faible différenciation génétique
Pas de rupture de flux de gènes (IBD)

Variabilité des niveaux d'expression de gènes immunitaires impliqués dans la réponse au virus Puumala (*Tnf- α* , *Mx2*, *Tlr7*)

L'expression 'globale' de deux gènes de l'immunité est plus élevée pour les campagnols de l'Ain que pour ceux du Jura

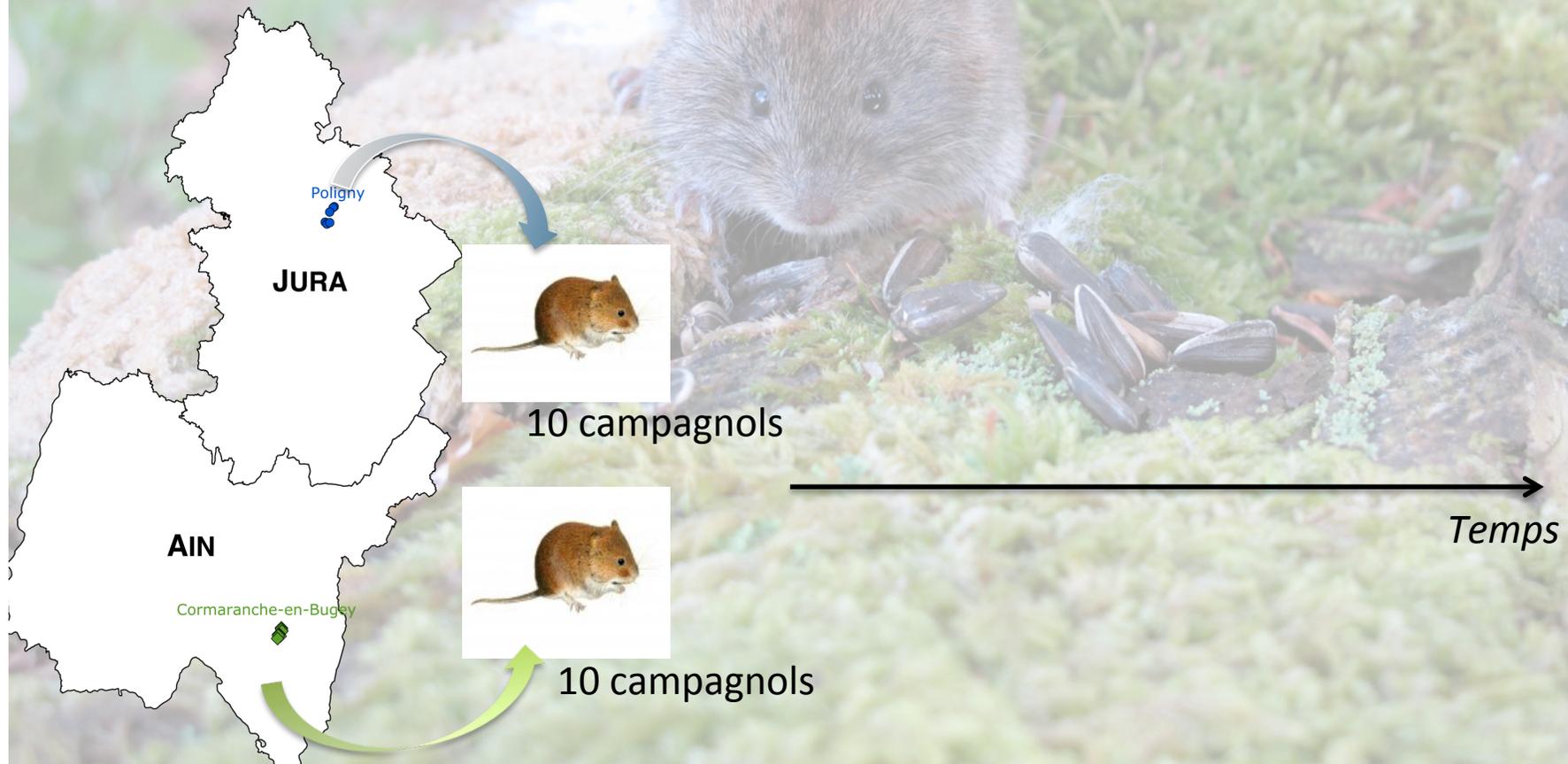
Potentiellement, les campagnols de l'Ain ont une plus forte capacité à éliminer le virus

⇒ Nécessité de vérifier expérimentalement la sensibilité des campagnols de l'Ain au virus Puumala



Protocole expérimental

- Capture de campagnols sauvages dans le milieu naturel
- Mise en quarantaine, vérification du statut séronégatif
- Choix de la souche (disponible: souche de laboratoire PUUV Sotkamo)
- Analyses préliminaires pour définir la dose et le mode d'infection
- Infections et Suivis au cours du temps



Protocole expérimental (suite)



Prélèvement chaque semaine du sang, de la salive, de l'urine et des fèces

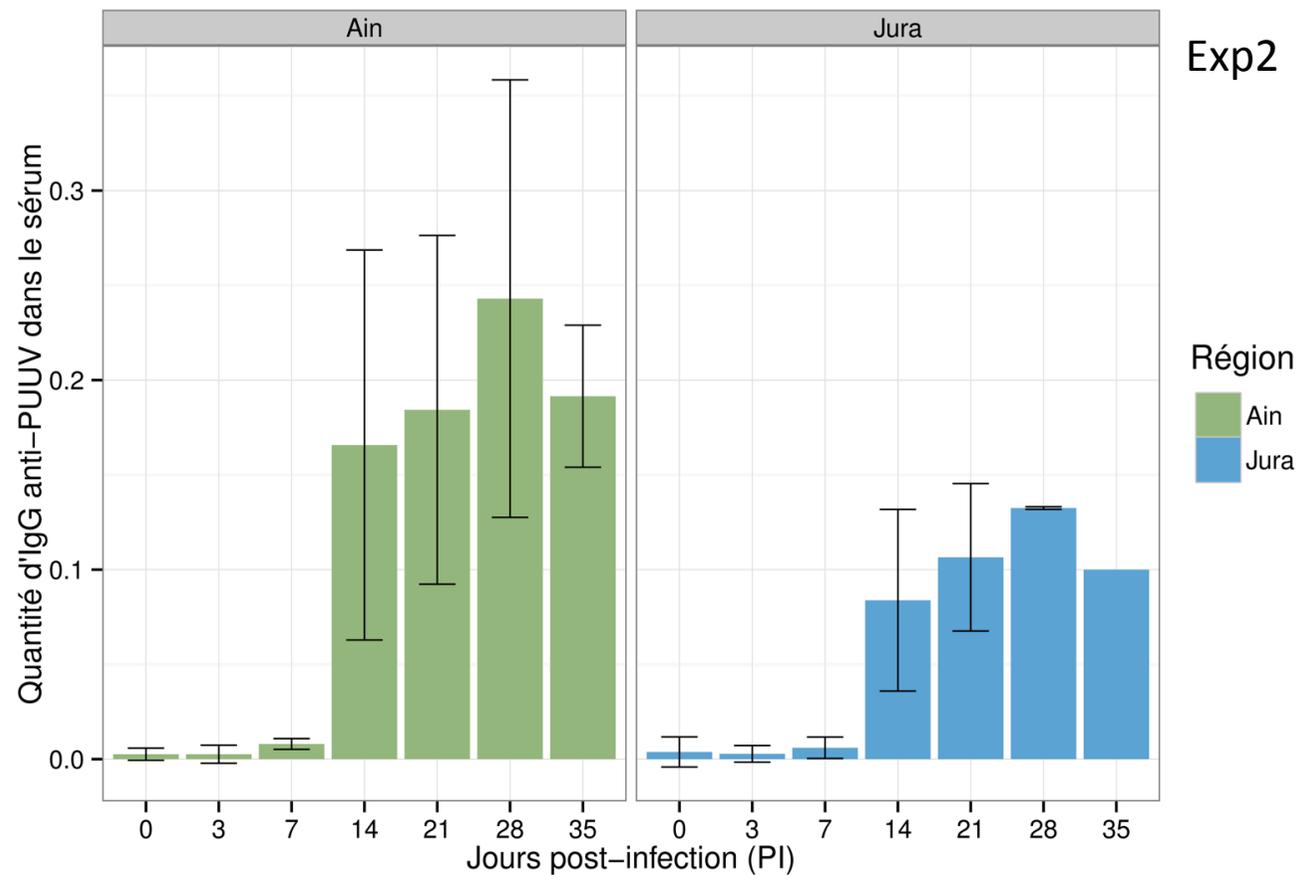
Expérimentation 1 = sacrifice de tous les individus à J 55

Expérimentation 2 = sacrifice de 2 individus de chaque région chaque semaine

Analyses temporelles

- Paramètres sérologiques (recherche d'anticorps anti-PUUV)
- Paramètres virologiques (charges virales dans le serum, les excréta et les organes)
- Paramètres physiologiques (température corporelle)
- Paramètres immunologiques (Haptoglobine, marqueur de l'inflammation)

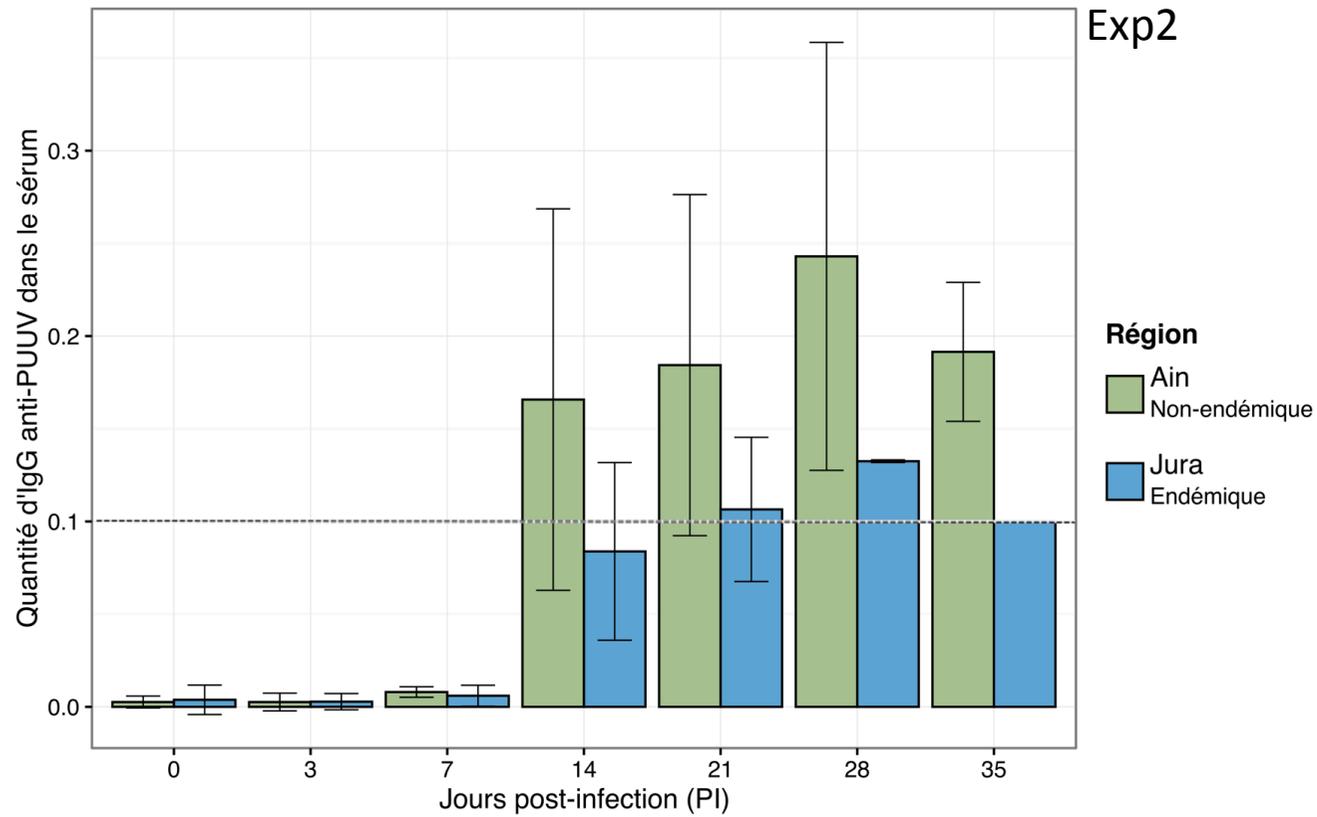
Résultats - sérologie



Production d'anticorps en réponse à l'injection de Puumala, pour les campagnols des 2 régions

Forte variabilité inter-individuelle de la réponse immunitaire
malgré les conditions contrôlées de laboratoire

Résultats - sérologie



Variabilité inter-régionale de la réponse immunitaire

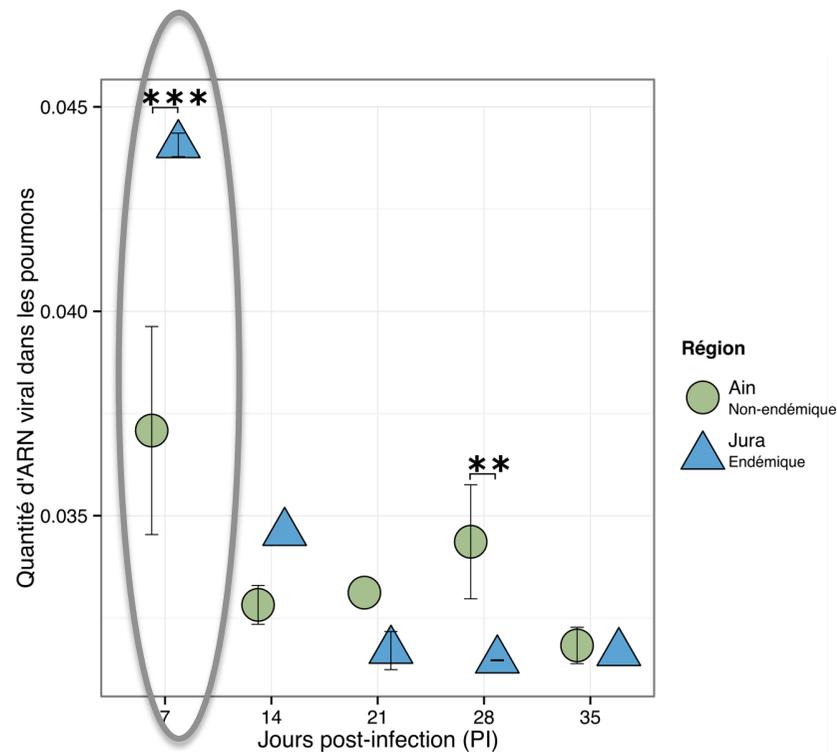
⇒ Production d'IgG plus forte pour les campagnols de l'Ain

Detection of viral RNA in organs

Presence of viral RNA

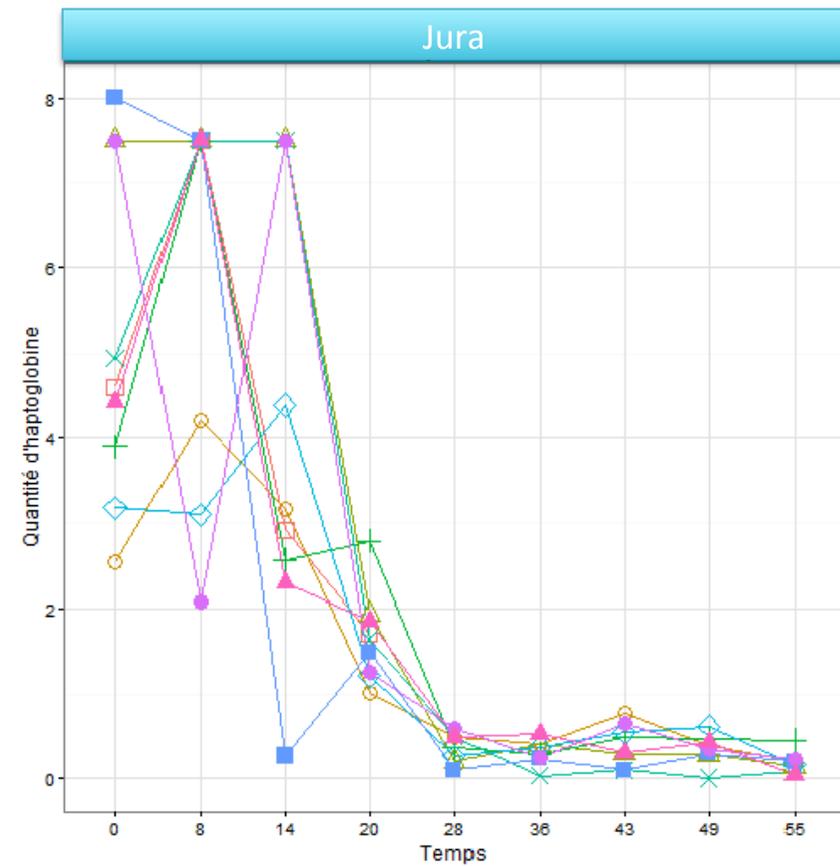
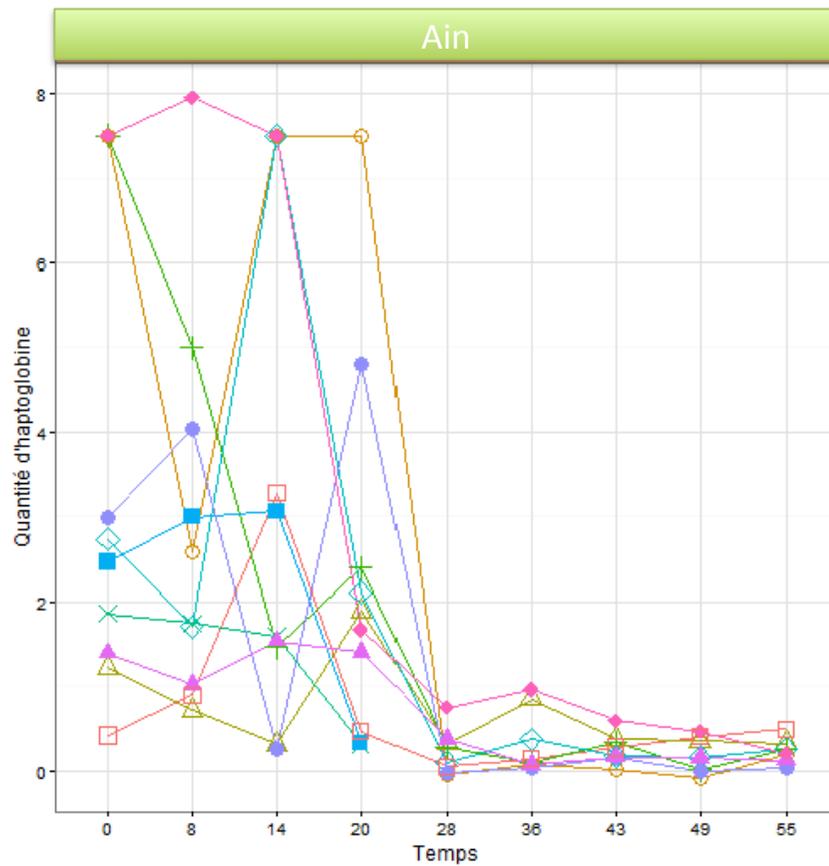
Organs	Ain	Jura
Lung	9/10 (7 to 35 Dpi)	8/10 (7 to 35 Dpi)
Liver	4/10 (7 and 14 Dpi)	4/10 (7 to 35 Dpi)
Salivary glands	7/10 (7 to 35 Dpi)	6/10 (7 to 35 Dpi)
Kidney	7/10 (7 to 35 Dpi)	7/10 (7 to 35 Dpi)
Bladder	1/10 (14 Dpi)	1/10 (7 Dpi)
Feces and intestine	2/10 (21 and 35 Dpi)	2/10 (14 Dpi)

- ARN viral détecté dans les serum à J7 uniquement
- ARN viral détecté dans les organes
- Même proportion d'organes infectés pour Jura et Ain



Variabilité inter-individuelle des charges virales détectées

➔ Plus faible répliation du virus chez les campagnols de l'Ain au début de l'infection

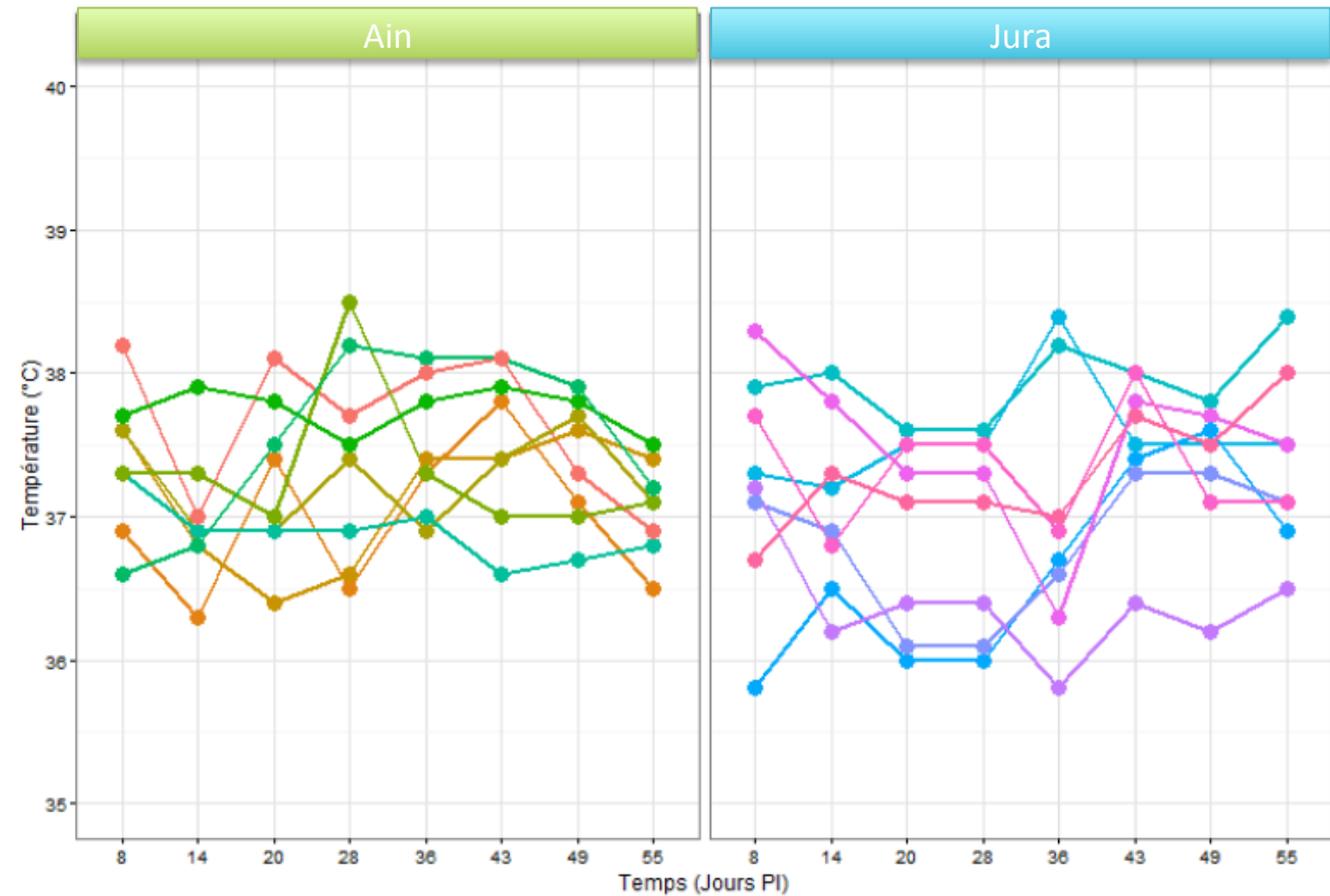


- Difficultés de lecture liées à l'hémolyse des échantillons sanguins
- Forte production d'haptoglobine dure plus longtemps pour les campagnols de l'Ain (J28) que du Jura (J20)
- Pas de différence d'intensité

⇒ Réponse inflammatoire plus longue en réponse à PUUV pour l'Ain

Résultats - Physiologie

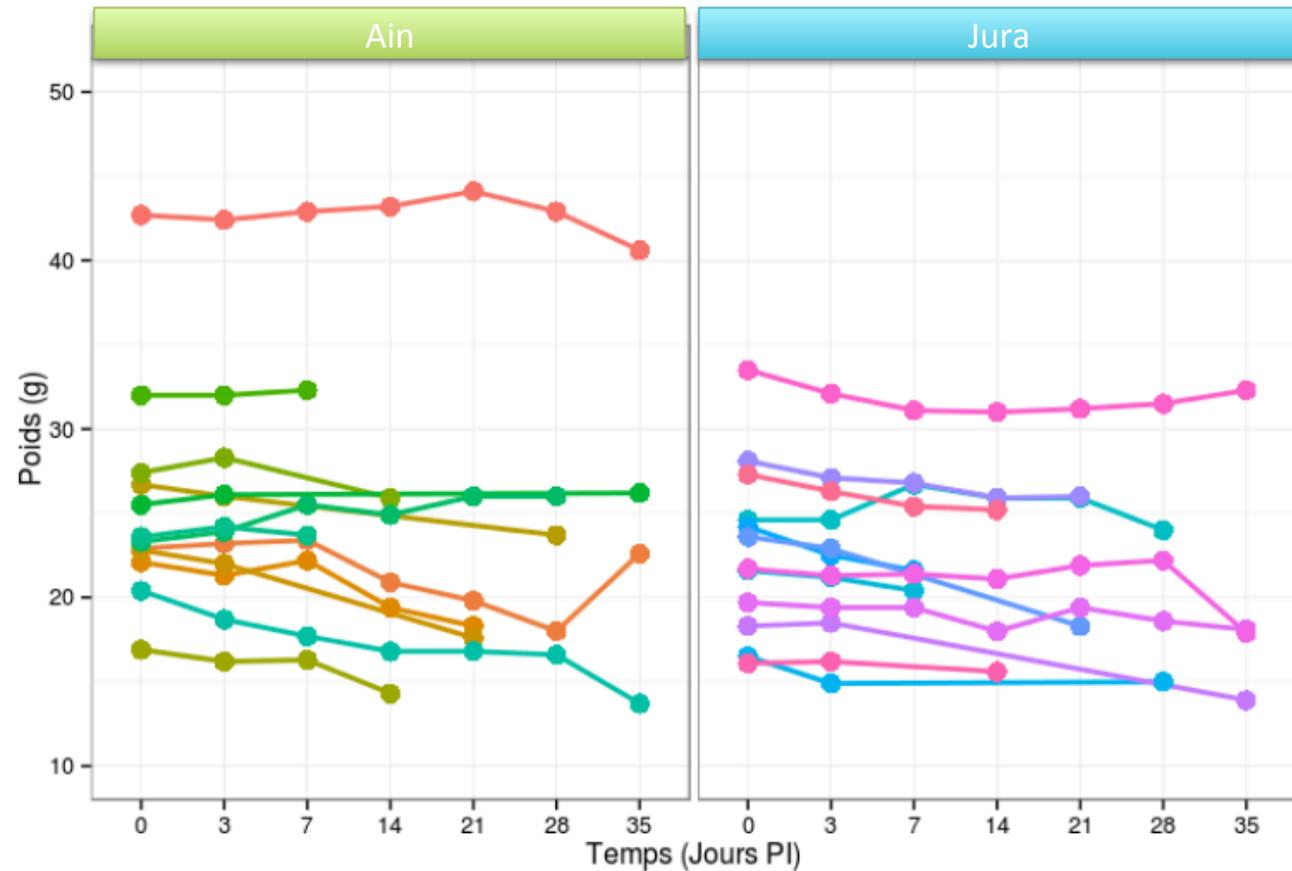
(Exp1)



Pas de changements de température au cours du temps.
Pas de différence entre régions.

Résultats - Physiologie

(Exp1)



Pas de changements de poids au cours du temps.
Différences interindividuelles mais pas entre régions.

⇒ Pas de détection de coût de l'infection, pour le Jura et l'Ain

Conclusions préliminaires

Les campagnols de l'Ain sont **sensibles** à PUUV (souche Sotkamo)

Il existe une forte **variabilité inter-individuelle** de la réponse à PUUV

Il existe une légère **variabilité inter-régionale** de la réponse à PUUV

- Production d'IgG plus forte pour les campagnols de l'Ain
 - Réponse inflammatoire plus longue en réponse à PUUV pour l'Ain
 - Plus faible réplication du virus chez les campagnols de l'Ain au début de l'infection
- Plus forte **résistance** des campagnols de l'Ain à PUUV ?
Plus forte **tolérance** des campagnols du Jura à PUUV ?

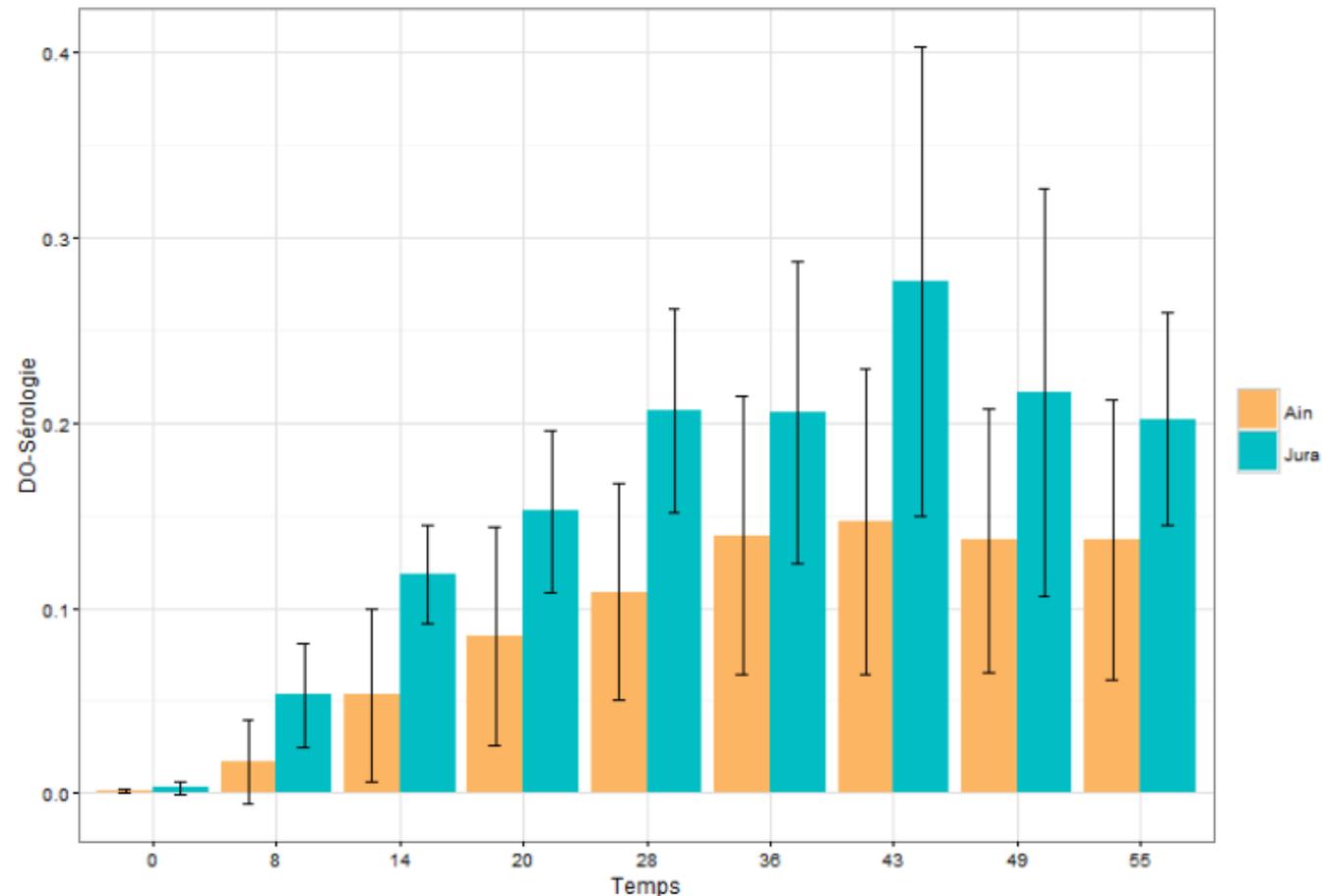
Le risque d'émergence de la néphropathie épidémique dans l'Ain existe mais est limité par la réponse immunitaire longue d'une majeure partie des campagnols de cette région

MAIS ...

Quelques résultats qui posent questions ...

Exp1

SÉROLOGIE



Séroconversions plus précoces chez les individus du Jura (vers J₁₄)
que chez ceux de l'Ain (entre J₁₄ et J₃₆)
DO plus fortes chez les individus du Jura : + d'Ac anti-PUUV.

= Résultat inverse de l'expérience 2....

Pbl de répétabilité & faibles effectifs ou lié à la saison / influence de la démographie

Quelques résultats qui posent questions ...

IMMUNOLOGIE

Résultats pour un marqueur de l'inflammation

Difficulté d'avoir accès à des marqueurs pour des espèces non modèles

Approches transcriptomiques ?
Pbl des faibles effectifs, et de la forte variabilité inter-individus

ECOLOGIE EVOLUTIVE

Comment évaluer le coût de l'infection et sa variabilité inter-individus ou régions ?

Quelques résultats qui posent questions ...

VIROLOGIE

Detection of viral RNA in organs and excreta through time

Organs	Presence of viral RNA		Excreta	Presence of viral RNA	
	Ain	Jura		Ain	Jura
Lung	9/10 (7 to 35 Dpi)	8/10 (7 to 35 Dpi)	Sera	3/10 (7 Dpi)	1/10 (3 Dpi)
Liver	4/10 (7 and 14 Dpi)	4/10 (7 to 35 Dpi)	Saliva	0/10	0/10
Salivary glands	7/10 (7 to 35 Dpi)	6/10 (7 to 35 Dpi)	Urine	0/10	0/10
Kidney	7/10 (7 to 35 Dpi)	7/10 (7 to 35 Dpi)	Feces only	0/10	0/10
Bladder	1/10 (14 Dpi)	1/10 (7 Dpi)			
Feces and intestine	2/10 (21 and 35 Dpi)	2/10 (14 Dpi)			

Early and transient presence of viral RNA in sera (detection by RT-PCR nested only)
Presence of viral RNA in organs but not in excreta related to them
Same proportions of infected organs in both regions

Absence du virus dans les excréta = Problème lié à la souche virale
Perte de virulence lié aux passages sur cellule ?

La réplication conduit elle à la production de protéines virales ?

Doctorat de Sarah Madrières (2017-2020)
Souches isolées des Ardennes et d'Orléans

Merci de votre attention

