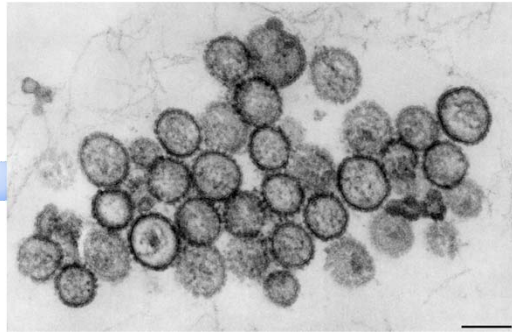


Projet PIRATE (Puumala IntRAhosT Evolution)

Collaboration CBGP-Anses-IBC





- ✓ Ordre : *Bunyvirales*
- ✓ Family : *Hantaviridae*
- ✓ Genus : *Orthohantavirus*
(nouvelle taxonomie 2016)

Réservoir : Campagnol roussâtre (*Myodes glareolus*)

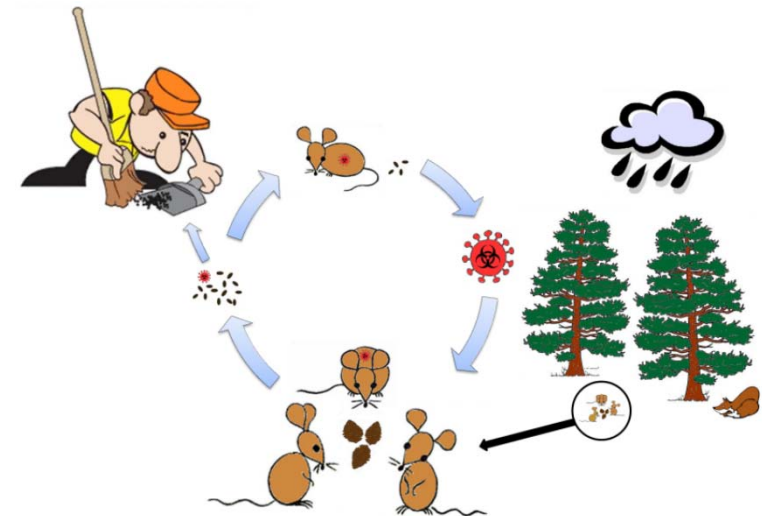


- ✓ Milieu Forestier
- ✓ Réparti dans toute l'Europe
- ✓ Présent partout en France sauf sur le pourtour méditerranéen

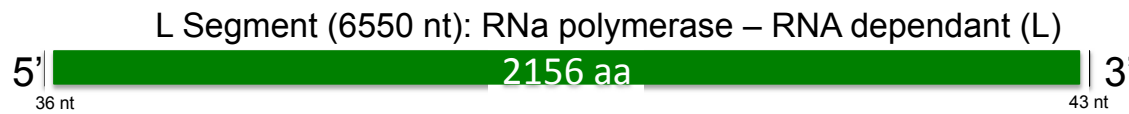
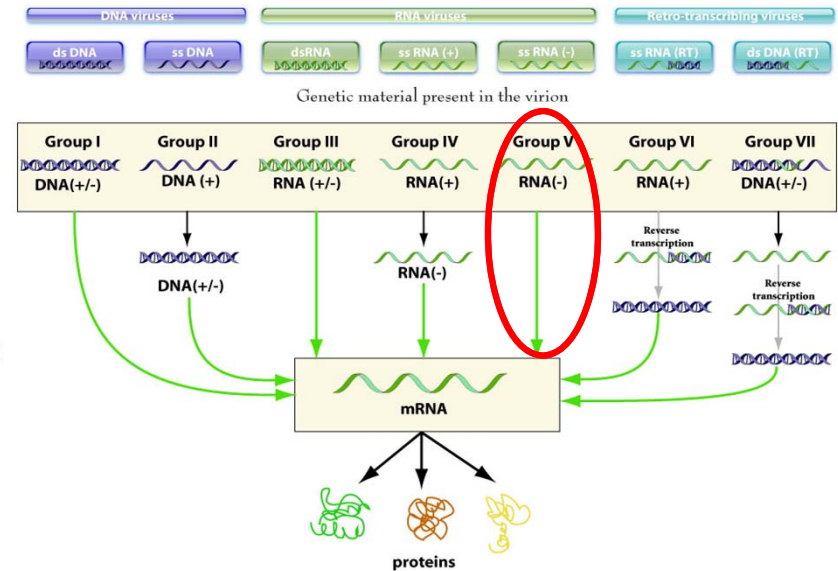
- ✓ Infection chronique et asymptomatique chez le campagnol.
- ✓ Néphropathie épidémique chez l'homme.
- ✓ Contamination par l'air (aérosols de poussières contaminées par les excréments), par contact des muqueuses ou de lésions cutanées avec des matières infectieuses.
- ✓ Pas de transmission interhumaine.



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

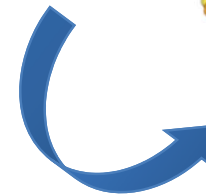
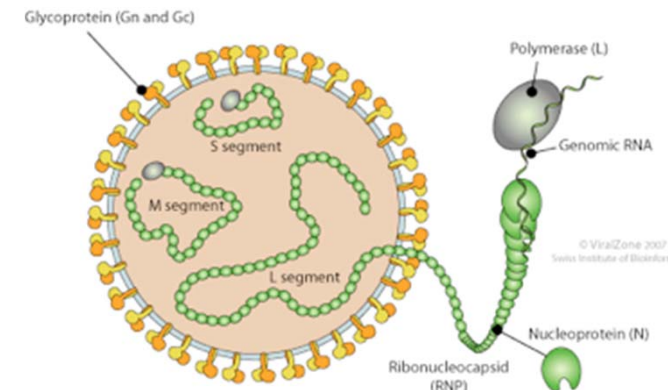
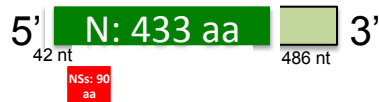


◆ Génome: ARN (-) tri-segmenté



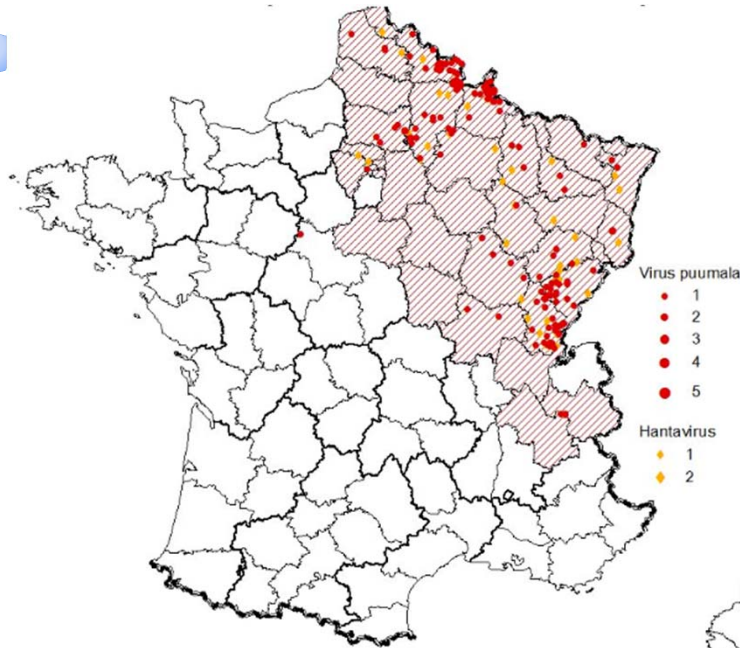
ORF
Non-coding

S Segment (1830 nt): Nucleoprotein (N) & non structural protein (NSs)





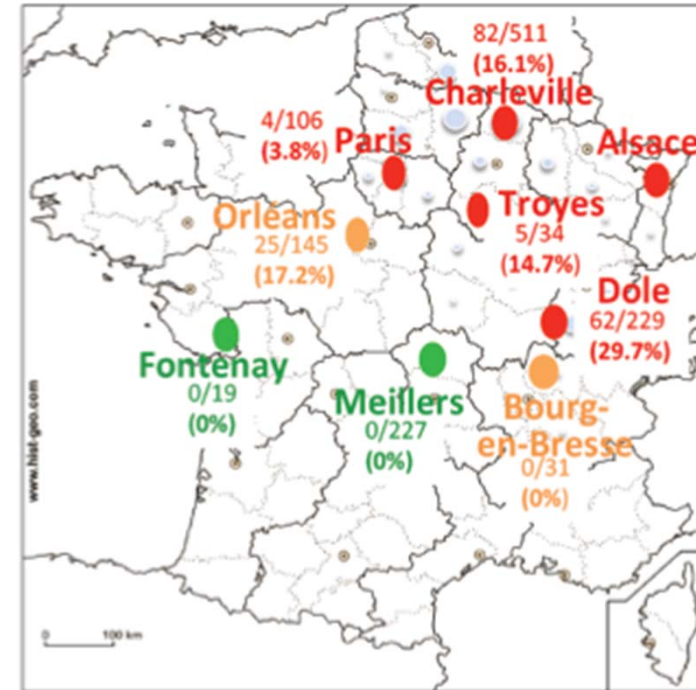
- ✓ Surveillance en régions endémique (◆), péri-endémique (◆) & non endémique (◆).



Distribution des 201 cas confirmés d'infection, diagnostiqués de janvier à septembre 2017 (source: CNR des hantavirus)

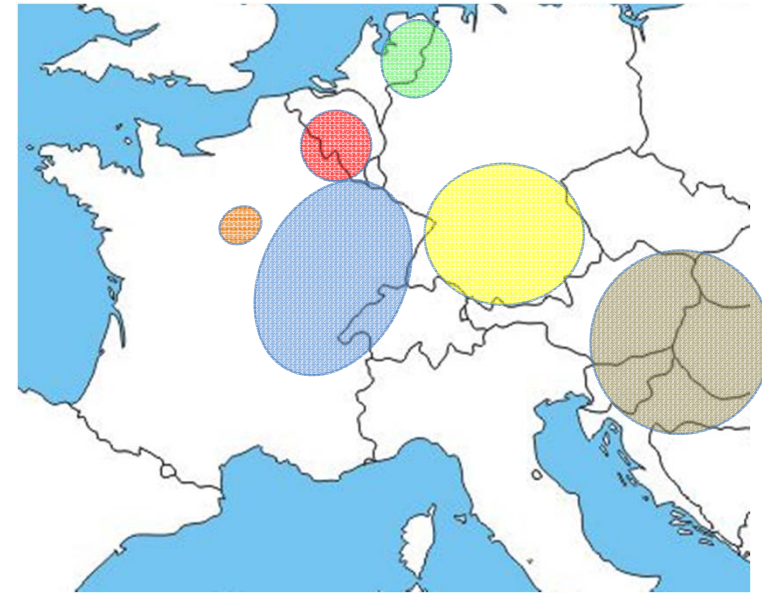
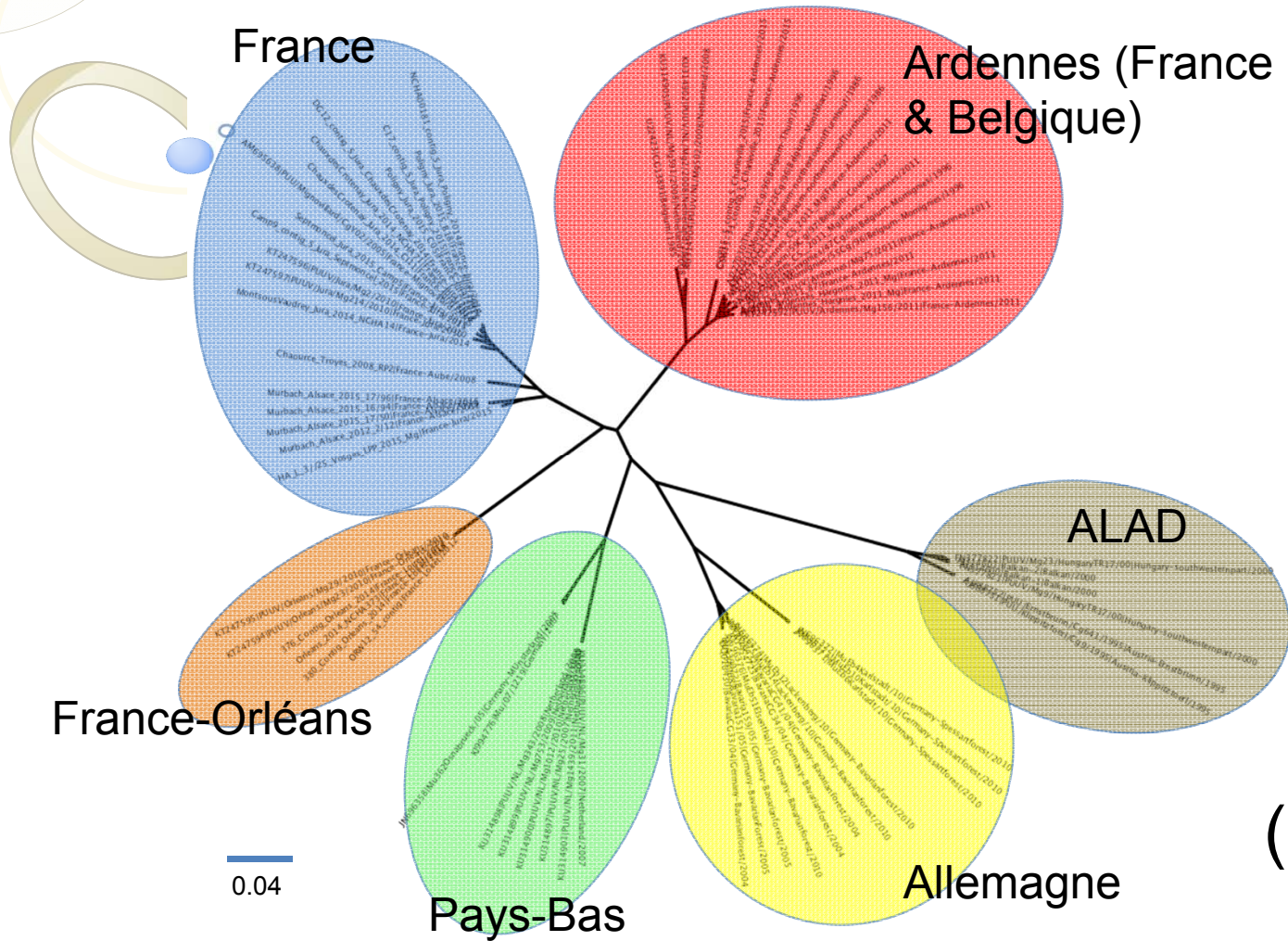


- ✓ Sérologie
- ✓ RT-PCR + séquençage
- ✓ Analyses phylogénétiques



Prévalence de PUUV chez le campagnol (Étude réalisée de 2008 à 2011)

- Séroprévalence et charge virale élevée observées parmi les populations de campagnols dans une région sans aucun cas humain (Orléans).



(nucléoprotéine)

- Les séquences d'Orléans forment un cluster spécifique des autres souches françaises.



Pourquoi la transmission et/ou la pathogénicité est plus élevée en région endémique qu'en région périendémique ?

- Différences dans les pratiques forestières ?
- Différence entre les réponses immunitaires / excrétions des campagnols de ces zones ?
- Différences génétiques entre les souches virales de ces zones ?

Comment évolue la communauté virale au cours de cette infection chronique ?

Dans les différents organes ?

Quelle est la diversité virale excrétée ?

→ Rôle de la diversité virale intrahôte ?



Sur la réponse immunitaire:

Viral Immunol. 2017 Sep;30(7):533-541. doi: 10.1089/vim.2017.0001. Epub 2017 May 22.

Influence of Transmitted Virus on the Host's Immune Response: A Case Study.

Merani S¹, Lucas M^{2,3,4}, Deshpande P¹, Pfafferott K², Chopra A², Cooper D², Leary S², Luciani F⁵, Gaudieri S^{1,2,6}.

Sur la pathogénicité / transmissibilité:

Virology 428 (2012) 21–29



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yviro



nature

Vol 439 | 19 January 2006 | doi:10.1038/nature04388

LETTERS

Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population

Marco Vignuzzi¹, Jeffrey K. Stone¹, Jamie J. Arnold², Craig E. Cameron² & Raul Andino¹

In vivo evaluation of pathogenicity and transmissibility of influenza A(H1N1)pdm09 hemagglutinin receptor binding domain 222 intrahost variants isolated from a single immunocompromised patient

Matthew J. Memoli*, Tyler Bristol, Kathleen E. Proudfoot, A. Sally Davis, Eleca J. Dunham, Jeffery K. Taubenberger

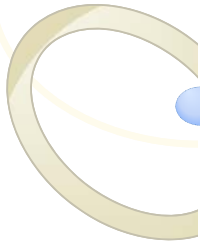
Research Article

Comparison of Quasispecies Diversity of HCV between Chronic Hepatitis C and Hepatocellular Carcinoma by Ultradeep Pyrosequencing

Chang-Wook Park,¹ Min-Chul Cho,² Keumrock Hwang,³ Sun-Young Ko,⁴ Heung-Bum Oh,¹ and Han Chu Lee⁵



Sur le saut d'espèce:



RNA virus population diversity: implications for inter-species transmission

Antonio V Bordería, Kenneth A Stapleford and Marco Vignuzzi

Available online at www.sciencedirect.com



OPEN ACCESS Freely available online



Ultra-Deep Sequencing of Intra-host Rabies Virus Populations during Cross-species Transmission

Monica K. Borucki^{1*}, Haiyin Chen-Harris¹, Victoria Lao¹, Gilda Vanier¹, Debra A. Wadford², Sharon Messenger², Jonathan E. Allen¹

JOURNAL OF VIROLOGY, July 2010, p. 6943–6954
0022-538X/10/\$12.00 doi:10.1128/JVI.00112-10
Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 84, No. 14

Intra- and Interhost Evolutionary Dynamics of Equine Influenza Virus^{¶§}

Pablo R. Murcia,^{1¶} Gregory J. Baillie,^{1,2¶} Janet Daly,^{3†} Debra Elton,³ Carley Jervis,³
Jennifer A. Mumford,¹ Richard Newton,³ Colin R. Parrish,⁴ Karin Hoelzer,⁴
Gordon Dougan,² Julian Parkhill,² Nicola Lennard,² Doug Ormond,²
Sharon Moule,² Andrew Whitwham,² John W. McCauley,⁵
Trevelyan J. McKinley,¹ Edward C. Holmes,^{6,7}
Bryan T. Grenfell,^{6,7‡} and James L. N. Wood^{1*}

Sur l'adaptation à un nouvel environnement:

Schönherz et al. *Vet Res* (2016) 47:10
DOI 10.1186/s13567-015-0296-5

Veterinary Research

RESEARCH ARTICLE

Open Access



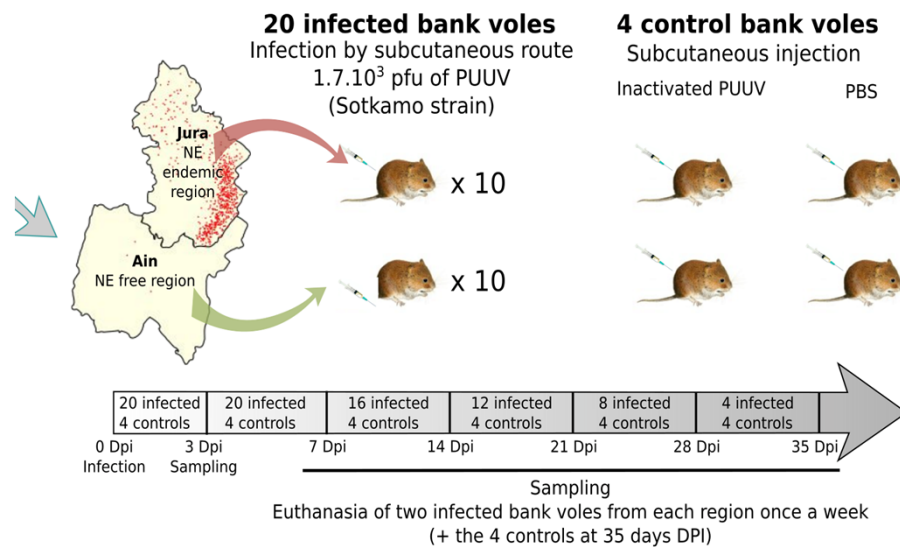
Ultra-deep sequencing of VHSV isolates contributes to understanding the role of viral quasispecies

Anna A. Schönherz¹, Niels Lorenzen², Bernt Guldbrandsen¹, Bart Buitenhuis¹ and Katja Einer-Jensen^{3†}



1) Infections expérimentales en laboratoire ABSL3 (Anses, Lyon):

- Campagnols sauvages issus de région endémique, péri-endémique et non-endémique
- Souche virale PUUV-Sotkamo (adaptée en culture cellulaire)



Serological analyses

Detection of anti-PUUV antibodies (IgG)
ELISA test (measure of optical density (OD))



Virological analyses

Detection of viral RNA in saliva, feces, urine (when available) and organs
- qRT-PCR (measure of the number of viral RNA copies)



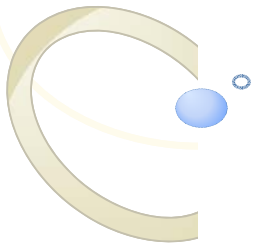
- RT-PCR nested (more sensitive)

Thèse A. Dubois

- ✓ Prélèvement (sérum & excréta) chaque semaine pendant 5 semaines
- ✓ Euthanasie de 2 individus chaque semaine (prélèvement des organes)
- ✓ Analyses sérologiques (IgG anti-PUUV), virologiques (qRT-PCR) et séquençage NGS (suivi des quasi-espèces)

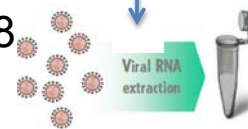


2) Séquençage du segment S complet (1830 nt):



Extractions de l'ARN viral:

- Inoculum (=T0)
- poumons & excréta à 7, 14, 21, 28, 35 jpi



RT-PCR



Séquençage haut débit



MiSeq

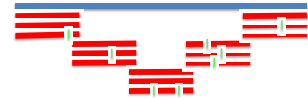


PacBio



MinION Mk 1B

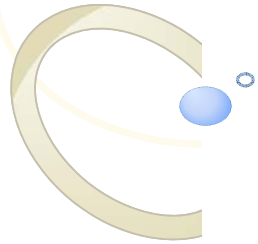
MinION



« Single Molécule » Sequencing



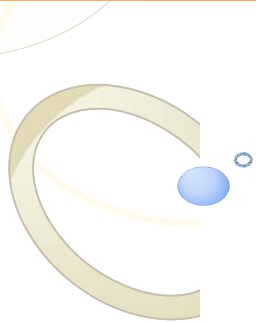
- Le séquençage MiSeq permet de détecter et de suivre la fréquence des SNP
- Le séquençage « Long read » pourrait permettre de suivre des génotypes viraux « pleine longueur »



Difficultés:

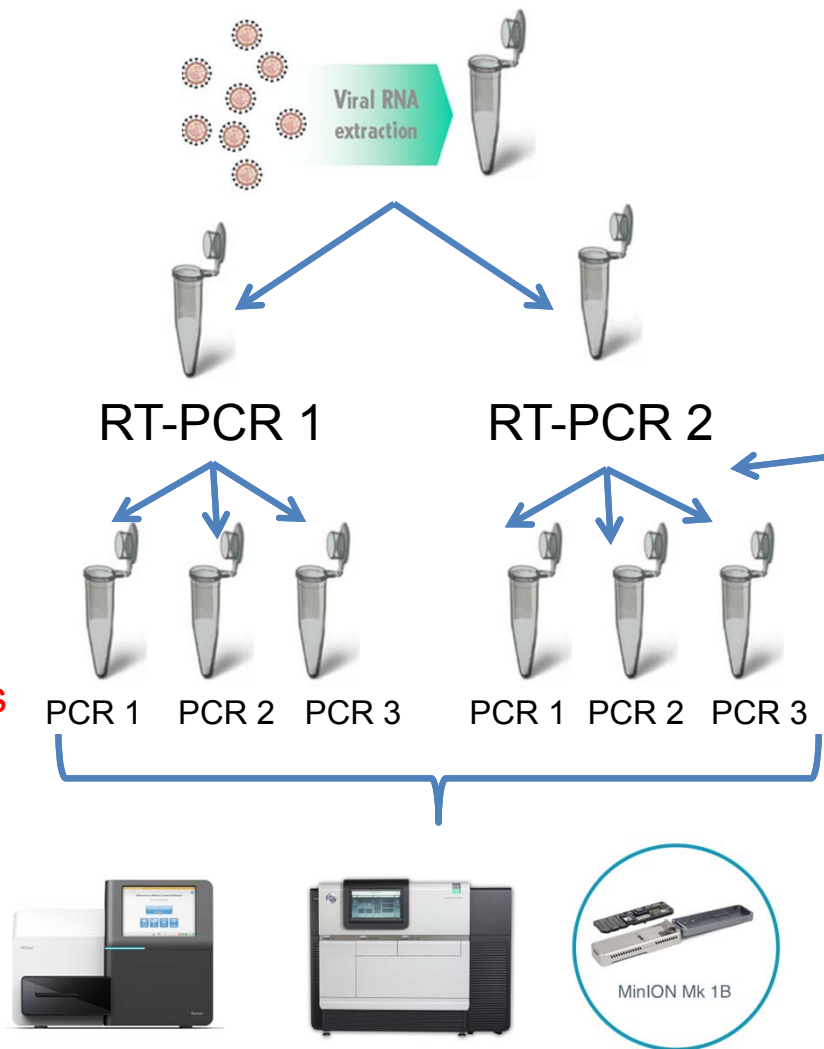
- ✓ Virémie chute après 7 j
 - Charges virales très faibles, indétectables dans le sérum.

- ✓ Variants rares potentiellement présents à des fréquences faibles
 - nécessité de différencier (le mieux possible...) des erreurs de RT-PCR, de PCR et de séquençage.



Un variant « réel » doit être détecté dans chaque PCR

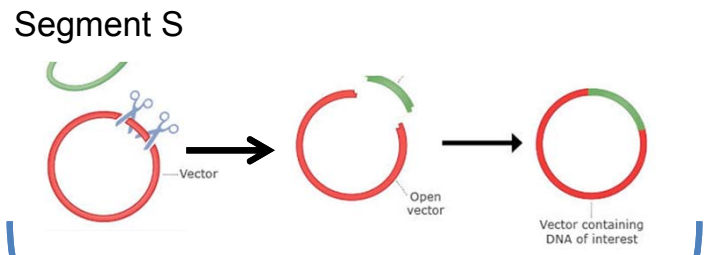
→ Les variants non détectés dans les 6 PCRs sont considérés comme des erreurs de RT-PCR ou de PCR



Erreurs de RT-PCR

Erreurs de PCR

Erreurs de séquençage

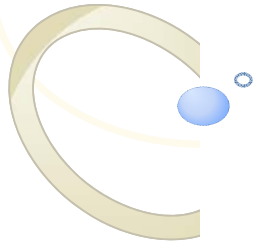


Clonage d'un segment S

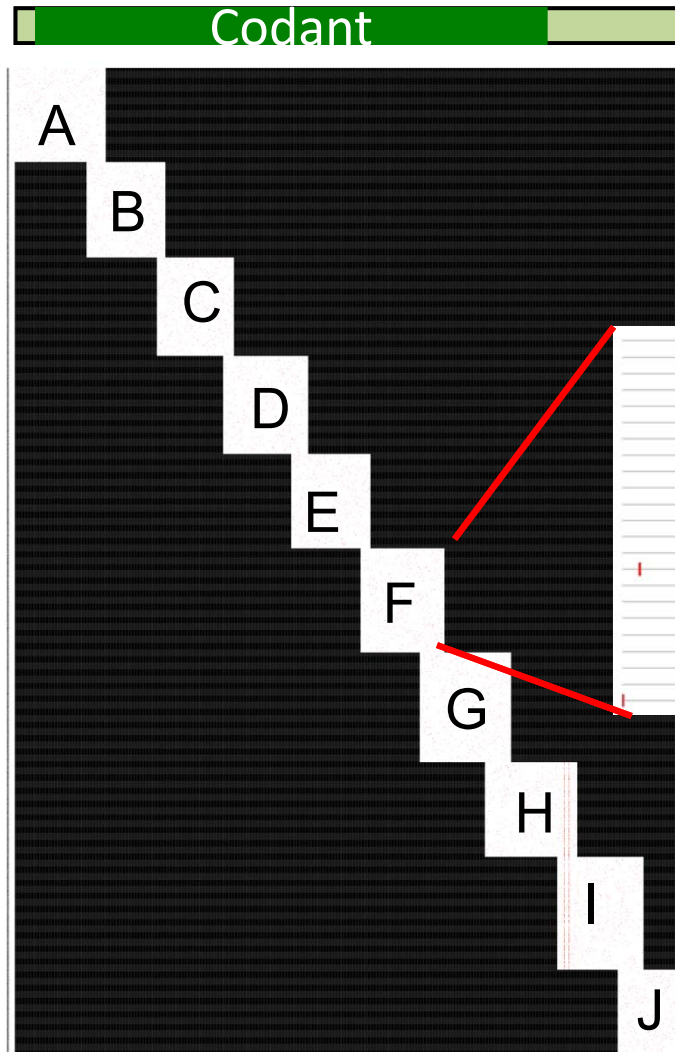
La diversité génétique d'un clone est proche de 0

→ Les variants détectés (après filtrage des erreurs de PCR) sont donc considérés comme des erreurs de séquençage.

→ Permet de fixer un seuil pour la fréquence minimale des « vrais » variants



Divisé en 10 fragments légèrement chevauchant



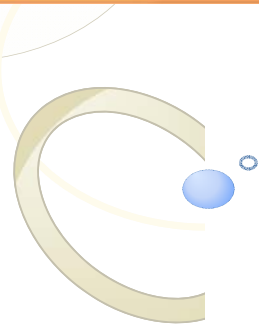
séquences uniques



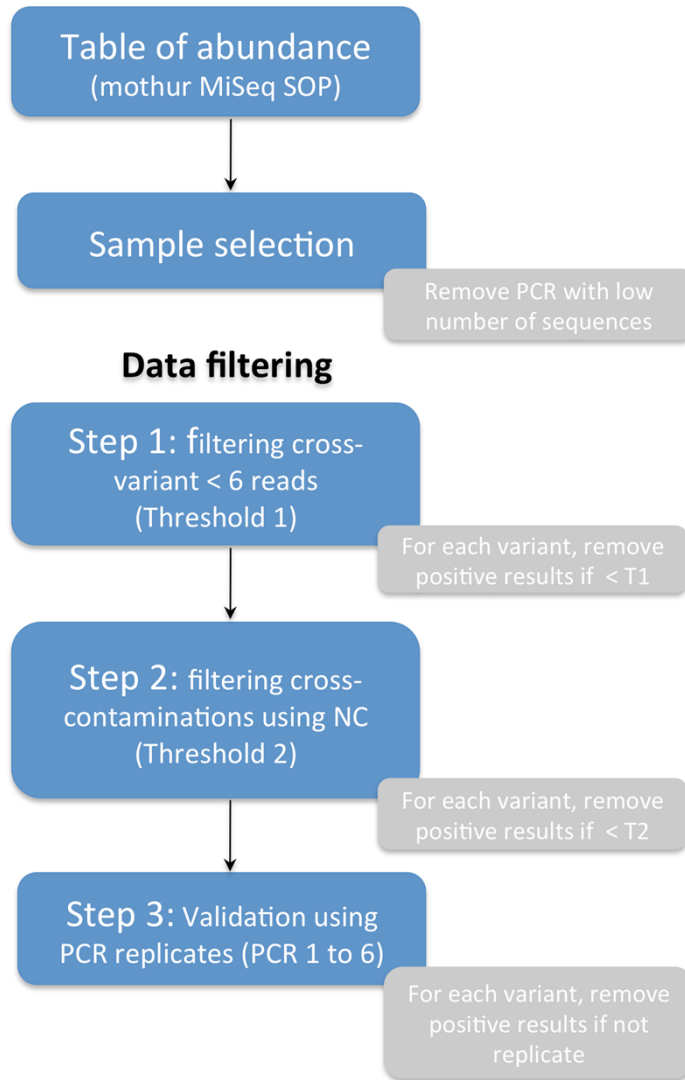
M03930_34.000000000-ARUCN_1_1101_18842_2485 (m)	0,72
M03930_34.000000000-ARUCN_1_1103_25576_20528	0,11
M03930_34.000000000-ARUCN_1_1102_28975_12027	0,05
M03930_34.000000000-ARUCN_1_1101_19048_3272	0,01
M03930_34.000000000-ARUCN_1_1101_6185_18366	0,001
M03930_34.000000000-ARUCN_1_1101_16613_26150	0,0001
M03930_34.000000000-ARUCN_1_1102_19563_5188	...
M03930_34.000000000-ARUCN_1_1101_11488_14578	
M03930_34.000000000-ARUCN_1_1101_13171_6766	
M03930_34.000000000-ARUCN_1_1102_10467_26651	
M03930_34.000000000-ARUCN_1_1101_26638_12169	
M03930_34.000000000-ARUCN_1_1101_21306_5632	
M03930_34.000000000-ARUCN_1_1101_12865_13916	
M03930_34.000000000-ARUCN_1_1102_14386_9045	
M03930_34.000000000-ARUCN_1_1104_24115_26179	
M03930_34.000000000-ARUCN_1_1103_5790_14871	
M03930_34.000000000-ARUCN_1_1105_17279_16716	
M03930_34.000000000-ARUCN_1_1103_12532_17074	
M03930_34.000000000-ARUCN_1_1101_21707_23001	
M03930_34.000000000-ARUCN_1_1104_23568_13902	
M03930_34.000000000-ARUCN_1_1101_28683_12886	
M03930_34.000000000-ARUCN_1_1101_16066_6384	
M03930_34.000000000-ARUCN_1_1101_28777_12716	

abondance

0,72
0,11
0,05
0,01
0,001
0,0001
...



Bioinformatic procedure





→ 46 « SNP » détectés dans l'inoculum (T0)

A: G₁, C₁₈, T₃₆, G₇₉, G₁₀₇, G₁₃₃, G₁₅₅, G₁₉₃, C₂₁₄

B: G₁₉₅, G₂₆₃

C: T₄₀₂, G₄₄₄

D: G₅₇₄, C₆₂₂, T₇₀₆, G₇₁₃, C₇₄₄

E: C₇₂₄, G₇₃₄, G₇₅₁, T₇₇₄, G₇₉₉, G₈₀₁, G₈₀₈

F: T₉₆₀

G: T₁₁₀₆, T₁₁₁₆, C₁₁₆₅

H: T₁₂₁₅, T₁₂₈₉, G₁₄₂₀-T₁₄₃₂, G₁₂₁₅-T₁₄₃₂, G₁₄₂₀, T₁₄₃₂

I: G₁₄₂₀, T₁₄₃₂, G₁₄₂₀-T₁₄₃₂, C₁₄₉₉

J: C₁₅₉₂, G₁₆₃₈, C₁₆₅₂, C₁₆₅₉, C₁₆₇₃, A₁₇₁₆, G₁₇₃₁

■ Domaines variables
(codant)

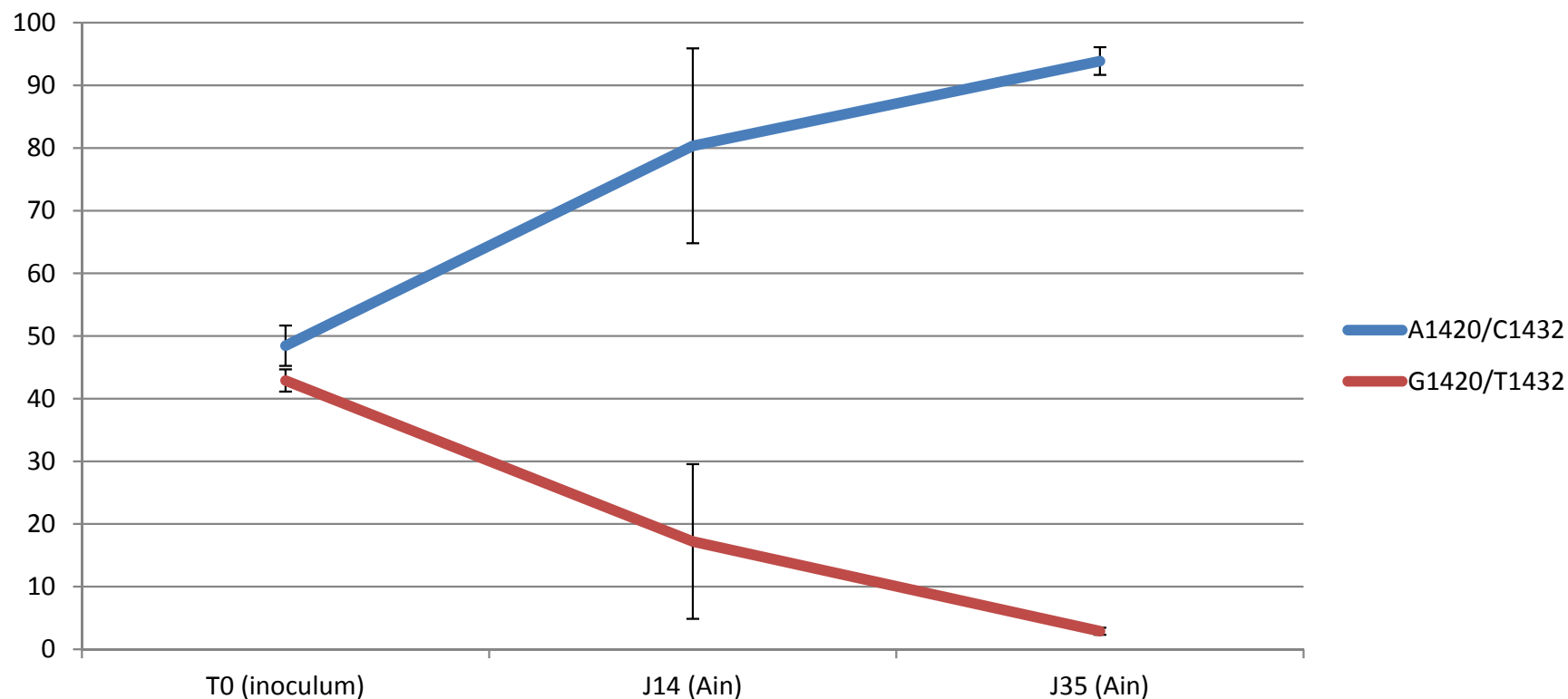
■ Codant

■ Non codant

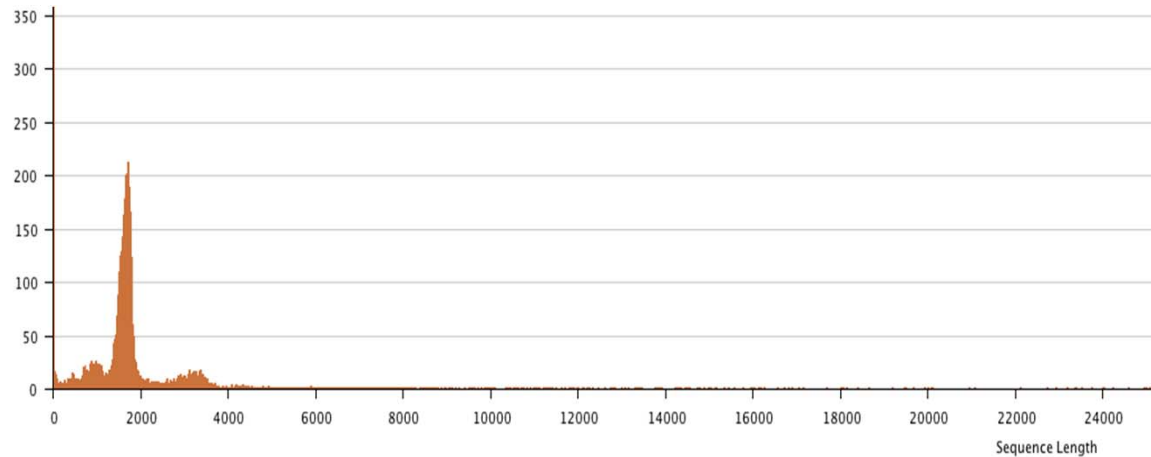
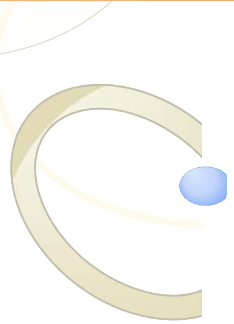
→ Tous les SNP sont présents à des fréquences très faibles (< 5%)
excepté « G₁₄₂₀-T₁₄₃₂ » (≈ 40%),



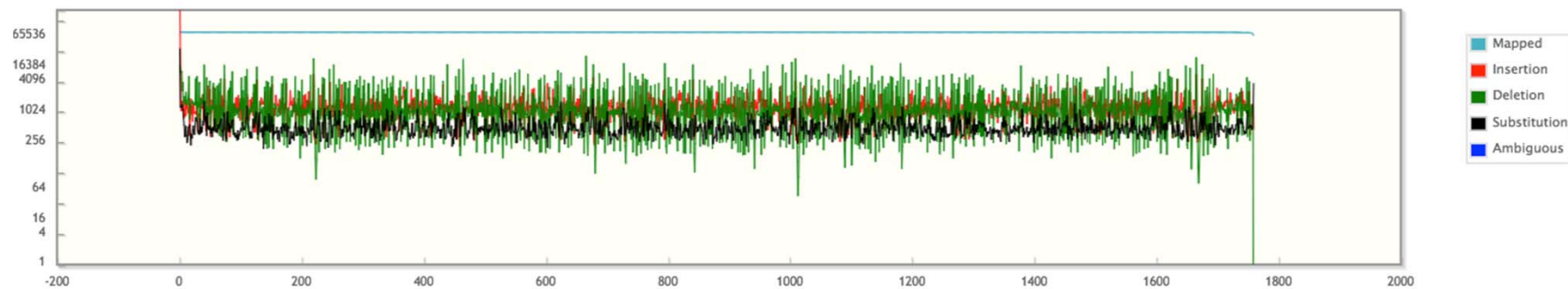
- Les SNP à « très faible fréquence » détectés dans l'inoculum sont presque tous indétectables à J14 et J35 dans le poumon des campagnols.



- On observe une variation de fréquences pour le génotype $G_{1420}-T_{1432}$ au cours du temps



→ ≈ 40 000 séquences exploitables
(inoculum)



(clone)

- Taux d'insertion moyen = 1/25 bases
- Taux de délétion moyen = 1/15 bases
- Taux de substitution moyen = 1/51 bases
- **Taux d'erreur global = 12,39 %**
- **Taux de substitution (-indels) = 1,96 %**

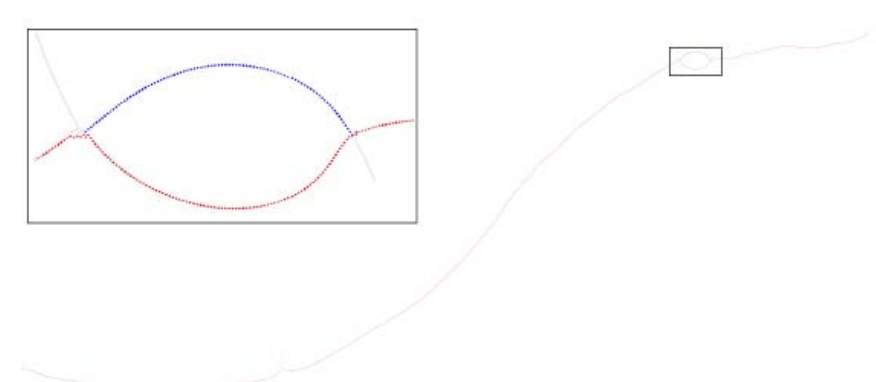
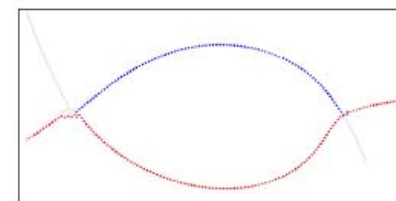
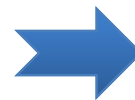
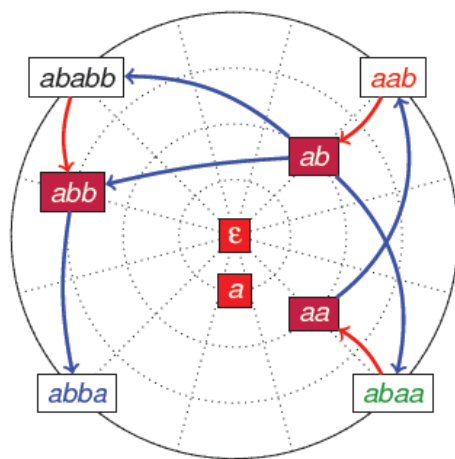
→ Trop d'erreurs pour l'identification de variants viraux rares...



Peut on corriger et exploiter les reads PacBio ?

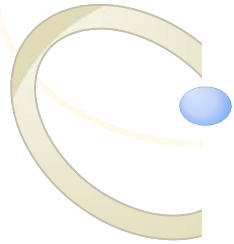
SuperPony: SUPERstring graph for Pacbio correction and polymorphism detection

R. Canovas^{1,3}, G. Castel^{2,3}, B. Cazaux^{1,3} and E. Rivals^{1,3}



Algorithme de correction

Création de graph permettant l'identification des polymorphismes, des génotypes et de leur fréquence



- ✓ Utilisation de souches sauvages de PUUV pour les inoculums (thèse de Sarah Madrières)
 - Meilleure diversité ?
 - Meilleure réplication *in vivo* ? Charges virales plus élevées ?
 - Virus détectable dans les excréta ?

- ✓ Recherche et suivi de SNP dans des régions ciblées des segments M et L.
 - Evolution / sélection dans les épitopes des glycoprotéines virales ?

- ✓ Utilisation du PacBio ?
 - Possibilité de reconstituer des génotypes viraux pleines longueurs fiables ?
 - Séquençage des segments M et L entiers en « long reads » ?



Caroline Tatard
Maxime Galan
Nathalie Charbonnel
Anne Loiseau
Laure Benoit
Adélaïde Dubois
Emmanuelle Artige
Jean-François Martin
Julie Pisano

Séverine Murri
Philippe Marianneau
Coralie Pulido
Johann Vulin

Bastien Cazaux
Eric Rivals



Jean-Baptiste Pons