

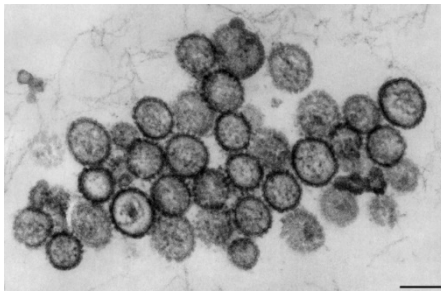
Dynamique et évolution intra-hôte du virus Puumala dans des zones géographiques épidémiologiquement différentes



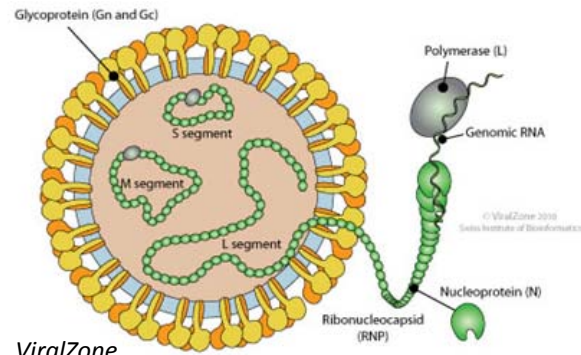
SARAH MADRIERES
Séminaire CBGP – 14/03/18

Contexte

Virus Puumala (PUUV)



Hans R. Gelderblom, Freya Kaulbars/RKI



ViralZone

➤ Taxonomie

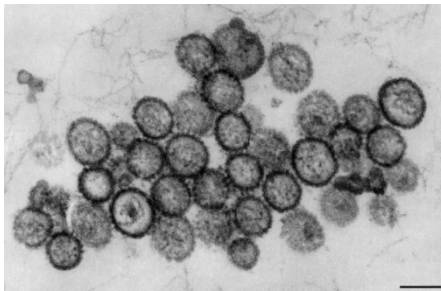
- **Ordre** : *Bunyavirales*
- **Famille** : *Hantaviridae*
- **Genre** : *Orthohantavirus*

➤ Caractéristiques

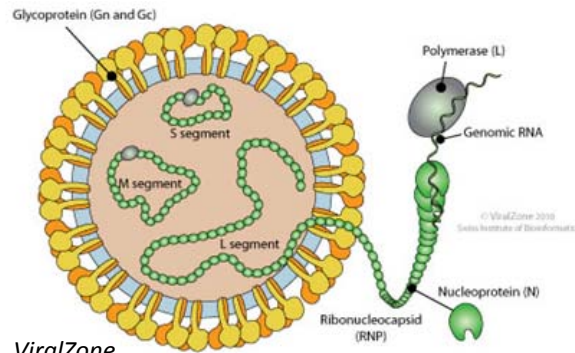
- Virus enveloppé
- ARN simple brin négatif trisegmenté

Contexte

Virus Puumala (PUUV)



Hans R. Gelderblom, Freya Kaulbars/RKI



ViralZone

Myodes glareolus

Réservoir naturel de PUUV



➤ Taxonomie

- **Ordre** : *Bunyavirales*
- **Famille** : *Hantaviridae*
- **Genre** : *Orthohantavirus*

➤ Caractéristiques

- Virus enveloppé
- ARN simple brin négatif trisegmenté

➤ Taxonomie

- **Ordre** : *Rodentia*
- **Famille** : *Muridae*
- **Sous-famille** : *Arvicolinae*

➤ Caractéristiques

- Habitat : sous-bois plus ou moins dense et feuillu.

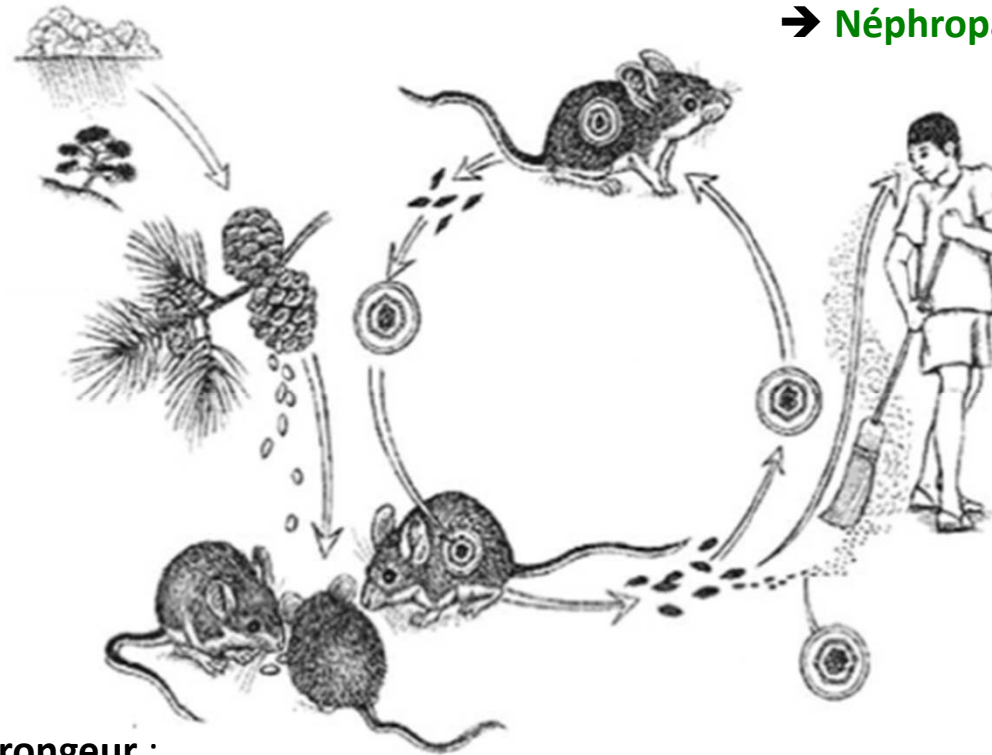
Contexte

Transmission de PUUV

Transmission du rongeur à l'Homme :

- Indirecte (voie respiratoire) : inhalation d'aérosols contaminés (fèces, urine)

→ **Néphropathie épidémique**



Transmission inter-rongeur :

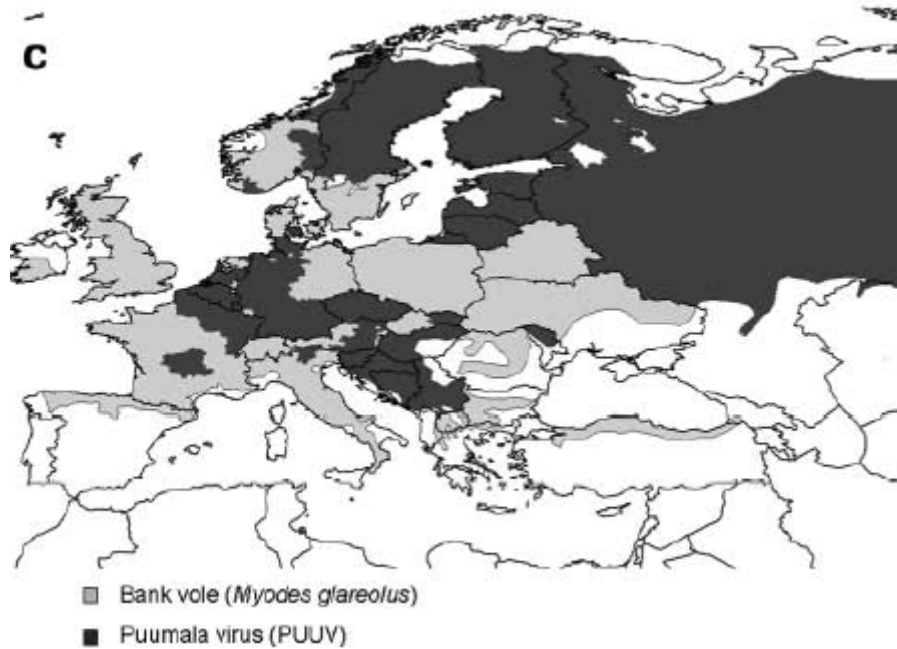
- Directe : morsures (salive)
- Indirecte (voie respiratoire) : inhalation d'aérosols contaminés (fèces, urine)

→ **Infection chronique et asymptomatique**

Contexte

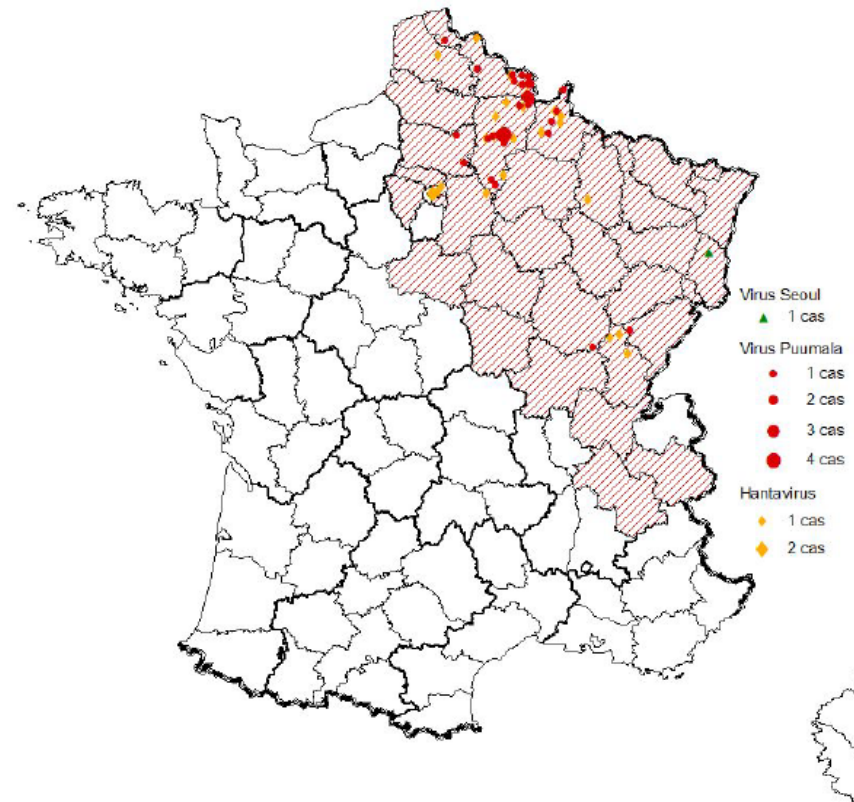
Cas d'infections à PUUV

Europe



Distribution géographique de l'hantavirus Puumala en Europe et de son réservoir naturel, *Myodes glareolus* (Olsson et al, 2010). Les zones grises représentent la répartition du rongeur et les zones noires la présence de PUUV ou des cas de NE.

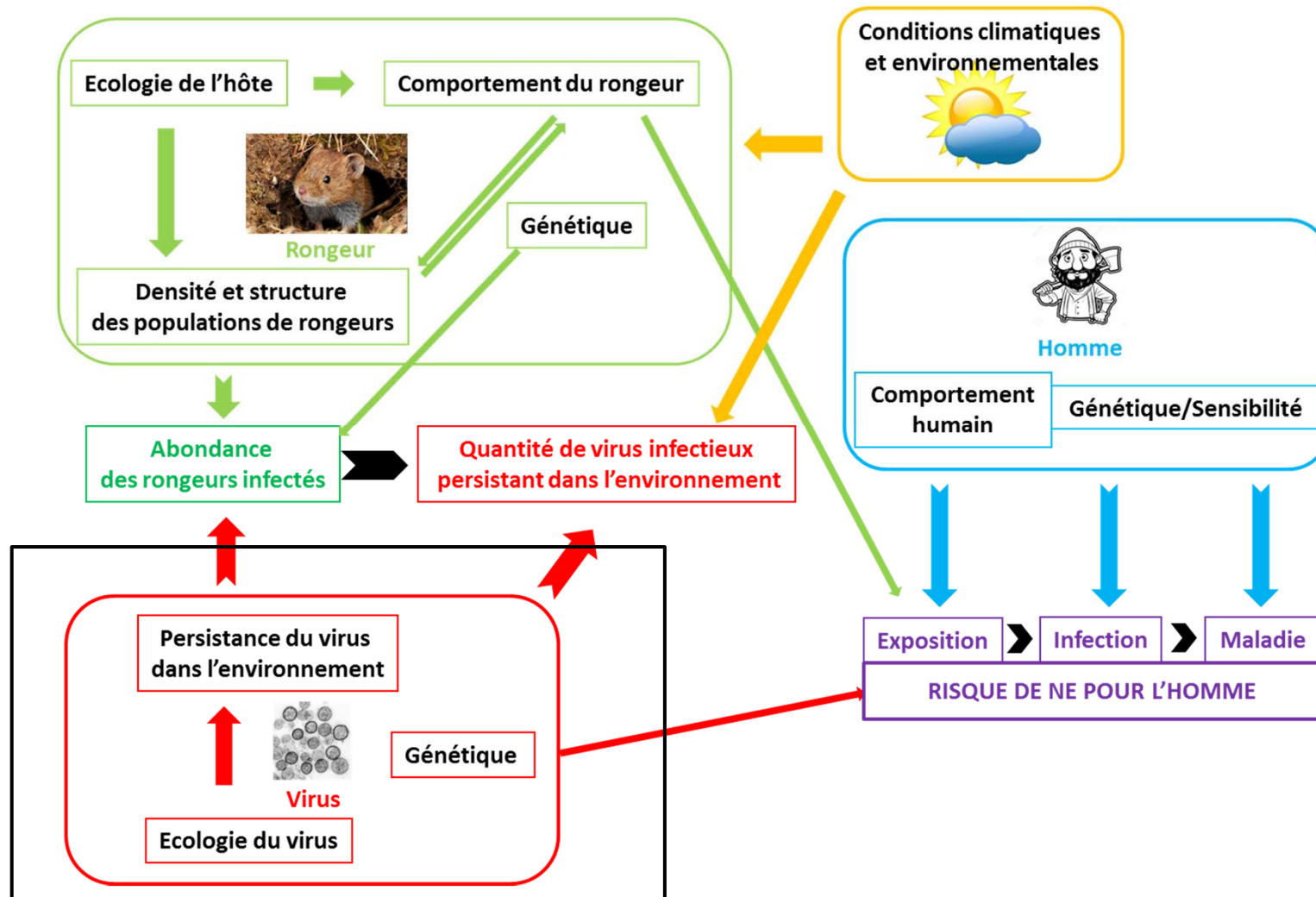
France



Distribution géographique des cas à hantavirus en France (CNR Hantavirus). En hachuré, les cas répertoriés à hantavirus sur la période 2003-2016. Les points représentent les cas confirmés d'infection récente à hantavirus en 2016.

Contexte

Facteurs impliqués dans l'émergence et la distribution des cas de NE



Acteurs impliqués dans les mécanismes d'émergence de la NE (adapté de Reusken et Heyman, 2013 par P. Marianneau)

Thèse

Hypothèses

Hypothèse n°1 : La variabilité génétique spatiale de PUUV est associée à une différence de capacité de transmission entre les campagnols ou à la différence de réplication/excrétion dans ce réservoir.

Hypothèse n°2 : La variabilité génétique intra-hôte de PUUV est associée à une différence de capacité de transmission entre les campagnols ou de réplication/excrétion dans ce réservoir.

Thèse

Objectifs

2 axes d'études :

Axe I : Virologie (ANSES Lyon)

Impact des interactions hôte-pathogène dans la dynamique d'infection à PUUV.

- Infections expérimentales croisées sur des populations de campagnols roussâtres sauvages

Axe II : Phylogénomique (CBGP, Montpellier)

Analyse de l'évolution génétique intra-hôte de PUUV au cours de l'infection.

- Séquençage haut-débit à partir des poumons de campagnols infectés expérimentalement.

Thèse

Objectifs

2 axes d'études :

Axe I : Virologie (ANSES Lyon)

Impact des interactions hôte-pathogène dans la dynamique d'infection à PUUV.

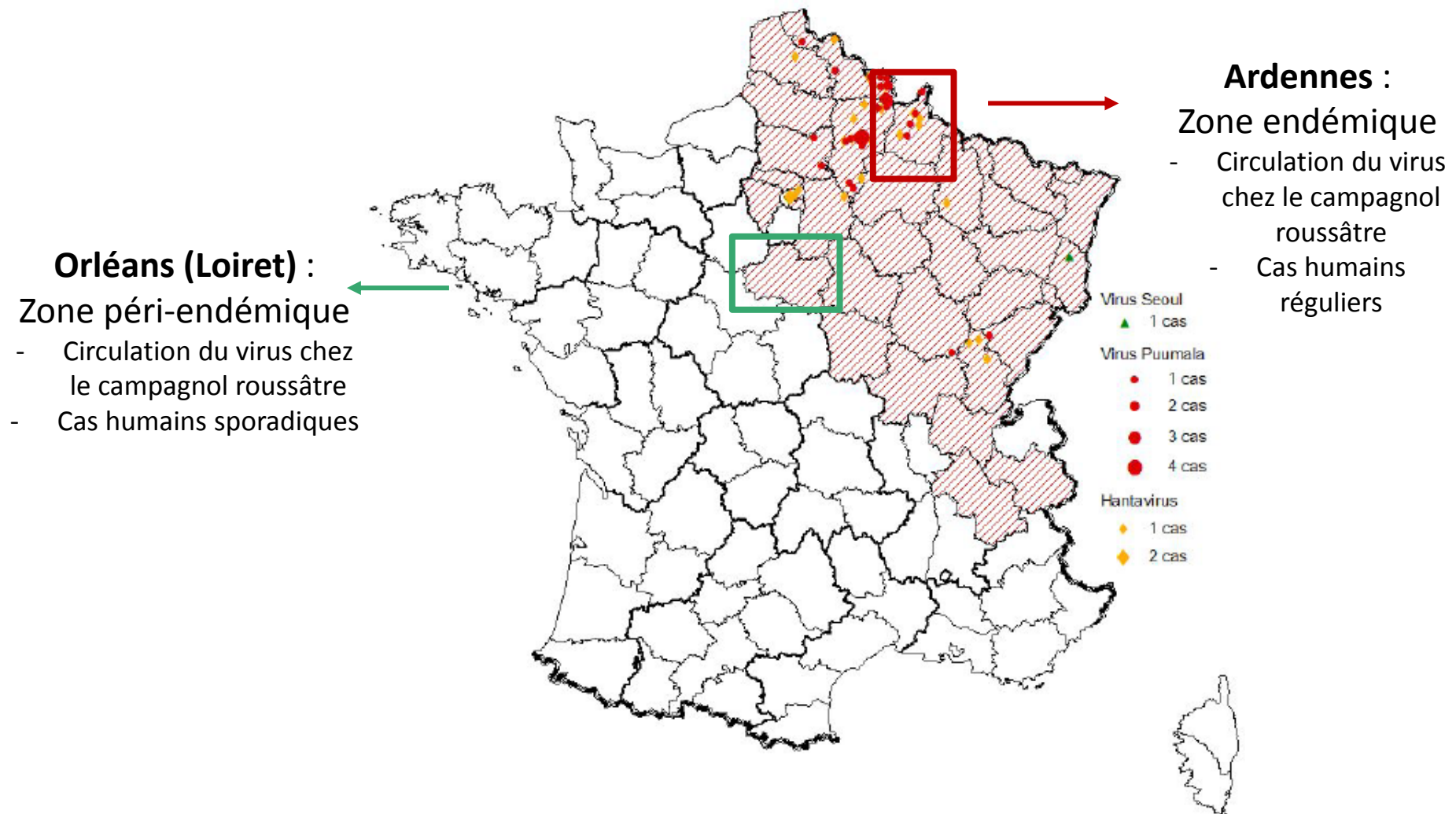
- Infections expérimentales croisées sur des populations de campagnols roussâtres sauvages

Axe II : Phylogénomique (CBGP, Montpellier)

Analyse de l'évolution génétique intra-hôte de PUUV au cours de l'infection.

- Séquençage haut-débit à partir des poumons de campagnols infectés expérimentalement.

Zones d'études



→ Isolement de ces 2 souches françaises PUUV au laboratoire (S. Murri et J. Vulin)

Echantillonnage

2 sessions de capture (Octobre 2017) :

Orléans: 18 campagnols

Ardennes : 29 campagnols



Echantillonnage

2 sessions de capture (Octobre 2017) :

Orléans: 18 campagnols

Ardennes : 29 campagnols



Prise de sang au sinus rétro-orbitaire
Prélèvements de salive, fèces, urine
Mesure du poids et de la taille

Analyses sérologiques et de biologie moléculaire (qRT-PCR)

Rongeurs séropositifs
et qRT-PCR +

Rongeurs séronégatifs
et qRT-PCR -

**Etude des infections
naturelles par PUUV**

**Infections expérimentales par
la souche Ardennes de PUUV**

Quarantaine

Orléans	Ardennes
0	7

Orléans	Ardennes
15	15

I- Mise au point méthodologique à partir
des campagnols infectés naturellement
par PUUV

I- Mise au point méthodologique à partir des campagnols infectés naturellement par PUUV

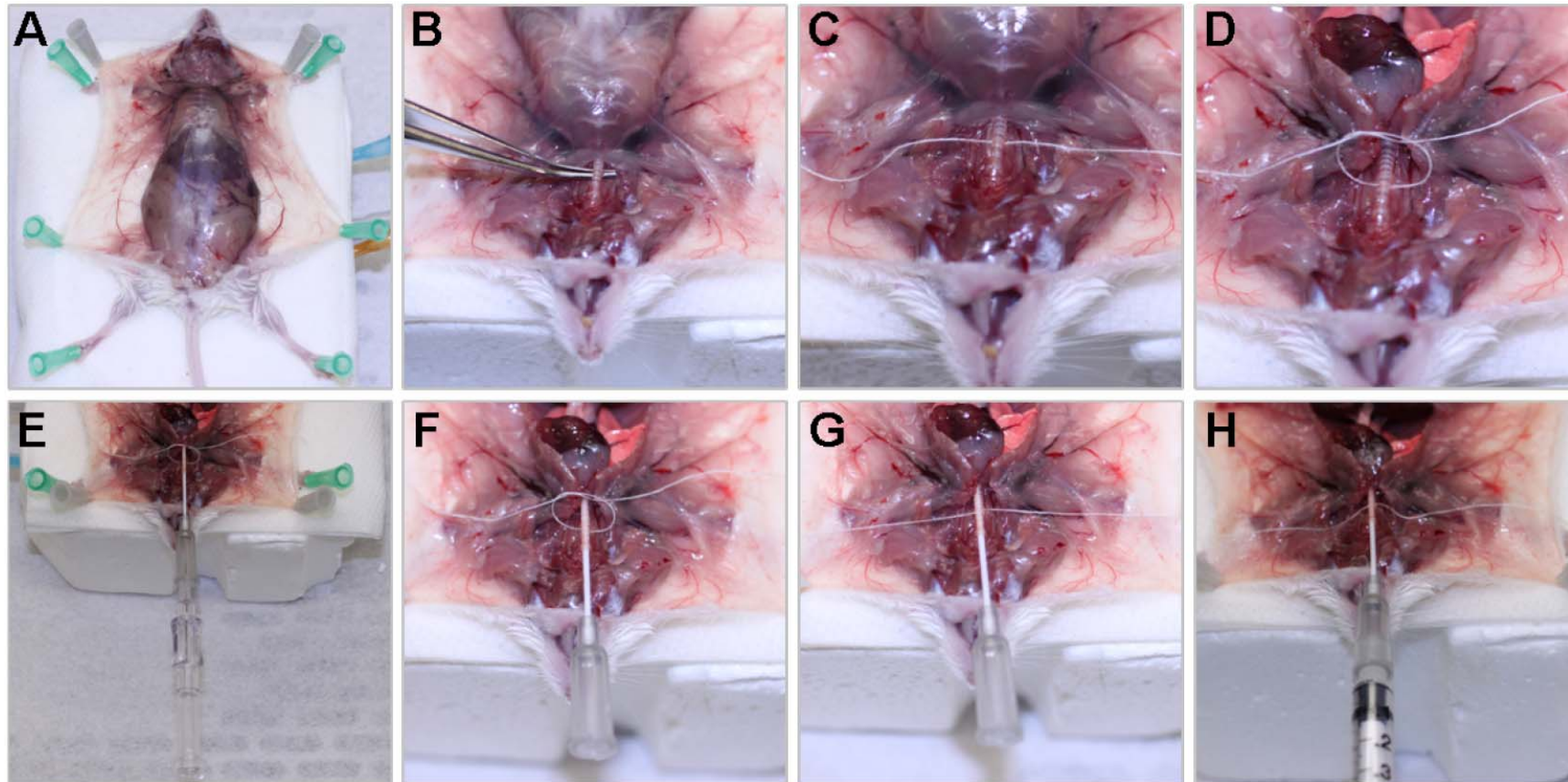
7 campagnols roussâtres
des **Ardennes**
(positifs)



**Lavages broncho-
alvéolaires**
(4 campagnols roussâtres)

Autopsies
(3 campagnols roussâtres)

Lavages broncho-alvéolaires



Sun et al., 2017

Quantification de l'ARN PUUV dans les LBA

LBA → Extraction ARN → qRT-PCR

	LBA
J05.Ard	Echec
K19.Ard	-
E05bis.Ard	32,02
E13.Ard	31,465

Tableau 1 : Détection de l'ARN PUUV dans les lavages broncho-alvéolaires de campagnols roussâtres des Ardennes infectés naturellement. - : échantillons négatifs; NT : non testés (non prélevés). Les résultats sont donnés en cycle threshold (Ct).

Quantification de l'ARN PUUV dans les LBA

LBA → Extraction ARN → qRT-PCR

	LBA	Poumons
J05.Ard	Echec	NT
K19.Ard	-	NT
E05bis.Ard	32,02	NT
E13.Ard	31,465	17,815

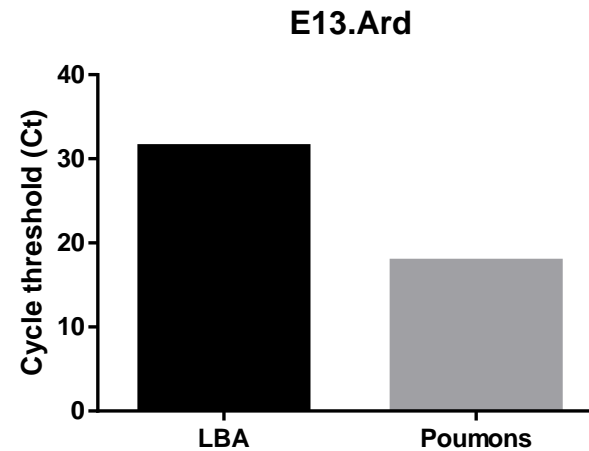


Tableau 1 : Détection de l'ARN PUUV dans les lavages broncho-alvéolaires de campagnols roussâtres des Ardennes infectés naturellement. - : échantillons négatifs; NT : non testés (non prélevés). Les résultats sont donnés en cycle threshold (Ct).

- Technique réalisable sur les campagnols
- **Détection de PUUV dans les LBA**

Quantification de l'ARN PUUV dans les organes et excréta

Autopsies → Broyage des organes → Extraction ARN → qRT-PCR

Région	Individus	Sexe	Statut Sérologique	Poumons	Foie	Rein	Glandes Salivaires	Vessie	Salive	Fèces
Ardennes	C03	Mâle	+	1,41E+09	3,38E+07	1,05E+09	Doute	Tube vide	+	2,27E+06 (Fèces seul)
	E13bis	Femelle	+	4,30E+10	1,26E+09	1,00E+09	3,14E+08	2,73E+07	+	2,35E+09 (Fèces + Fèces Rectum)
	J11	Femelle	+	1,02E+07	-	2,64E+06	2,18E+05	-	-	- (Fèces + Fèces Rectum)
	E05bis	Mâle	+	NT	NT	NT	NT	NT	+	1,61E+06 (Fèces seul)

Tableau 2 : Détection de l'ARN PUUV au cours du temps dans les organes et les excréta de campagnols roussâtres infectés naturellement par qRT-PCR. - : échantillons négatifs ; + : échantillons positifs ; NT : non testé. Les résultats obtenus sont donnés en copies ARN/mg. Les échantillons d'urine d'E13bis et J11 ne possédaient respectivement que quelques gouttes d'urine ou le tube était vide/sec.

- Détection de PUUV dans l'ensemble des organes et prélèvements
 - Charge virale principale = poumons = site de réplication PUUV
 - Virus détecté dans les organes excréteurs et les excréta

II- La variabilité génétique spatiale de PUUV est-elle associée à une différence de capacité de transmission entre les campagnols ou à la différence de répllication/excrétion dans ce réservoir ?

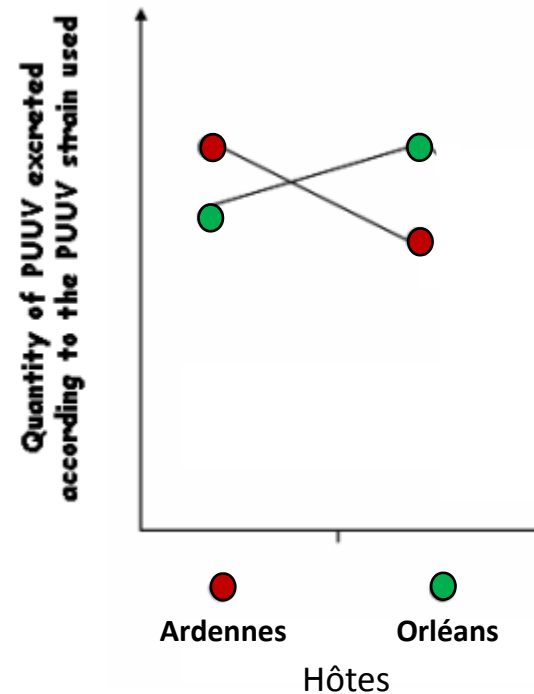
Démarche scientifique

➤ Expérimentations animales croisées

		Souches PUUV	
		Ardennes	Orléans
Hôtes	Ardennes	Expérimentation n°1	Expérimentation n°2
	Orléans	Expérimentation n°1	Expérimentation n°2

➤ Résultats attendus

Hypothèse :
Adaptation du virus à son hôte.



Protocole

Infection de campagnols roussâtres d'Orléans et des Ardennes par PUUV (Souche Ardennes)

Orléans



N = 15

Ardennes



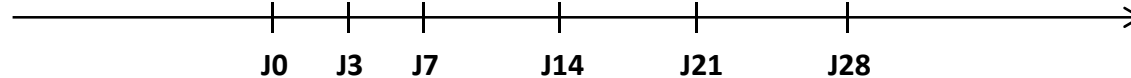
N = 15

Critères :

- Mâles
- Adultes
- Non infectés

Protocole

Infection par PUUV
(Souche Ardennes)
($7 \cdot 10^3$ pfu/mL)



Sacrifice de deux/trois individus par localité à chaque temps de la cinétique

Protocole

Infection de campagnols roussâtres d'Orléans et des Ardennes par PUUV (Souche Ardennes)

Orléans



N = 15

Ardennes



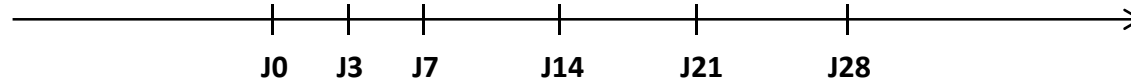
N = 15

Critères :

- Mâles
- Adultes
- Non infectés

Protocole

Infection par PUUV
(Souche Ardennes)
(7.10^3 pfu/mL)



Sacrifice de deux/trois individus par localité à chaque temps de la cinétique

Prélèvements

A chaque temps, pour tous les campagnols :

Prise de sang
rétro-orbitaire



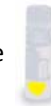
Salive



Fèces



Urine



A chaque temps, pour les campagnols euthanasiés



Reins



Rate



Foie



Poumons



Système
digestif

+ Glandes salivaires
+ Vessie
+ Rectum

Protocole

Infection de campagnols roussâtres d'Orléans et des Ardennes par PUUV (Souche Ardennes)

Orléans



N = 15

Ardennes



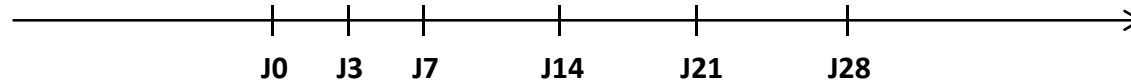
N = 15

Critères :

- Mâles
- Adultes
- Non infectés

Protocole

Infection par PUUV
(Souche Ardennes)
(7.10^3 pfu/mL)



Sacrifice de deux/trois individus par localité à chaque temps de la cinétique

Prélèvements

A chaque temps, pour tous les campagnols :

ELISA

Prise de sang
rétro-orbitaire



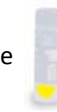
Salive



Fèces



Urine



qRT-PCR

A chaque temps, pour les campagnols euthanasiés



Reins



Rate



Foie



Poumons



Système
digestif

+ Glandes salivaires
+ Vessie
+ Rectum

Résultats

Orléans

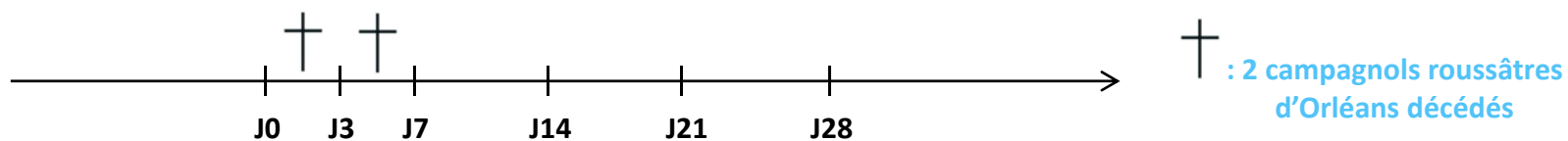


13 campagnols roussâtres

Ardennes



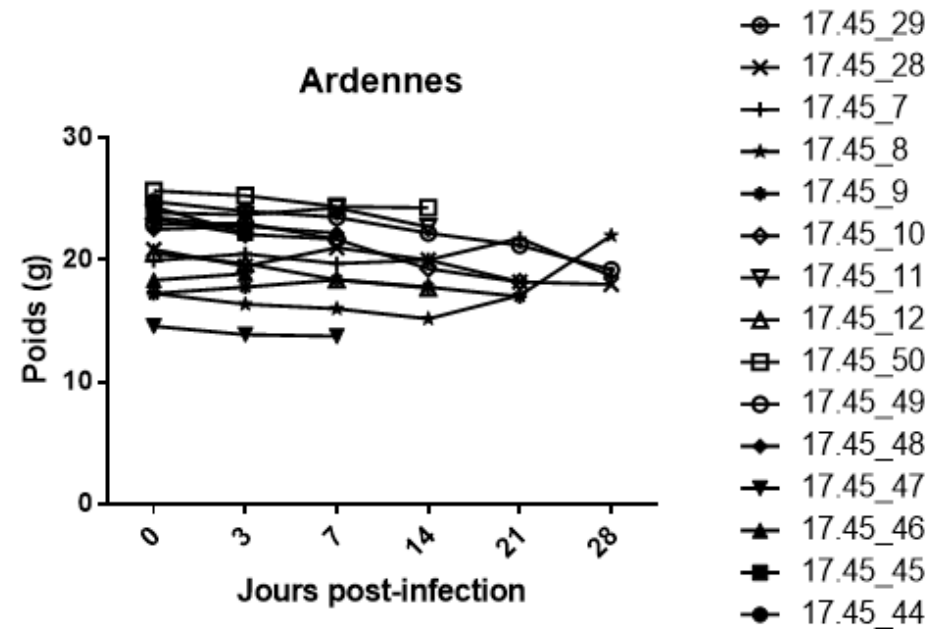
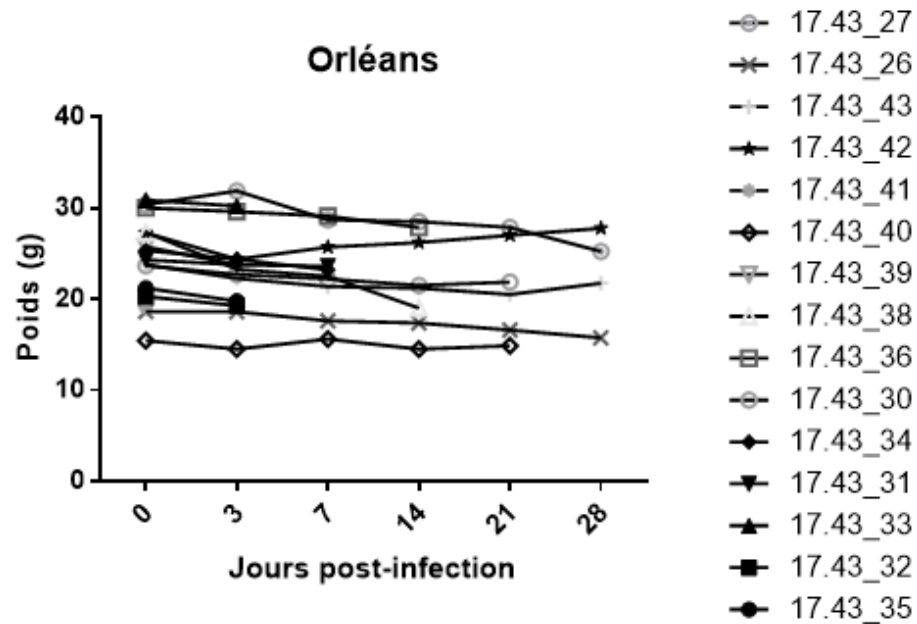
15 campagnols roussâtres



	J3	J7	J14	J21	J28	Témoins
Orléans	17.43_35 17.43_32 17.43_33	17.43_31 17.43_34	17.43_36 17.43_38	17.43_30 17.43_40	17.43_42 17.43_43	17.43_26 17.43_27
Ardennes	17.45_44 17.45_45 17.45_46	17.45_47 17.45_48 17.45_49	17.45_50 17.45_12 17.45_11	17.45_10 17.45_9	17.45_8 17.45_7	17.45_28 17.45_29

Suivi clinique

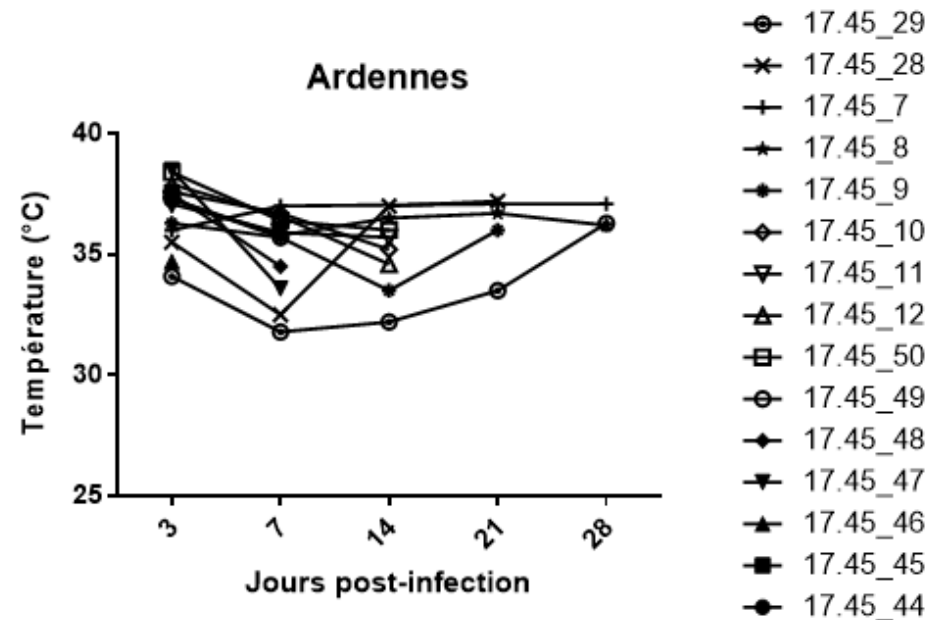
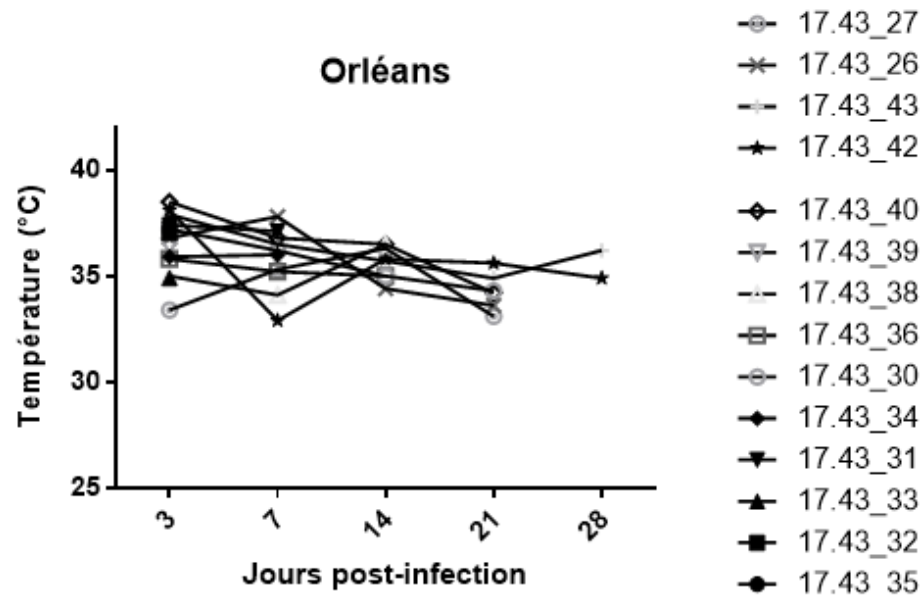
Poids



→ Aucune variation du poids au cours du temps

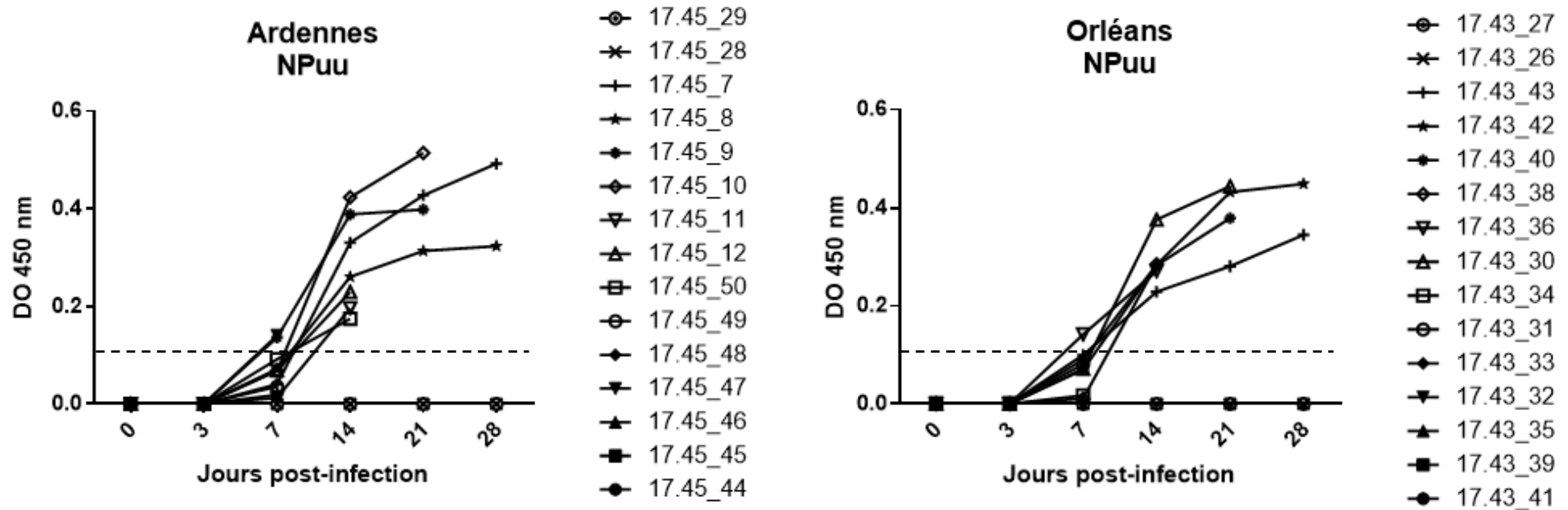
Suivi clinique

Température



→ Pas de variation de la température au cours du temps

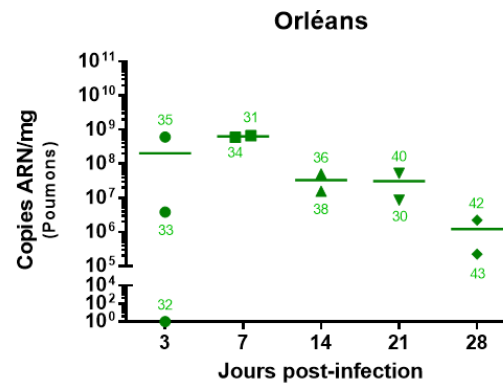
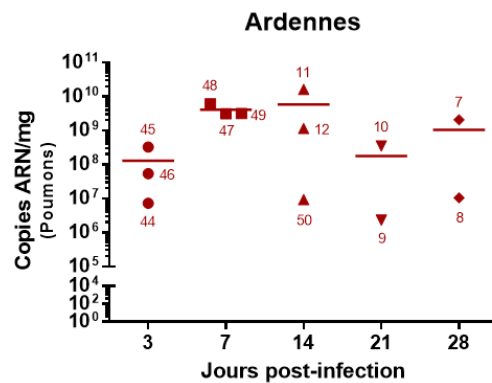
Réponse anticorps anti-PUUV



- Tous les campagnols (excepté les témoins) ont séroconverti après 14 jours.
→ Infectés par la souche Ardennes de PUUV
- Cinétique et DO comparables dans les 2 populations de campagnols

Distribution du virus dans les organes et excréta des campagnols

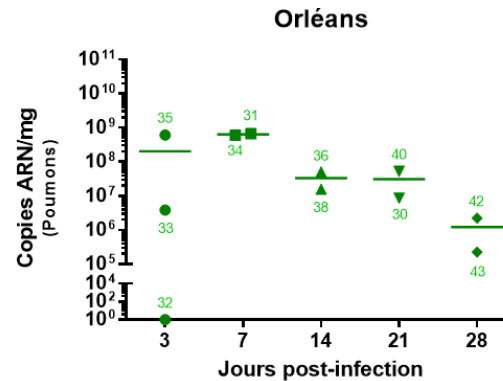
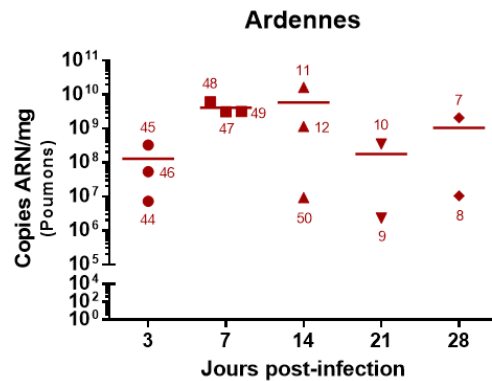
Poumons



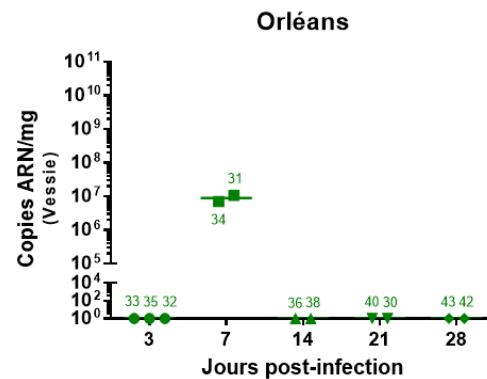
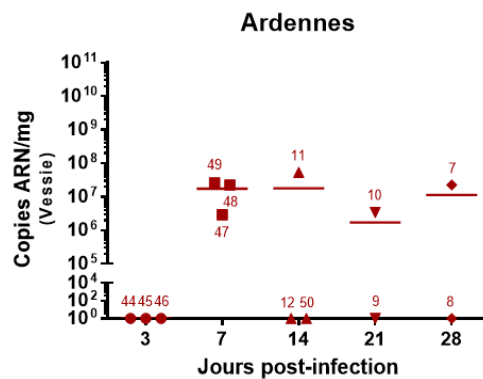
- Détection du virus dès J3 et Augmentation de la charge virale à J7
- **Ardennes** : Charge virale plus importante qu'Orléans à partir de J14, plus forte variabilité inter-individuelle à partir de J14, pas de décroissance de la charge virale après J14.
- **Orléans** : Décroissance de la charge virale après J7

Distribution du virus dans les organes et excréta des campagnols

Poumons



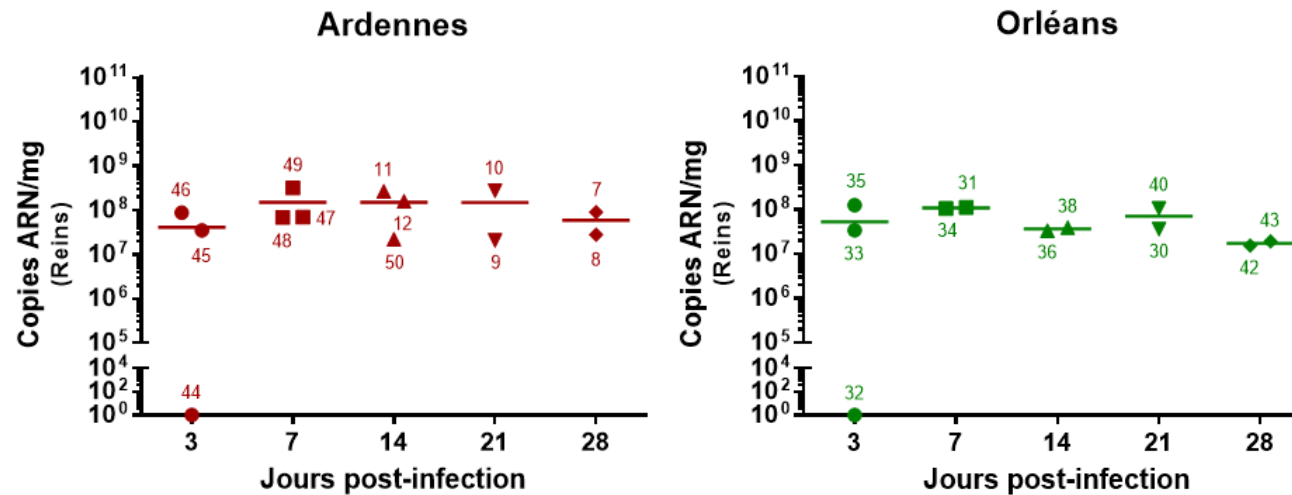
Vessie



- Pas de virus détecté à J3 et augmentation de la charge virale à J7 au même niveau pour les deux populations
- **Ardennes** : Pas de décroissance de la charge virale après J7
- **Orléans** : Pas de détection d'ARN PUUV après J7

Distribution du virus dans les organes et excréta des campagnols

Reins



→ Pas de différence de cinétique et de charge virale PUUV dans les autres organes étudiés, entre les campagnols d'Orléans et des Ardennes.

Conclusion

Comparaison des patrons observés en infections naturelles et infections expérimentales

Population de campagnols roussâtres étudiée	Infections naturelles	Infections expérimentales : Souche Ardennes
	Ardennes	Ardennes et Orléans
Détection de l'ARN PUUV	Organes, sérum et excréta (sauf urine)	Organes et sérum (J3 à J7)

Nos infections expérimentales reproduisent-elles bien les infections naturelles ?
(Mode d'inoculation, dose infectieuse)

Y-a-t-il production de protéines virales ? Formation de virions ?
Ou l'excrétion du virus est-elle plus tardive (> 1 mois) ?

Perspectives :

- Western Blot → Détection des protéines virales
- Titrage à partir des poumons → Y-a-t-il production de particules infectieuses ?

Conclusion

Sensibilité des campagnols des Ardennes et d'Orléans suite à l'infection par la souche Ardennes PUUV

Population de campagnols roussâtres étudiée	Infections expérimentales : Souche Ardennes	
	Ardennes	Orléans
Réponse anticorps anti-PUUV	Identique	
Détection de l'ARN PUUV	Organes et Sérum (J3 et J7)	
Variabilité inter-individuelle	Réponse hétérogène suite à l'infection	Réponse plus homogène suite à l'infection

→ **Les campagnols des Ardennes et d'Orléans sont sensibles à l'infection par la souche Ardennes de PUUV.**

→ **Ardennes : Animaux hyper-sécréteurs ?**

Conclusion

Adaptation locale de la souche Ardennes de PUUV ?

- Réplication plus durable dans les poumons pour les campagnols des Ardennes.
- Réplication plus durable dans la vessie pour les campagnols des Ardennes : meilleure excrétion dans les urines ?

→ Meilleure fitness du virus pour le croisement

Ardennes * Ardennes

Perspectives :

- Expérimentation n°2 : Etude de la souche Orléans (Automne 2018)

Remerciements

ANSES, Lyon

Unité Virologie

Philippe Marianneau

Séverine Murri

Johann Vulin

Sandra Lacote

Tiphany Chrun

Unité PFEA

Coralie Pulido

Rabah Belkheir

Emilie Antier

Latifa Lakhdar



Merci pour votre attention !

CBGP, Montpellier

Nathalie Charbonnel

Guillaume Castel

Maxime Galan

Caroline Tatard

Anne Loiseau

Laure Benoit

Sylvain Piry





2 sessions de capture (Octobre 2017) :

Orléans: 18 campagnols

Ardennes : 29 campagnols

↓
 Prise de sang au sinus rétro-orbitaire
 Prélèvements de salive, fèces, urine
 Mesure du poids, de la température et de la taille

↓
 Analyses sérologiques et de biologie moléculaire (qRT-PCR)

↙
 Rongeurs séropositifs et
 qRT-PCR +

↘
 Rongeurs séronégatifs et
 qRT-PCR -

Quarantaine

	Début de quarantaine		Fin de quarantaine	
	Orléans	Ardennes	Orléans *	Ardennes *
Négatifs	18	22	16	18
Positifs	0	7	0	10 **

* **Orléans** : 2 campagnols morts ; **Ardennes** : 1 campagnol mort

** 4 campagnols ont séroconvertis ou sont devenus qRT-PCR +

Typage et Sexage

Orléans



N = 13

Ardennes

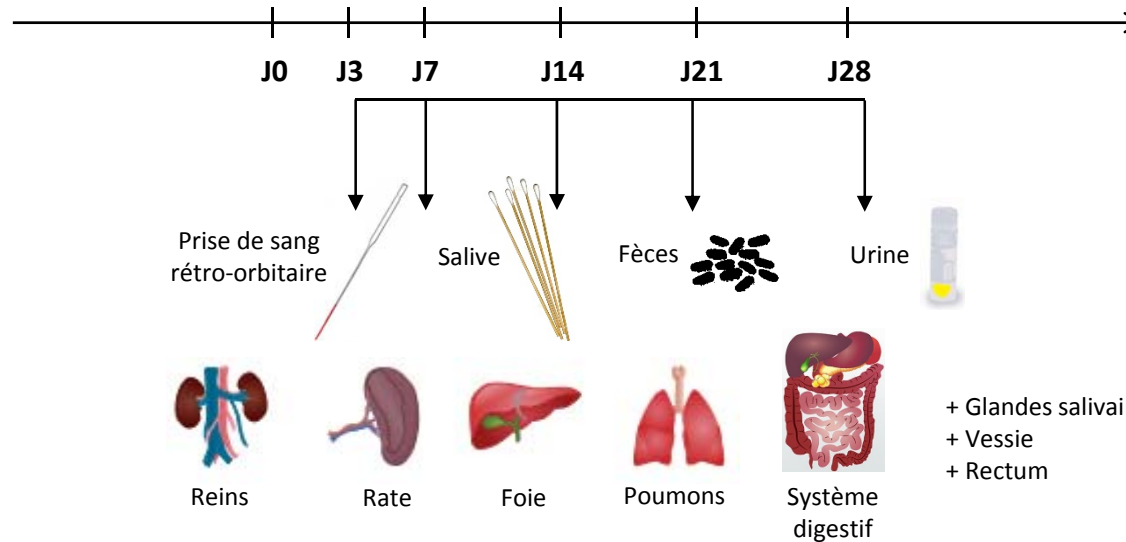


N = 15

➤ Typage : PCR à partir de l'ADN extrait des culots sanguins.
Confirmation de l'espèce → *Myodes glareolus*

➤ Sexage : Identification visuelle.
Confirmation par PCR mais protocole non reproductible
(ADN extrait du culot sanguin et foie) → **Absence de résultats.**

Infection par PUUV
(Souche Ardennes)
($7 \cdot 10^3$ pfu/mL)

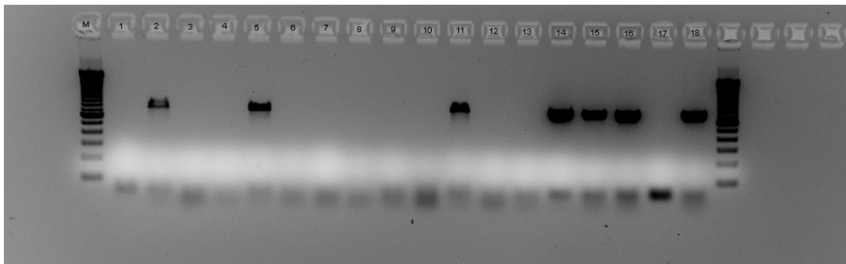


Typage

Culots sanguins → Extraction ADN → PCR
(Amplification du gène codant pour Cyt.C Oxidase subunit 1)

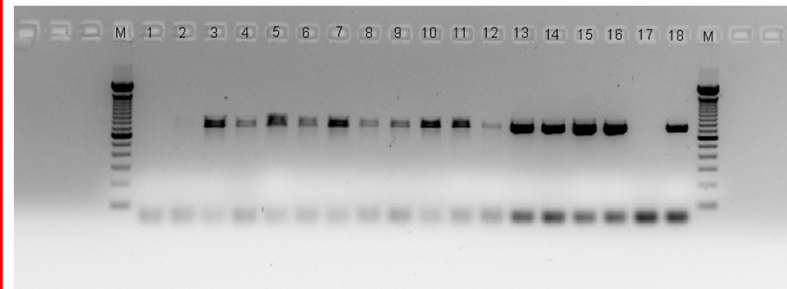
Deux conditions utilisées :

- Quantité ADN = 5 µL (pur)



(Exemple des campagnols des Ardennes)

- Quantité ADN = 5 µL (dilué au 10ème)



↓
Séquençage

→ Confirmation de l'espèce : *Myodes glareolus*

Sexage

Test n°1

Culots sanguins → Extraction ADN → PCR
(Amplification des gènes ZFX/ZFY → Mâle et Femelle)
(Amplification du gène SRY → Mâle)

Conditions utilisées :

- Quantité d'ADN = 1 µL
 - Quantité d'ADN = 5 µL
- **Pas de résultats**

Test n°2

Foie → Extraction ADN → PCR
(Amplification des gènes ZFX/ZFY → Mâle et Femelle)
(Amplification du gène SRY → Mâle)

Conditions utilisées :

- Quantité d'ADN = 1 µL
- **Pas de résultats**

Test n°3

Comparaison avec les primers d'Adélaïde : à partir d'ADN extraits des culots sanguins et du foie

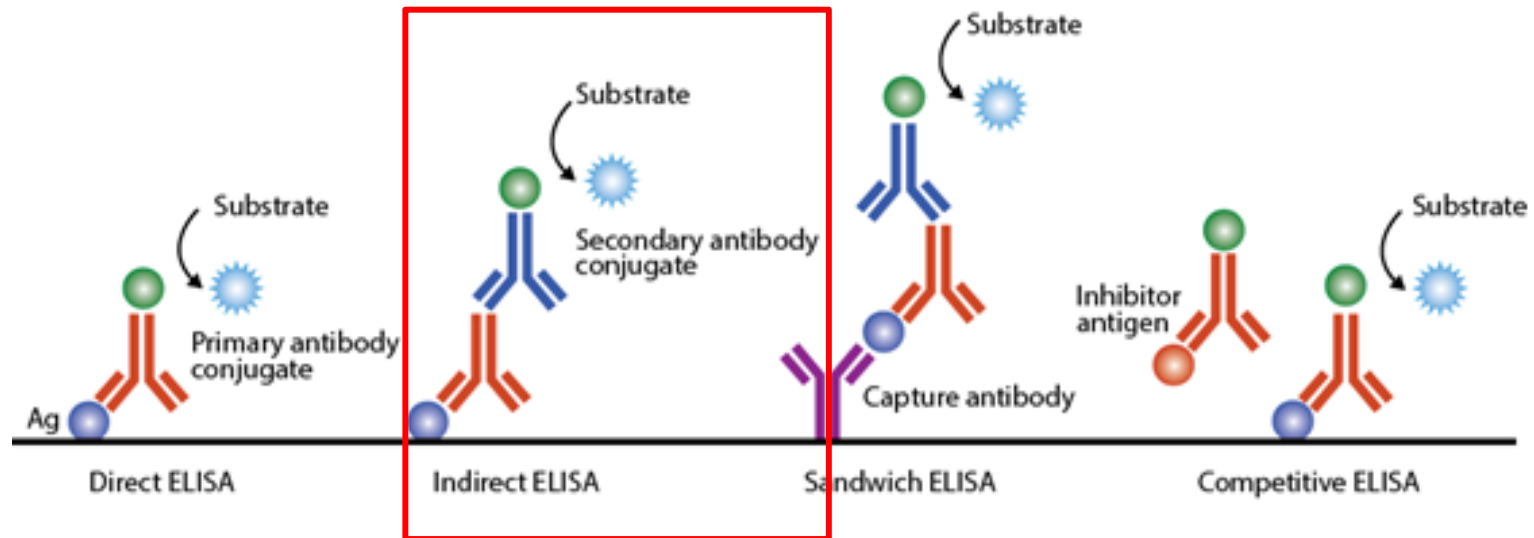
Conditions utilisées :

- Quantité d'ADN = 1 µL (pur)
 - Quantité d'ADN = 1 µL (dilué au 10^{ème})
- **Pas de résultats**

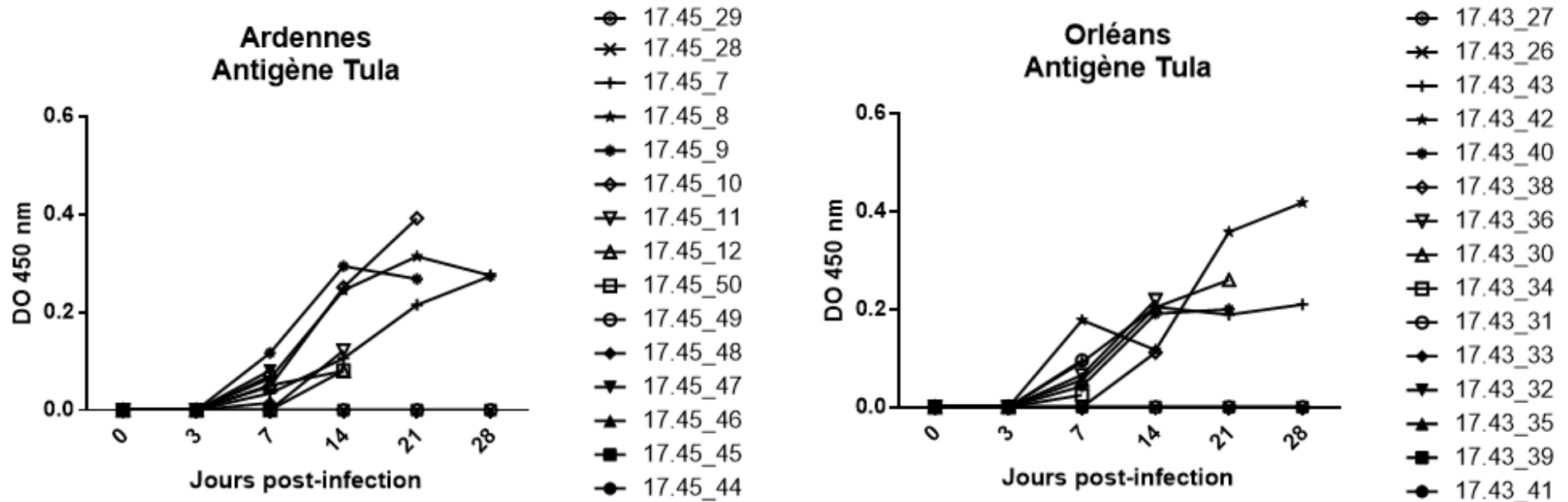
ELISA

Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

= technique immuno- enzymatique permettant de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorimétrique.



Réponse anticorps anti-PUUV



→ Résultats confirmés avec l'antigène Tula