

# Diversité et évolution de l'Orthohantavirus Puumala en France

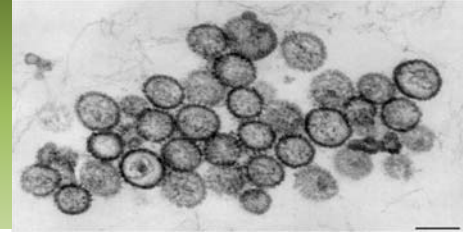
Guillaume Castel – CBGP

16 mars 2021





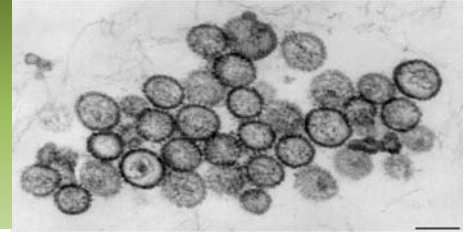
# Sommaire



- Introduction
- 1<sup>ère</sup> partie - Circulation et diversité de PUUV en France
- 2<sup>ème</sup> partie - Etudes des souches françaises en conditions expérimentales
- Conclusion et études en cours et à venir



# Introduction



## Historique - Orthohantavirus

- **1951-1954** : Guerre de Corée
  - Korean Hemorrhagic Fever
  - 3000 soldats (10-15% mortalité)
- **Virus Hantaan isolé en 1976 (*Apodemus agrarius*)**  
(Lee et al 1977)



Rivière Hantan © Municipalité de Pocheon

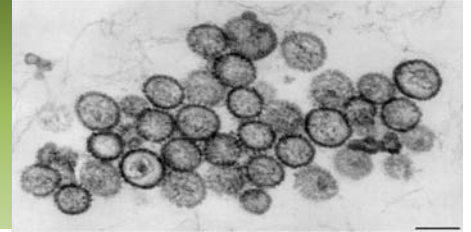


**Mulot rayé**  
(*Apodemus agrarius*)

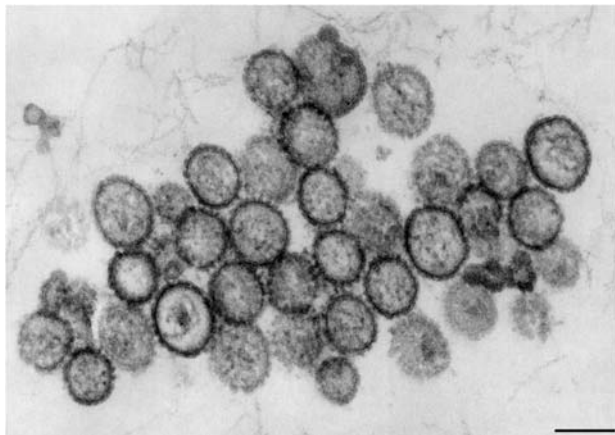




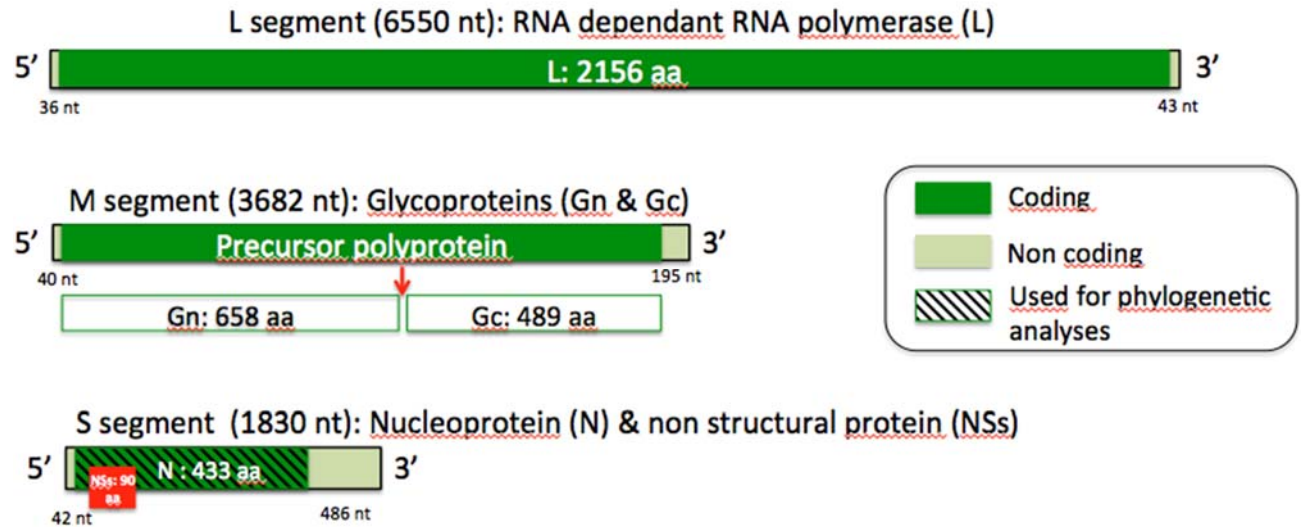
# Introduction



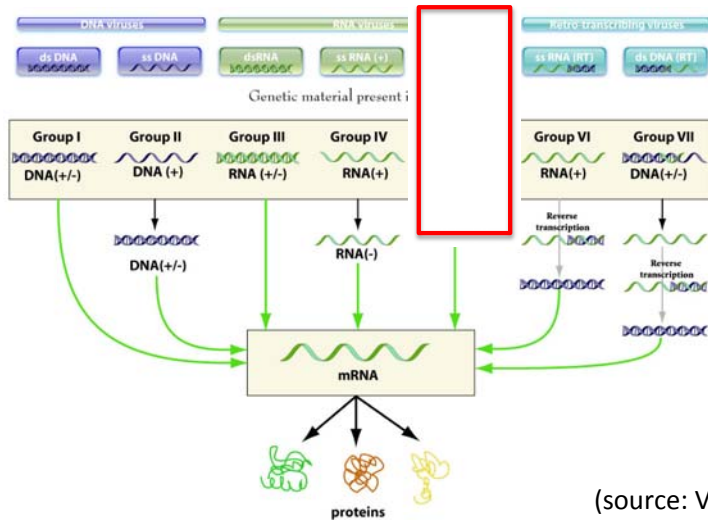
- ✓ Ordre : *Bunyavirales*
- ✓ Famille : *Hantaviridae*
- ✓ Genre : OrthoHantavirus



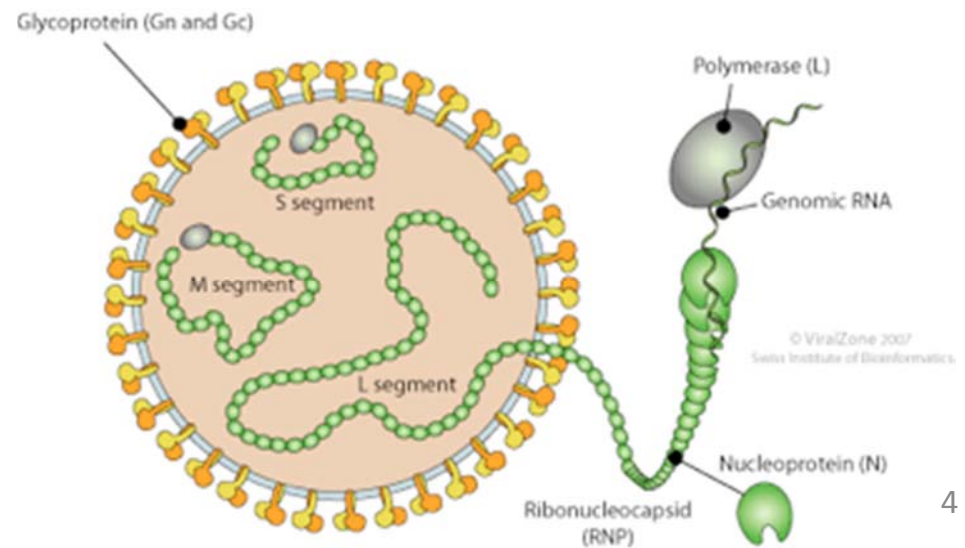
## Les Orthohantavirus



## Classification de Baltimore des virus

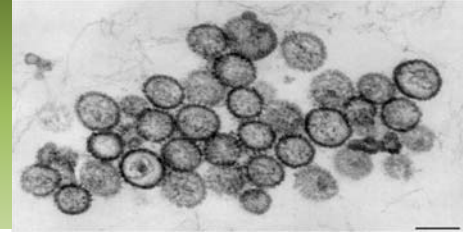


(source: ViralZone)





# Introduction



Réservoirs:

- Rongeurs
- Insectivores
- Chauves souris

Le virus Puumala (PUUV) → Néphropathie épidémique (HFRS)



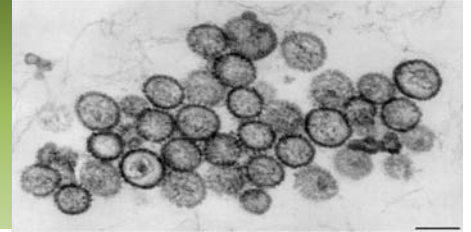
Nouveau Monde  
Syndromes Cardio-  
pulmonaires (HCPS)

Ancien Monde  
Fièvres hémorragiques à  
syndrome rénaux (HFRS)





# Introduction

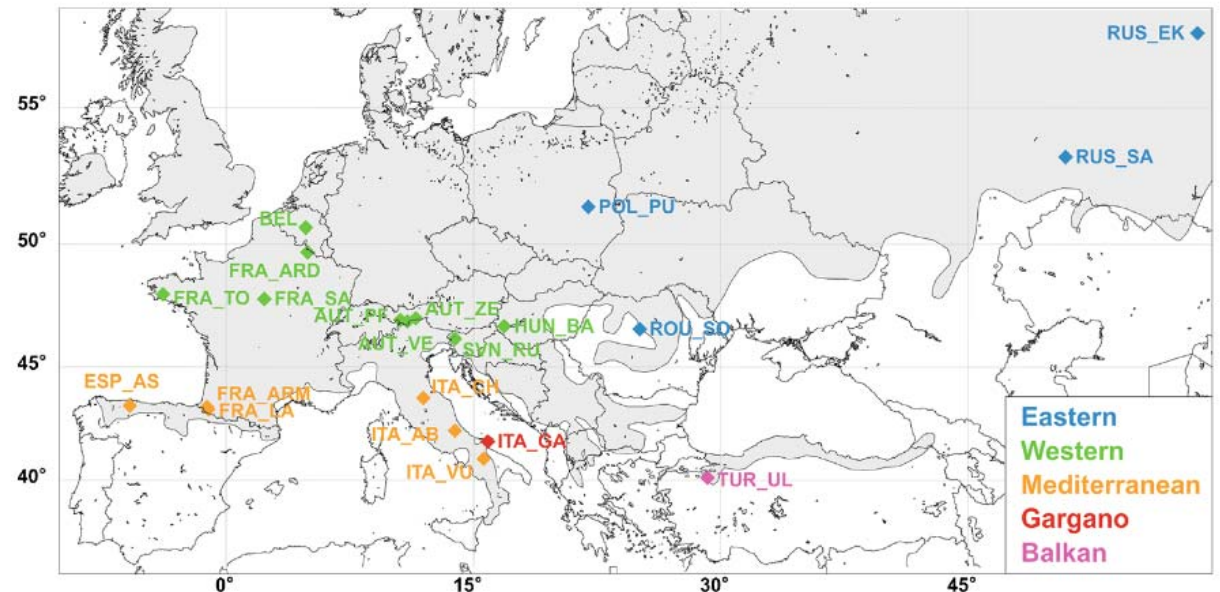


Réservoir sauvage: Le campagnol roussâtre (*Myodes glareolus*)



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

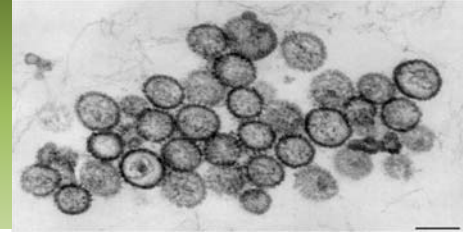
- ✓ Milieu forestier
- ✓ Très répandu dans toute l'Europe
- ✓ Présent partout en France sauf sur le pourtour méditerranéen
- ✓ Lignée « western » majoritairement présente en France



(Ledevin et al, 2018)

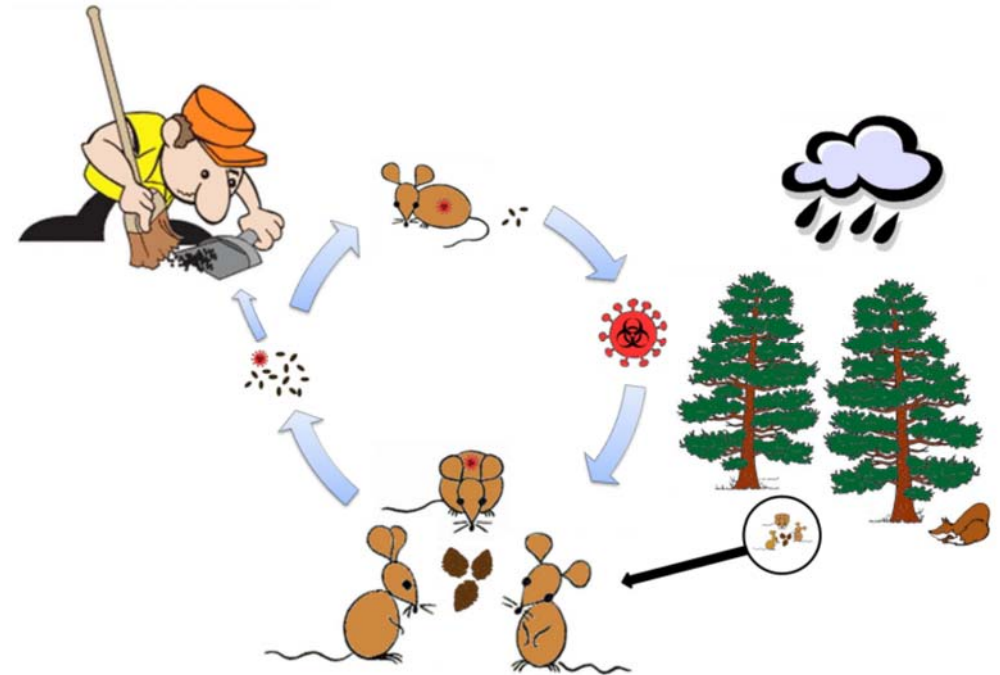


# Introduction



## Infection par PUUV

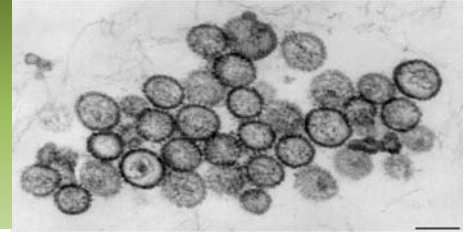
- ✓ Infections chroniques et asymptomatiques chez le campagnol roussâtre
- ✓ Néphropathie épidémique (Forme atténuée de fièvre hémorragique avec syndrome rénal) chez l'Homme
- ✓ Contamination humaine essentiellement par voie aérienne (aérosols de poussières contaminées par des excréments de campagnols infectés), par contact des muqueuses ou des lésions cutanées avec des matières infectieuses.
- ✓ taux de létalité estimé à 0,4%
- ✓ Touche les professions forestières, agricoles, le bâtiment, chasseurs...
- ✓ Pas de transmission interhumaine (hôte accidentel)



(Razzauti M., 2012)



# Introduction



## La Néphropathie épidémique (NE)

**Tableau II.** Manifestations cliniques et biologiques de l'infection à virus Puumala en Europe (d'après [1]).

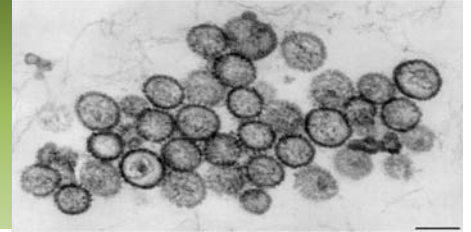
Symptômes	Prévalence (%)
Fièvre	97-100
Céphalées	62-90
Douleurs abdominales	64-75
Douleurs lombaires	63-82
Nausées/vomissements	33-83
Vertige	12-25
Purpura pétéchial	12
Hémorragies conjonctivales et rétinienes	0-7 [2]
Hémorragies internes	2
Hypotension (< 90/60 mmHg)	1-2
Myopie/vision trouble	10-36
Oligurie (< 0,5 l/j)	54-70
Polyurie (> 2 l/j)	97-100
Leucocytose	23-57
Thrombopénie	56-68
Protéinurie	84-100
Hématurie	58-85
Élévation de la créatinine (> 150 µmol/l)	90
Élévation des transaminases	41-60
Hémodialyse	5-7
Décès	0,01 [3]

- ✓ Symptômes pas dus directement à la réplication virale mais plutôt à une réponse immunitaire exacerbée
- ✓ Réponses pro-inflammatoires (production de cytokines, cytotoxique CD8+) excessives contre le virus en réplication.
- ✓ Tropicité pour l'endothélium vasculaire.
- ✓ Pas de traitements, pas de vaccins.

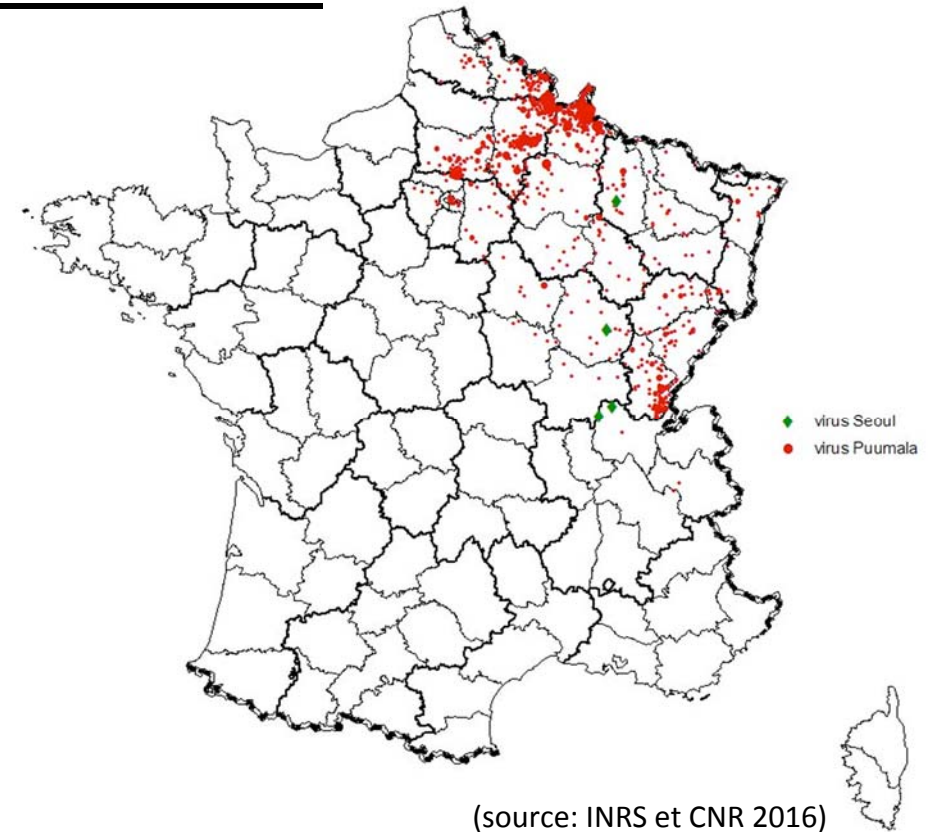




# Introduction



## Epidémiologie de la NE

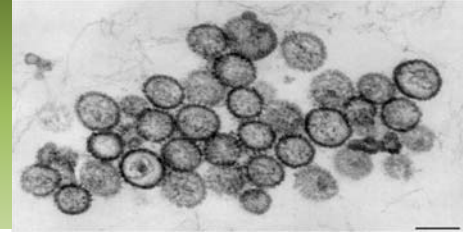


✓ En Europe, touche principalement les pays nordiques (plusieurs milliers de cas /an)

- ✓ En France, cas humains localisés dans le quart N.E
- ✓ Moyenne de 50 à 200 cas/an, dont environ 40 % dans le massif ardennais.



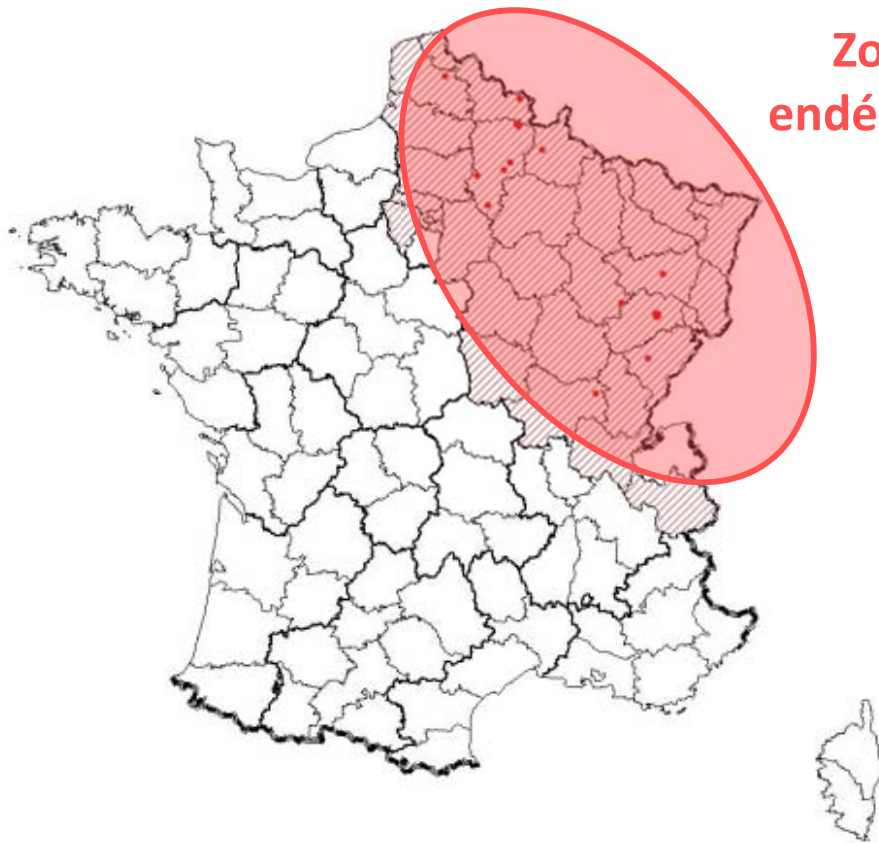
# Introduction



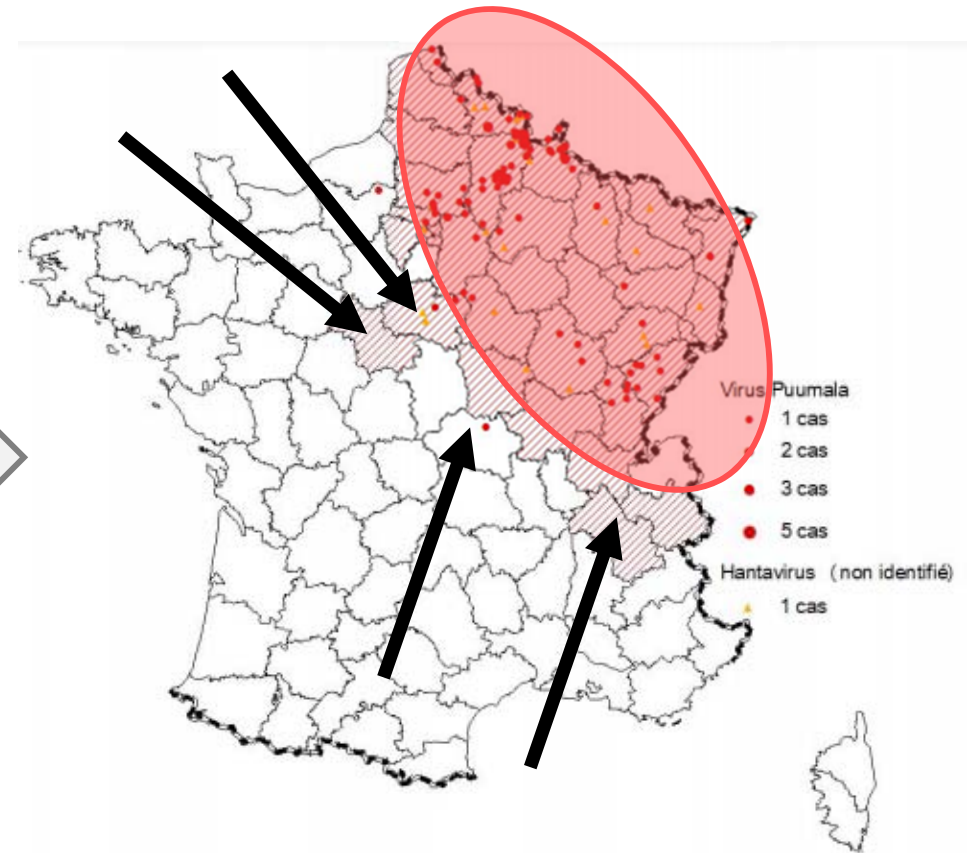
## Epidémiologie de la NE en France

2013

Zone  
endémique



2019

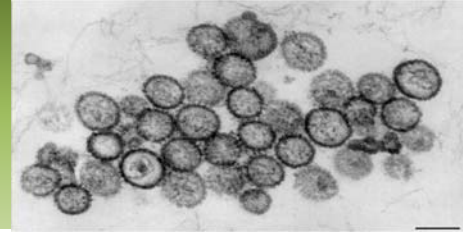


*CNR Hantavirus, rapport 2013 & 2019*

- Extension de la NE en France
- Nouveaux cas dans des zones non-endémiques pour la NE
- Manque de données chez les rongeurs dans ces zones



# Introduction



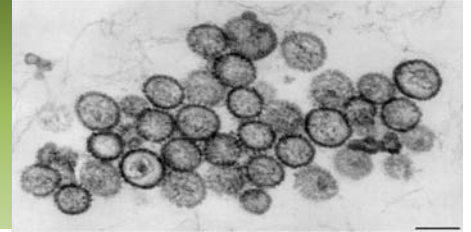
Questions :

- Comment le virus circule dans les populations de rongeurs en zone d'endémie et en zone non endémique ?
- Quelle est la diversité des souches de PUUV françaises ?
- Ont elles des phénotypes différents ?
- Comment expliquer l'épidémiologie de la NE en France ?

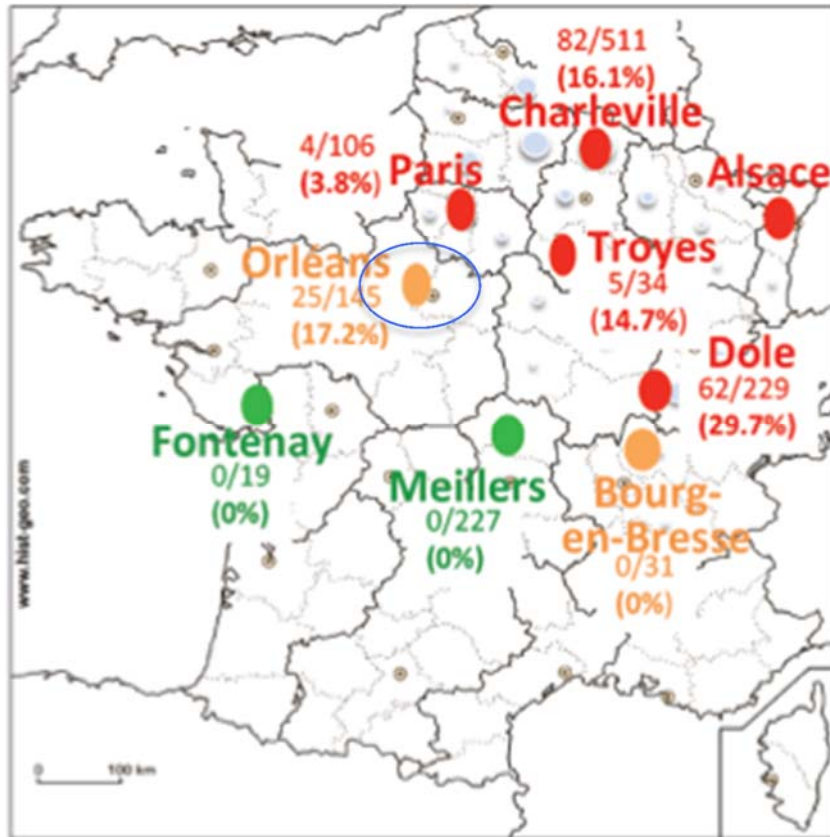




# 1) Circulation et diversité de PUUV en France



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



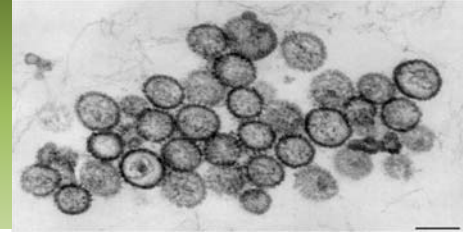
- Zone endémique
- Zone péri-endémique
- Zone non-endémique

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

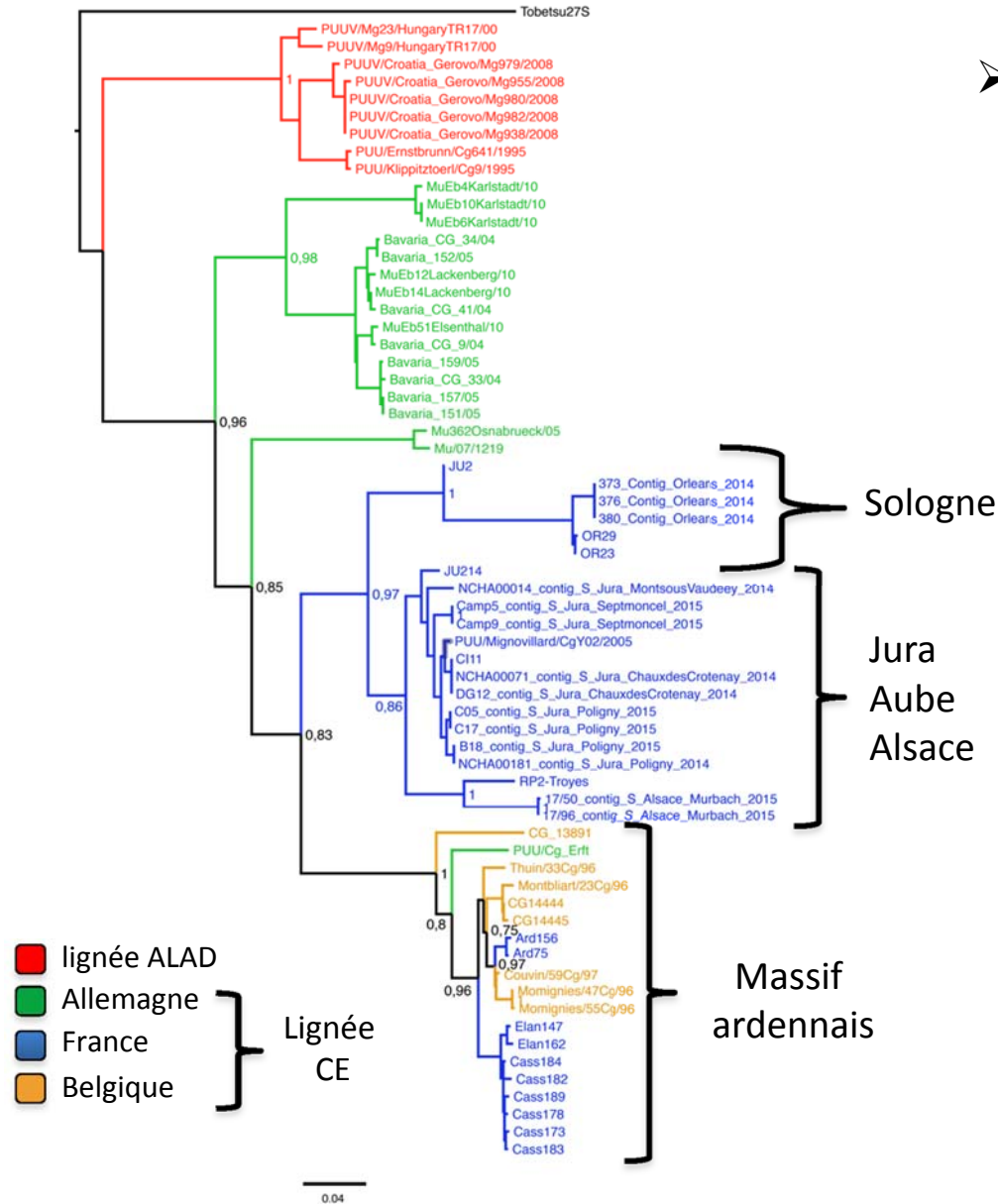
- Séroprévalence et charge virale élevée observées parmi les populations de campagnols dans une région (Sologne) sans aucun cas humain répertorié à l'époque (*Castel et al, 2015*).



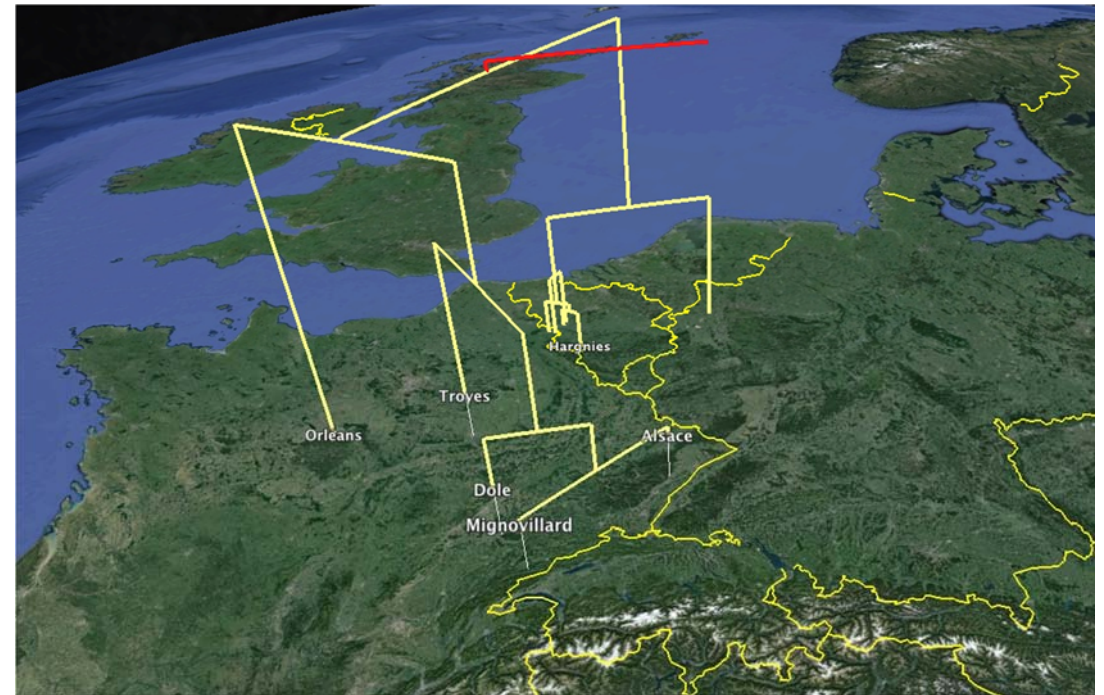
# 1) Circulation et diversité de PUUV en France



## Phylogénie des souches françaises

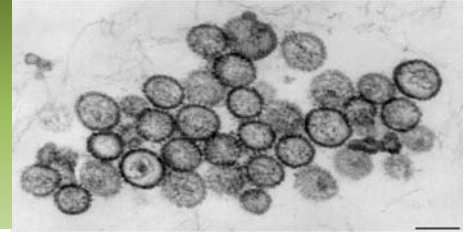


- Les souches françaises sont divisées en 3 clusters
  - les souches ardennaises (avec les belges)
  - les souches de Sologne
  - les souches de l'Est de la France





# 1) Circulation et diversité de PUUV en France



## Divergence des souches françaises

### % de divergence

(A)	Nucleotide																	
	S segment						M segment						L segment					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
[1] Ard156	*					*						*						
[2] Ard75	1*						1*						2*					
[3] OR23	13	13*					14	14*					11	12*				
[4] OR29	13	13	1*				14	13	2*				11	12	1*			
[5] JU2	12	12	7	7*			11	12	13	12*			10	10	9	9*		
[6] JU214	12	12	12	12	6*		11	12	13	12	1*		10	9	8	8	2*	

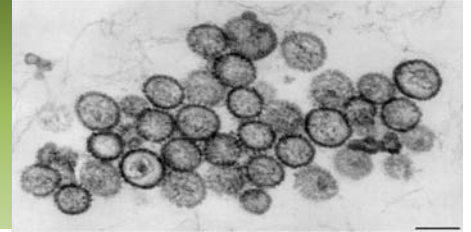
(B)	Amino acid																	
	S segment						M segment						L segment					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
[1] Ard156	*					*						*						
[2] Ard75	0*						1*						1*					
[3] OR23	3	3*					3	3*					3	3*				
[4] OR29	3	3	0*				3	3	1*				2	3	1*			
[5] JU2	2	2	2	2*			2	2	4	3*			2	2	2	2*		
[6] JU214	1	1	2	2	1*		2	3	4	3	1*		2	3	2	1	1*	

- Divergence importante entre les différents clusters
- Problèmes pour la détection par PCR et le séquençage (CNR des Hantavirus)





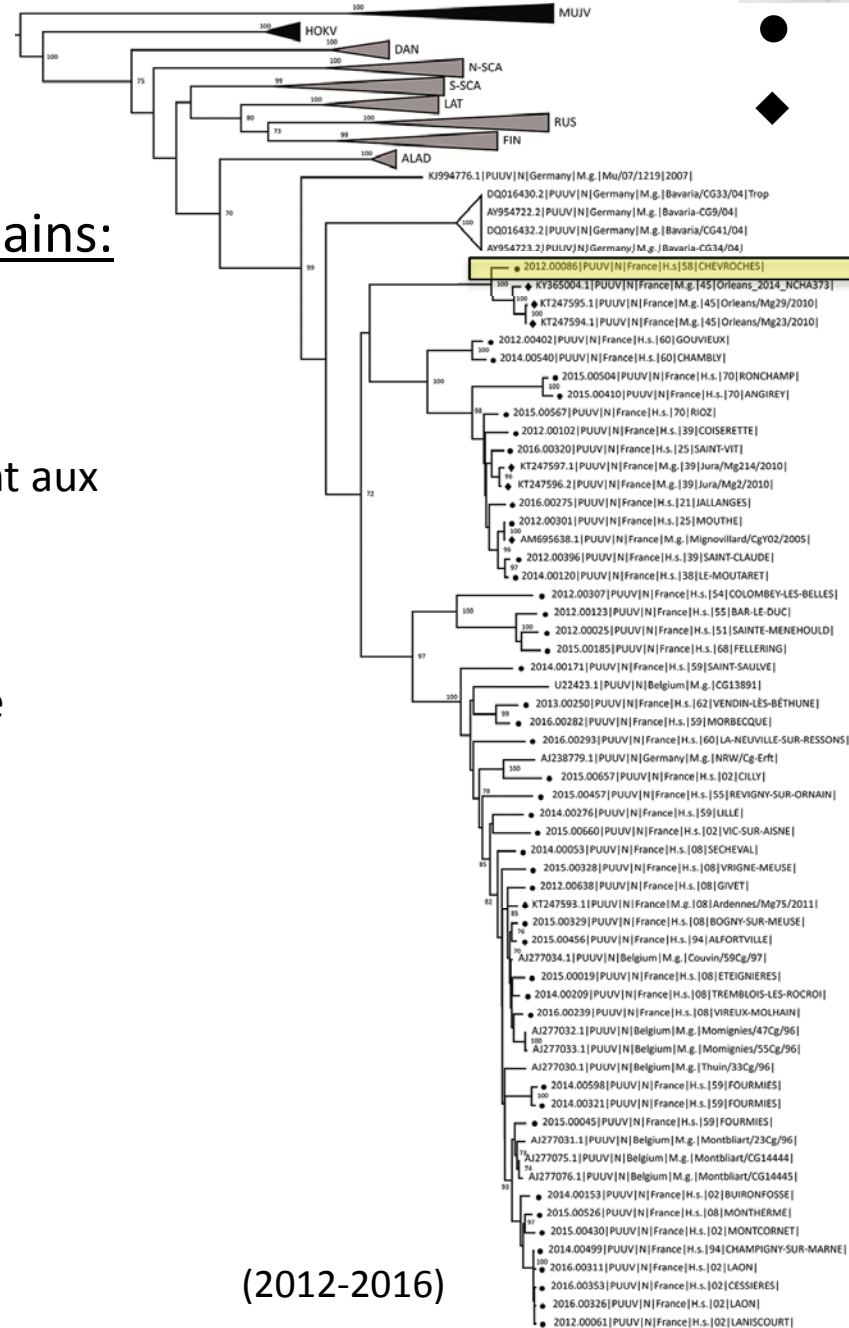
# 1) Circulation et diversité de PUUV en France



## Etude phylogénétique des isolats humains:

- Les isolats humains de PUUV correspondent aux isolats de campagnols locaux
- Un patient du Morvan présente les caractéristiques génétiques des souches de Sologne

(Reynes et al, 2019)



- humain
- ◆ campagnol

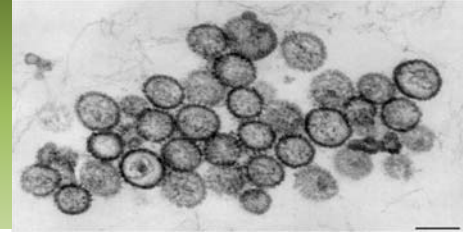
Sologne  
Jura  
Aube  
Alsace

A  
r  
d  
e  
n  
n  
e  
s

(2012-2016)



# 1) Circulation et diversité de PUUV en France



## Investigation en zones non-endémiques (projet PALADIN)

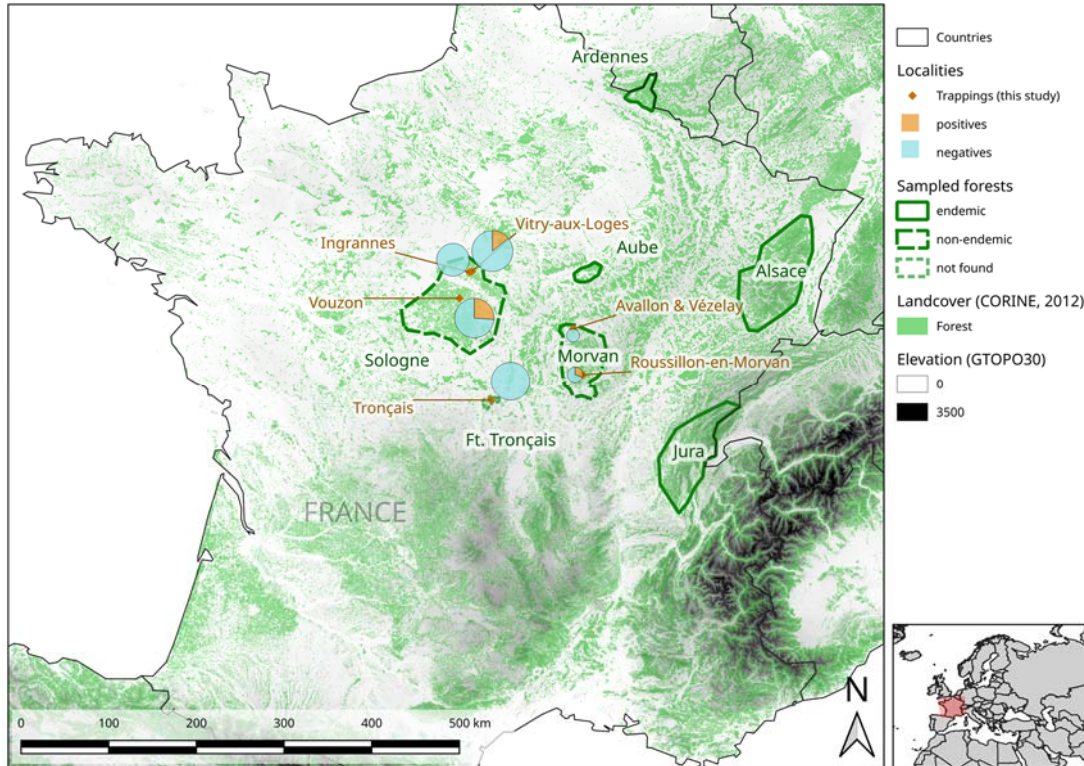


Table 1. Puumala virus (PUUV) seroprevalence at each sampling site. Number of seropositive bank voles that are also positives in qRT-PCR is indicated in parentheses.

Sampling Site	Geographic Coordinates	Forest	Sampling Period	Number Seropositive for PUUV/Number of Bank Voles Trapped	Number of Seropositive Bank Voles That Are Positive in qRT-PCR
Roussillon-en-Morvan	47.01° N, 4.07° E	Morvan (South)	September 2018	3/10	3/3
Avallon/Vézelay	47.47° N, 3.86° E	Morvan (North)	September 2018	0/2	-
Tronçais	46.66° N, 2.74° E	Tronçais	September 2019	0/62	-
Vouzon	47.66° N, 2.10° E	Sologne (South)	October 2019	17/65	17/17
Vitry aux Loges	47.96° N, 2.26° E	Sologne (North-East)	October 2019	10/70	10/10
Ingrannes	47.94° N, 2.21° E	Sologne (North-West)	October 2018	0/45	-

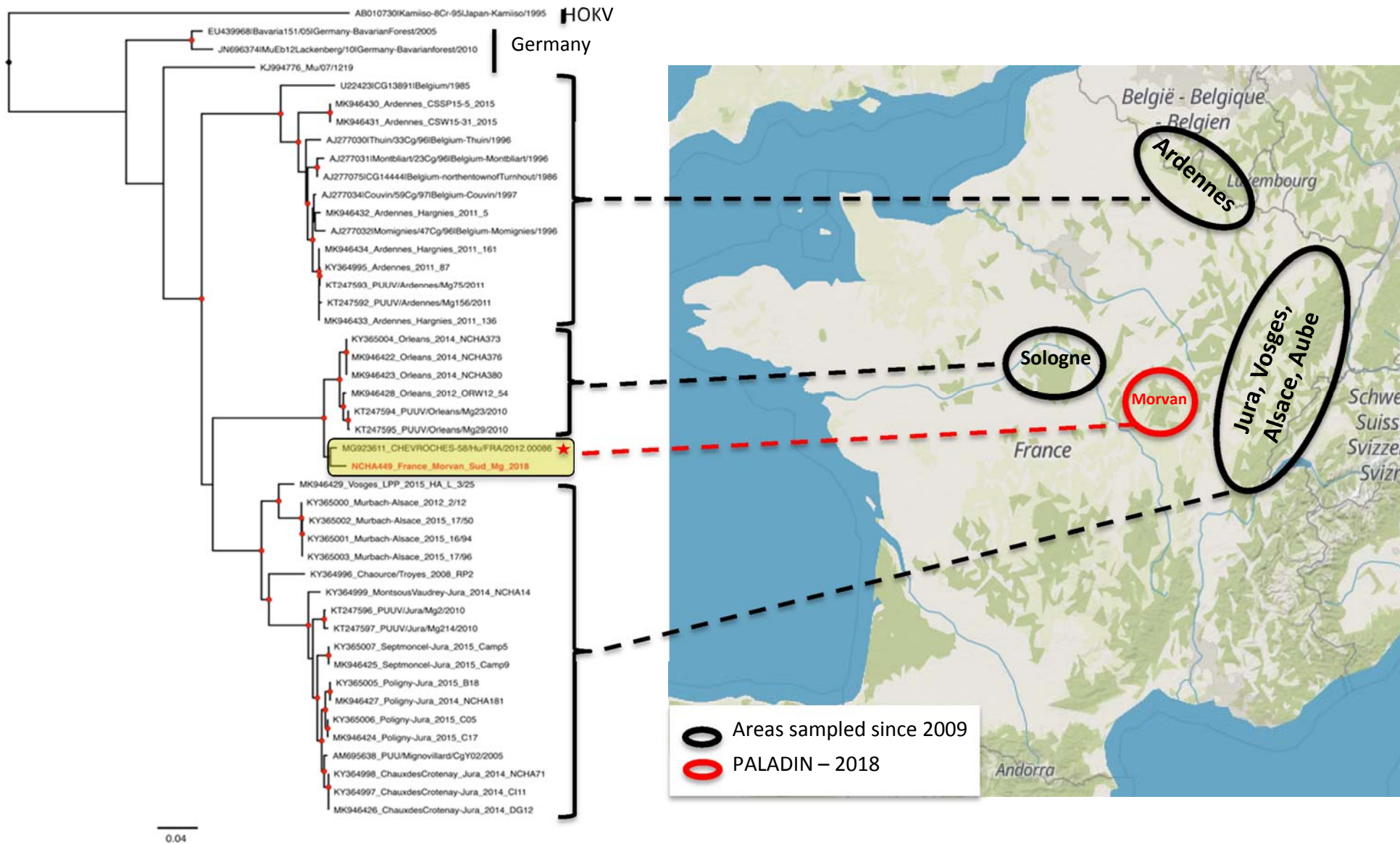
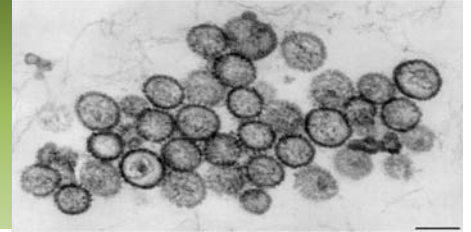
(Murri et al, 2020)

- Recherche du virus dans plusieurs zones non endémiques, proches de zones de circulation du virus ou présentant des cas humains récents.
- Détection du virus chez les populations de campagnols dans le massif du Morvan
- Pas de détection en forêts de Tronçais
- Confirmation d'une circulation soutenue du virus en Sologne





# 1) Circulation et diversité de PUUV en France

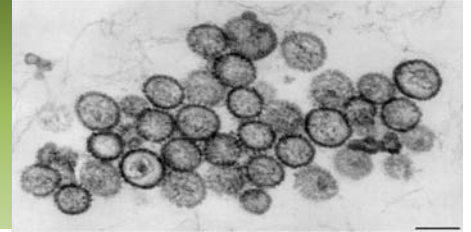


- Les souches issues du Morvan sont phylogénétiquement proches de celles de Sologne
- Elles correspondent à celle isolée chez un patient humain de cette région

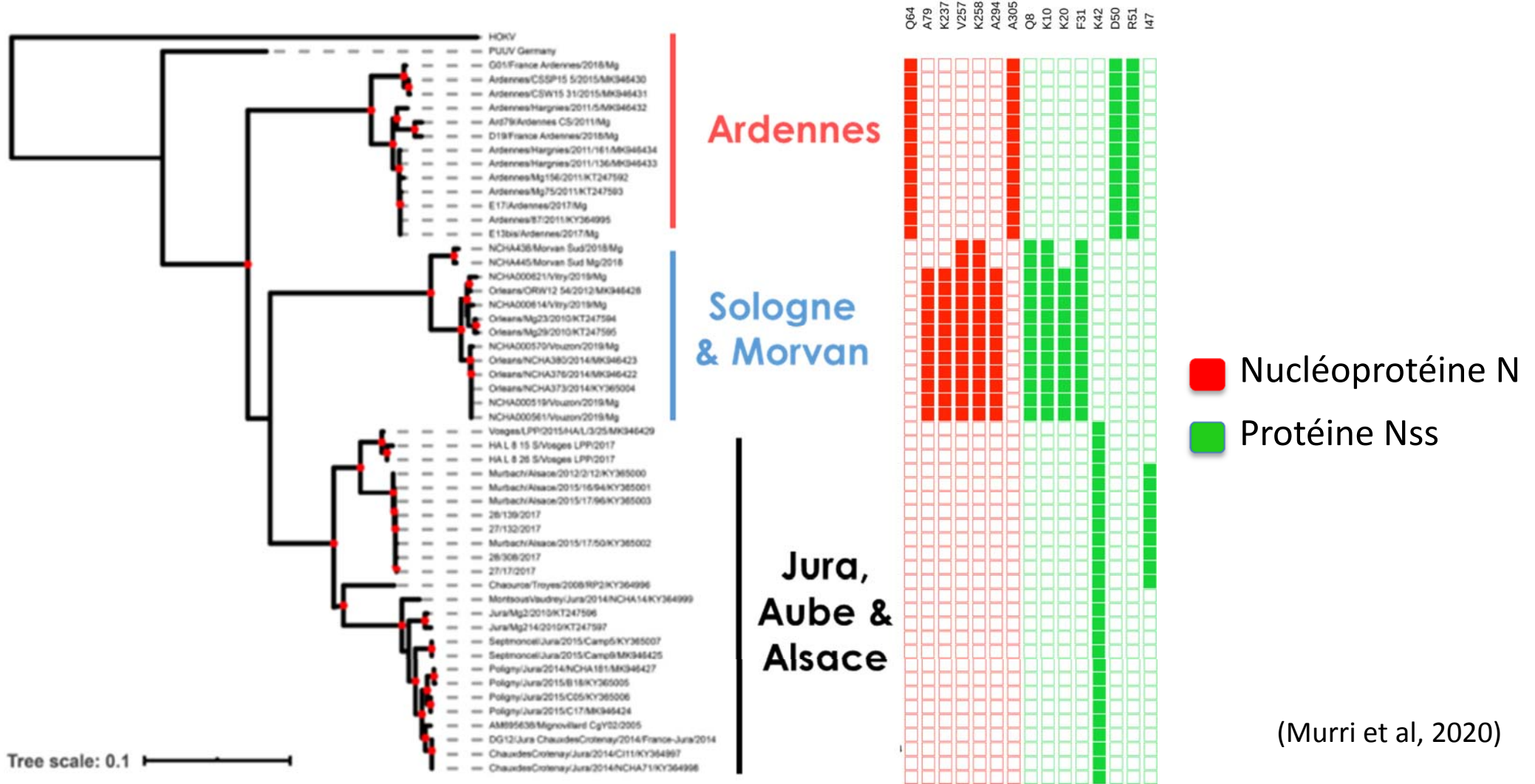




# 1) Circulation et diversité de PUUV en France



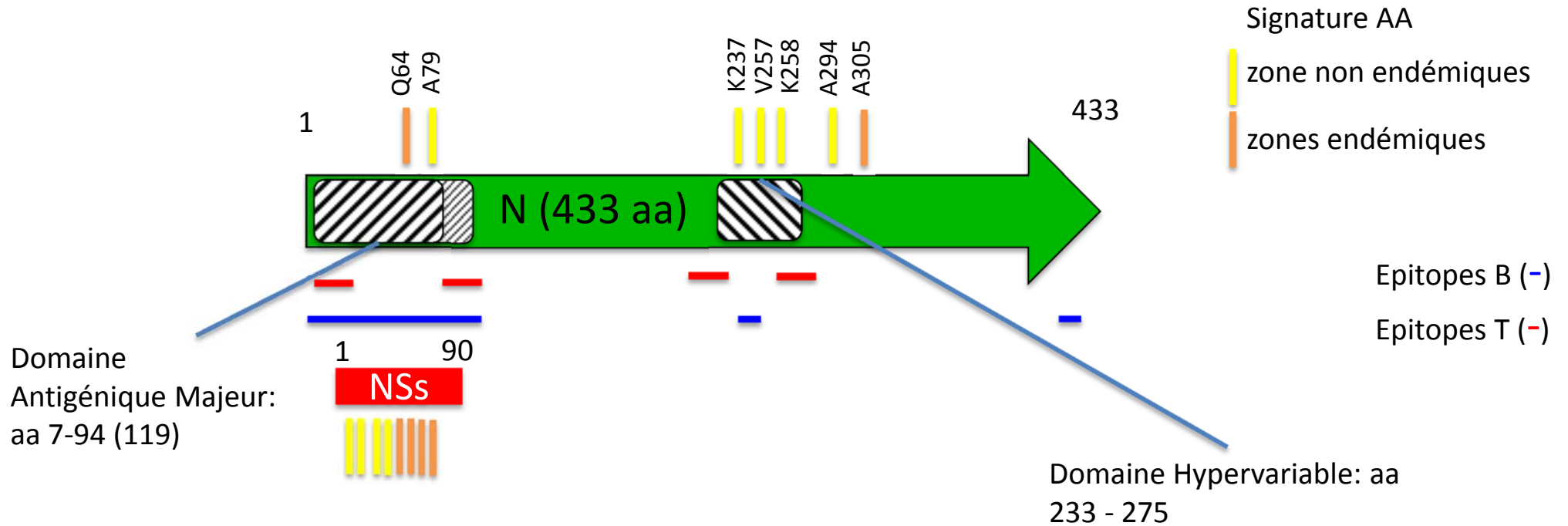
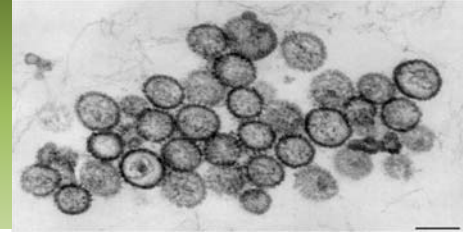
Recherche de signatures amino-acides spécifiques des différentes régions géographiques



- Plusieurs signatures amino-acides spécifiques des régions étudiées ont pu être identifiées
- Les souches originaires de régions non-endémiques partagent plusieurs de ces signatures



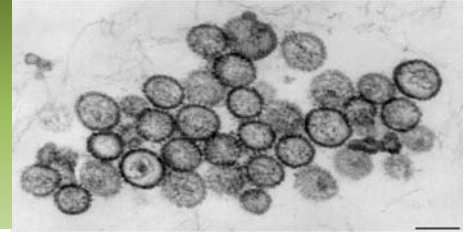
# 1) Circulation et diversité de PUUV en France



- 4 des 5 signatures AA spécifiques des zones non-endémiques sont localisées dans les principaux domaines antigéniques connus de la protéine N ainsi que dans la protéine Nss (impliquée dans la modulation de la réponse interféron de l'hôte).
- Rôle dans la reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte et/ou les mécanismes immunopathologiques impliqués dans les formes sévères de NE chez l'homme ?



# 1) Circulation et diversité de PUUV en France

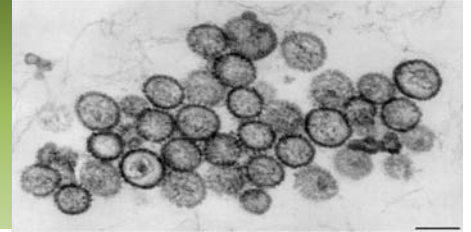


- PUUV circule en France chez les campagnols roussâtres dans plusieurs régions non-endémiques
- Les prévalences y sont au moins similaires à celles retrouvées en régions endémiques
- Les souches françaises de PUUV se divisent en 3 clusters phylogénétiques distincts, la variabilité au niveau national est importante (jusqu'à 14% au niveau nt)
- Les souches provenant de Sologne et du Morvan sont proches phylogénétiquement
- Les souches retrouvées chez les patients humains correspondent aux souches circulant localement chez les rongeurs
- Il existe des signatures amino-acides spécifiques des zones/clusters étudiées sur la protéine N et la Nss
- Certaines signatures sont spécifiques des régions non-endémiques
- Beaucoup de ces AA sont localisés dans les principaux domaines antigéniques de la N



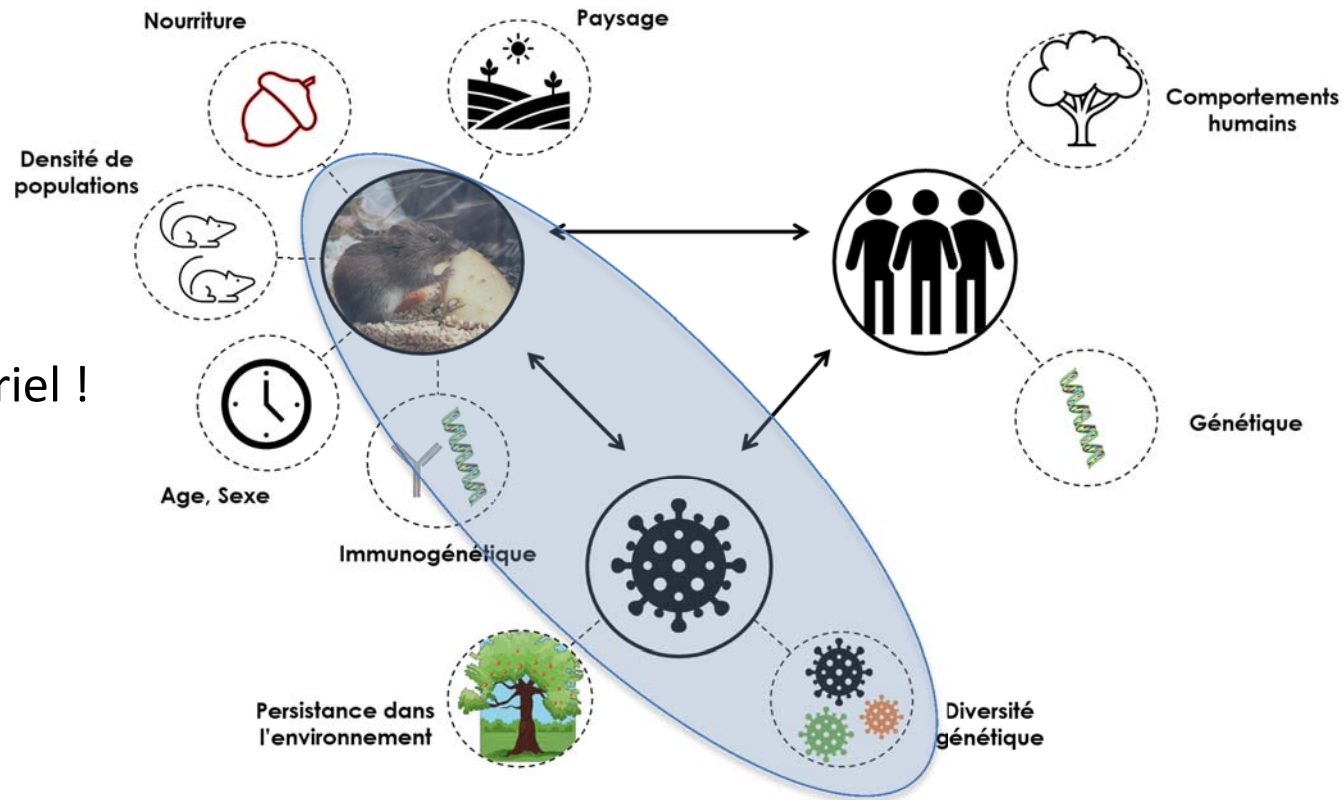


# 1) Circulation et diversité de PUUV en France



Comment expliquer ces différences épidémiologiques entre zone endémique et non-endémique ?

Système multifactoriel !

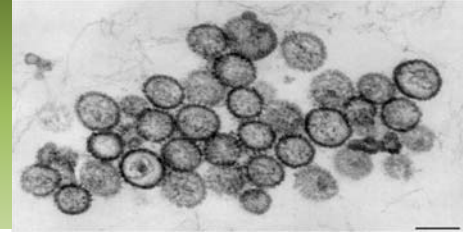


- 1/ Réponse immunitaire du réservoir suite à l'infection
  - 2/ Réplication de PUUV au sein de son réservoir?
  - 3/ Dynamique de la diversité virale intra-hôte?
- Impact de ces interactions sur la transmission de PUUV entre les rongeurs et entre les rongeurs et l'humain?

→ Tests en conditions expérimentales pour s'affranchir du contexte multifactoriel !



### 3) Etudes des souches françaises en conditions expérimentales



#### Infections expérimentales et orthohantavirus (Revue Madrières et al, 2019):

- ✓ Etudes encore rares
- ✓ Réalisées sur des rongeurs issus de colonies maintenues en laboratoire, et/ou avec des souches virales isolées et maintenues en culture cellulaire
- Utilisation de campagnols et de souches virales sauvages, provenant des zones étudiées, afin de mimer au mieux la réalité → Infections en animalerie A3 (Anses Lyon)



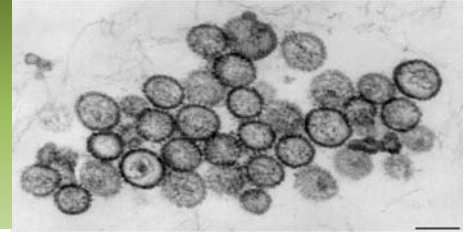
© CNRS / Virginia Girod-David

(Thèse de Sarah Madrières)

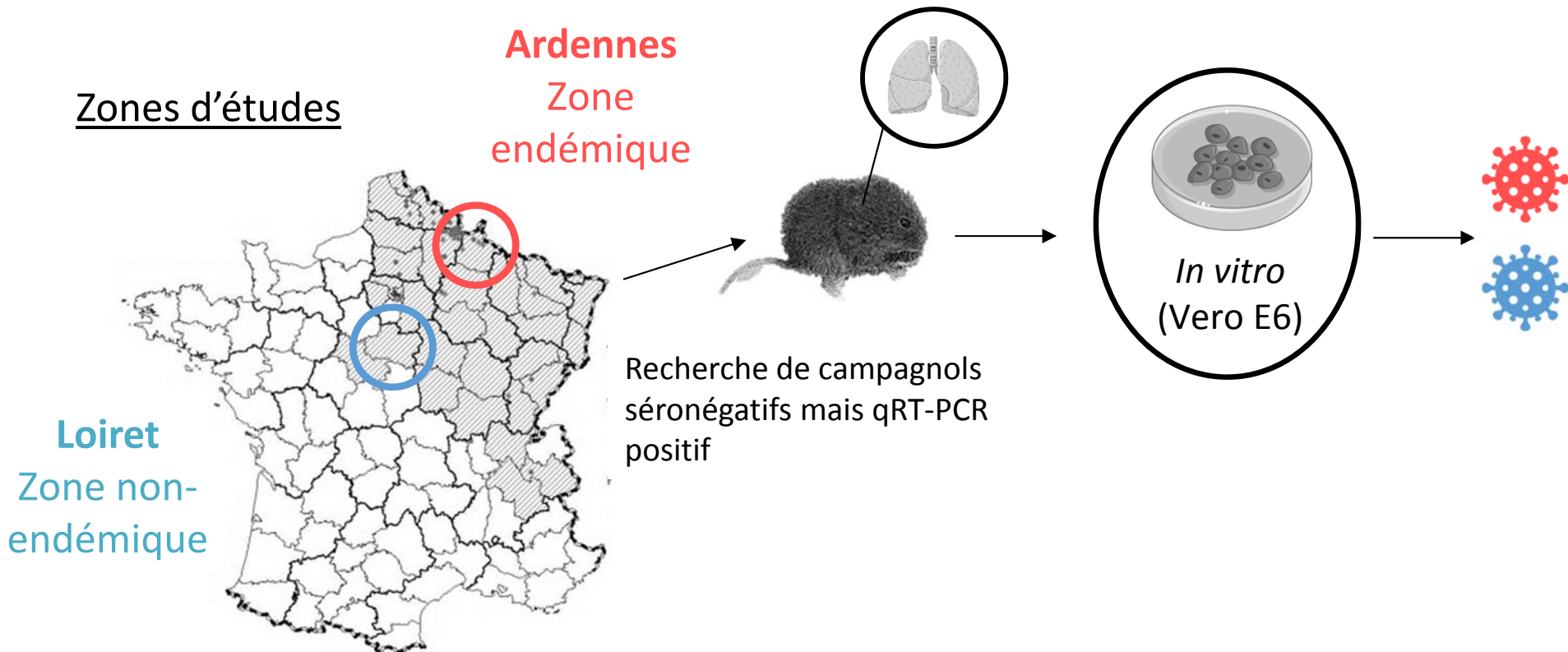




### 3) Etudes des souches françaises en conditions expérimentales



1ère étape: Isolement des souches virales (Vulin et al, 2021)



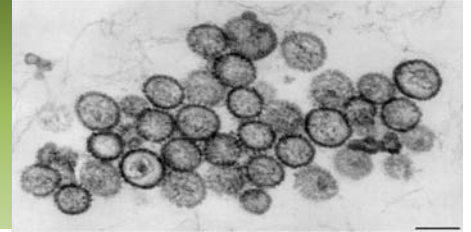
- Succès d'isolement de 2 souches françaises de PUUV (**Hargnies** & **Vouzon**) en seulement 3 passages !
- Permet d'avoir des stocks viraux quantifiables (contrôle des doses inoculées lors des infections expérimentales)

→ Souches isolées *in vitro* = souches *in natura*?





### 3) Etudes des souches françaises en conditions expérimentales

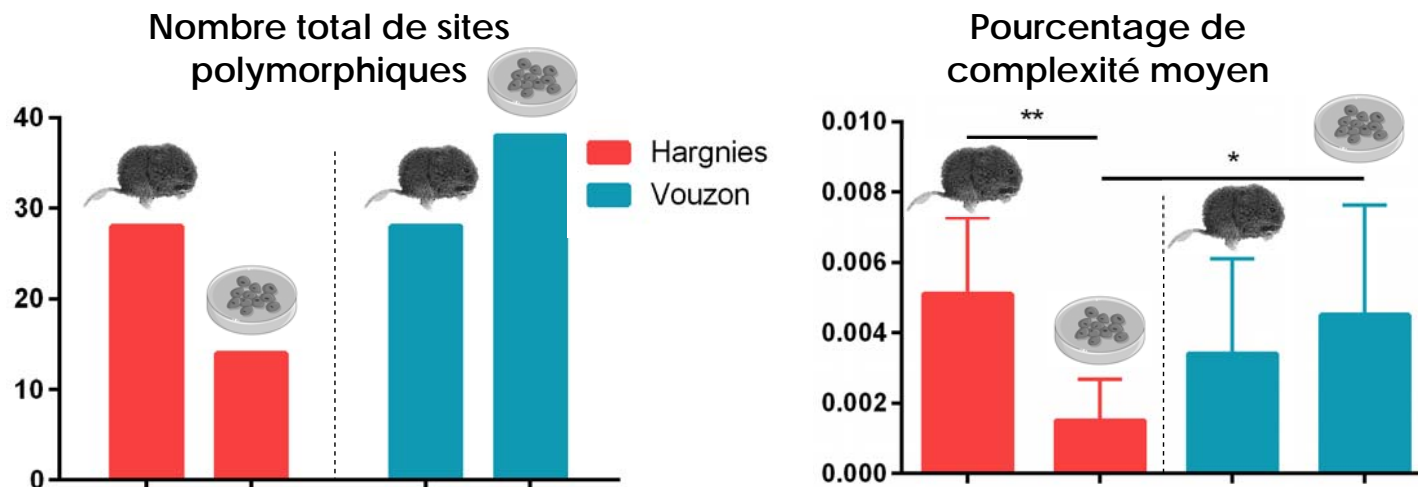


#### Caractérisation génétique des souches isolées

##### 1) Séquençage Sanger:

- Les souches isolées *in vitro* possèdent les mêmes signatures en AA, caractéristiques de leur zone géographique, que celles *in natura*
- Changement du variant majoritaire après isolement pour les deux souches (1 mutation)

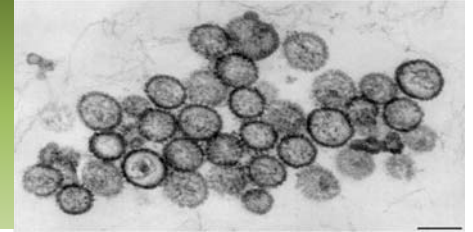
##### 2) Séquençage Illumina MiSeq (Niveau de diversité virale intrahôte – segment S):



- On observe toujours de la diversité génétique après isolement !
- Diversité virale *In natura* (poumon) : **Vouzon = Hargnies**
- Diversité virale après isolement (poumon): **Vouzon ↗ ; Hargnies ↘**

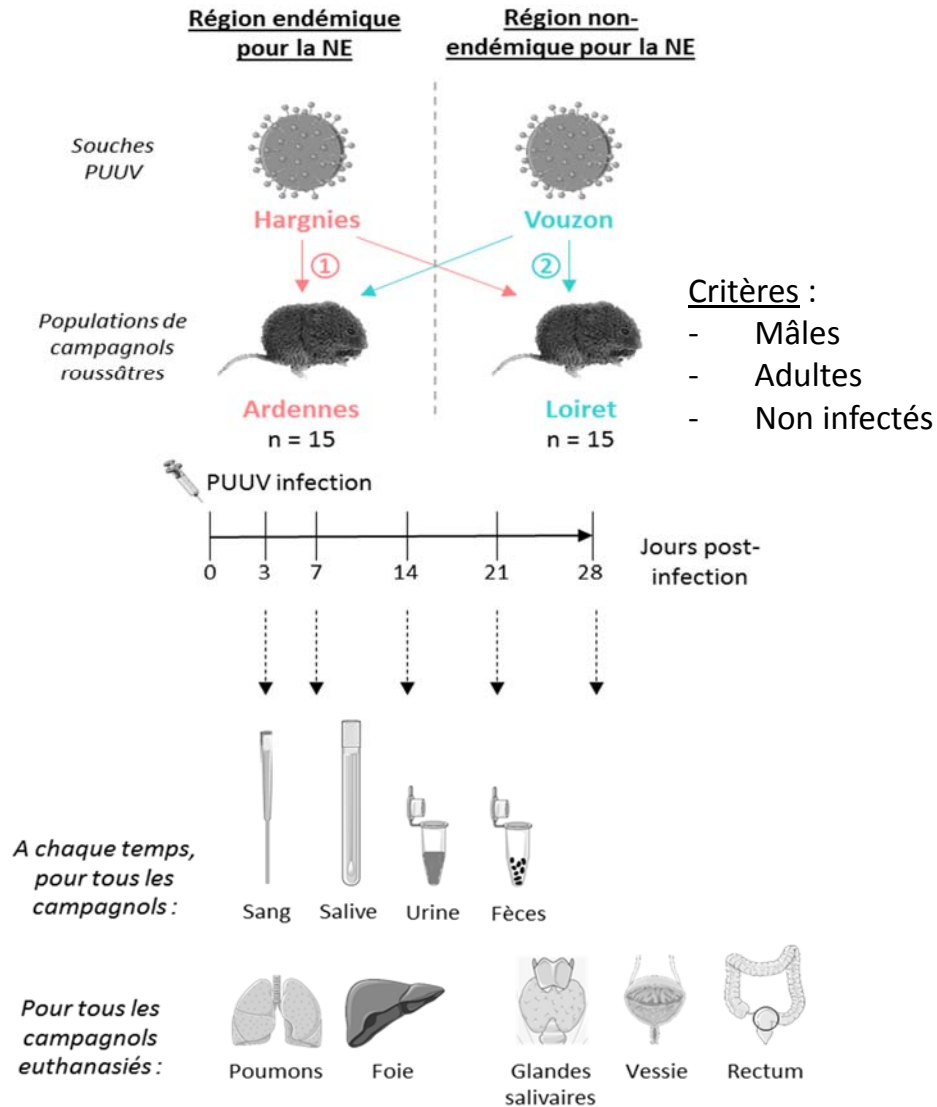


# 3) Etudes des souches françaises en conditions expérimentales

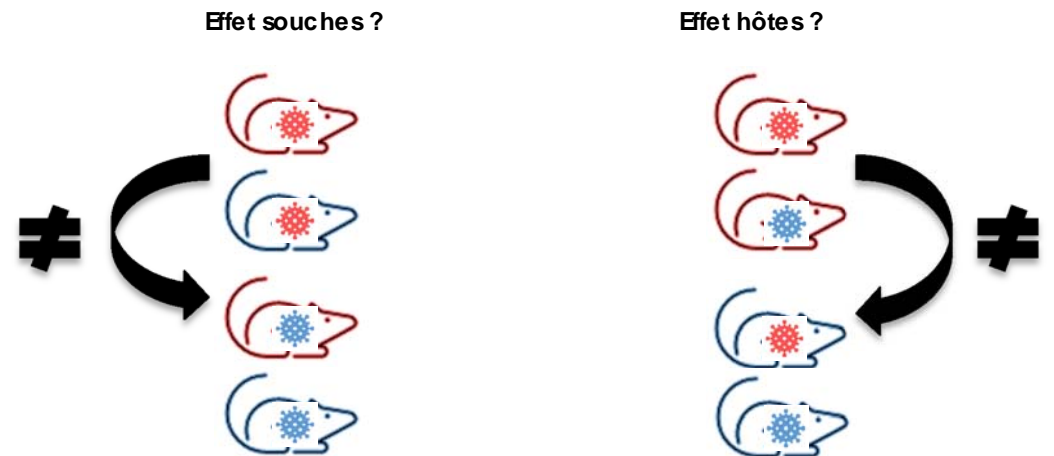


## 2ème étape: Infections expérimentales en animalerie A3

(Madrières et al, 2020)

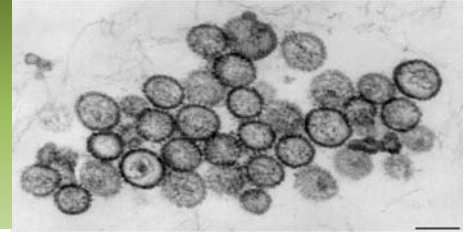


- ✓ Conditions contrôlées
- ✓ Souches et campagnols sauvages
- ✓ Suivi des paramètres virologiques et immunologiques au cours des 1<sup>er</sup> stades de l'infection

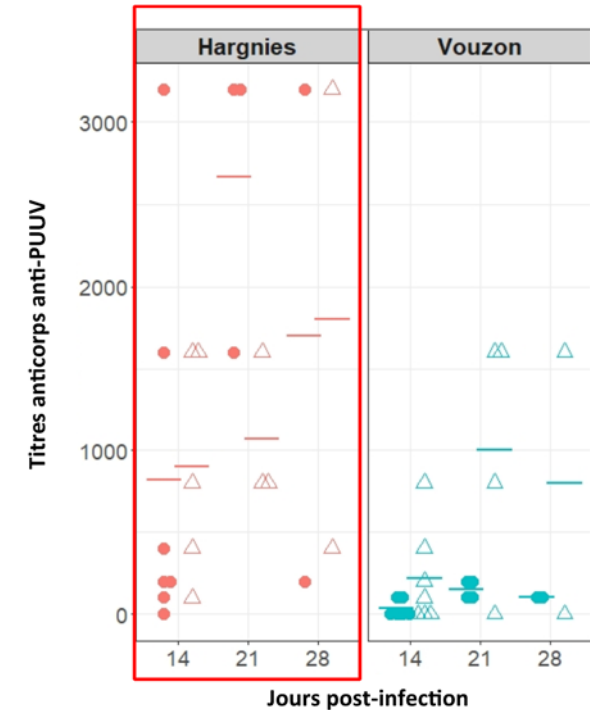
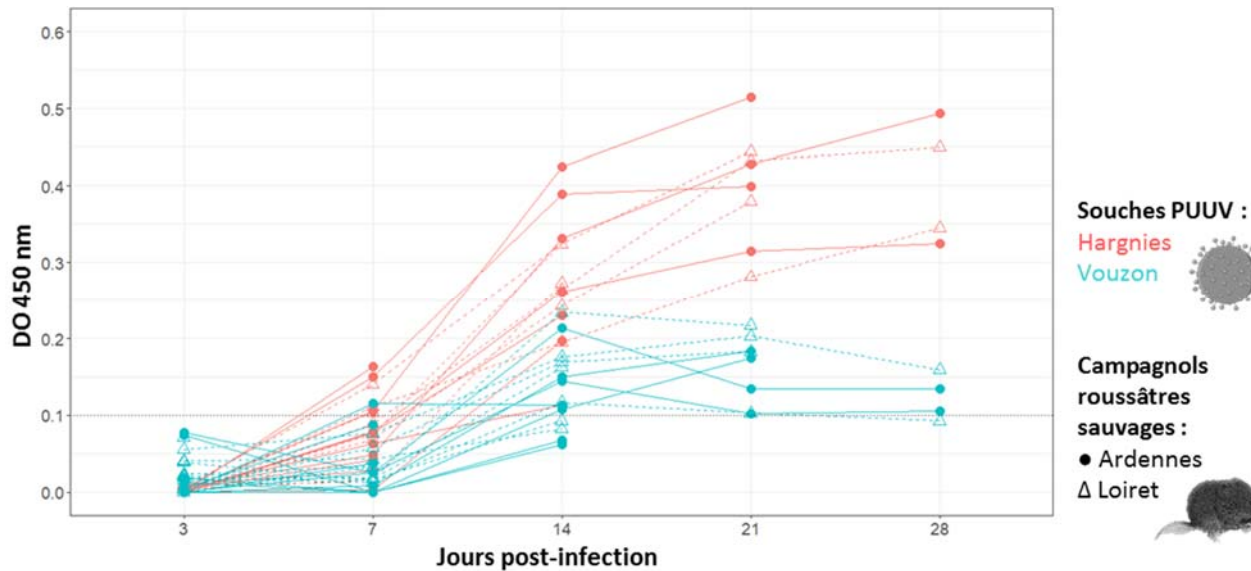




### 3) Etudes des souches françaises en conditions expérimentales



## Séroconversion



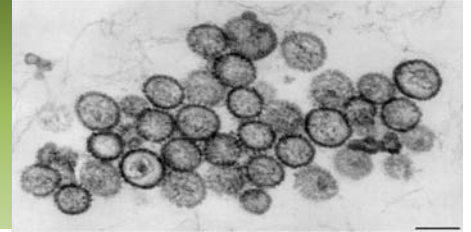
➔ Effet significatif de la souche PUUV  
**Hargnies** > **Vouzon**

- Tous les campagnols ont séroconverti à J14, quelque soit leur origine géographique
- La souche Hargnies induit de plus forts titres anticorps que la souche Vouzon, quelle que soit l'origine des campagnols infectés

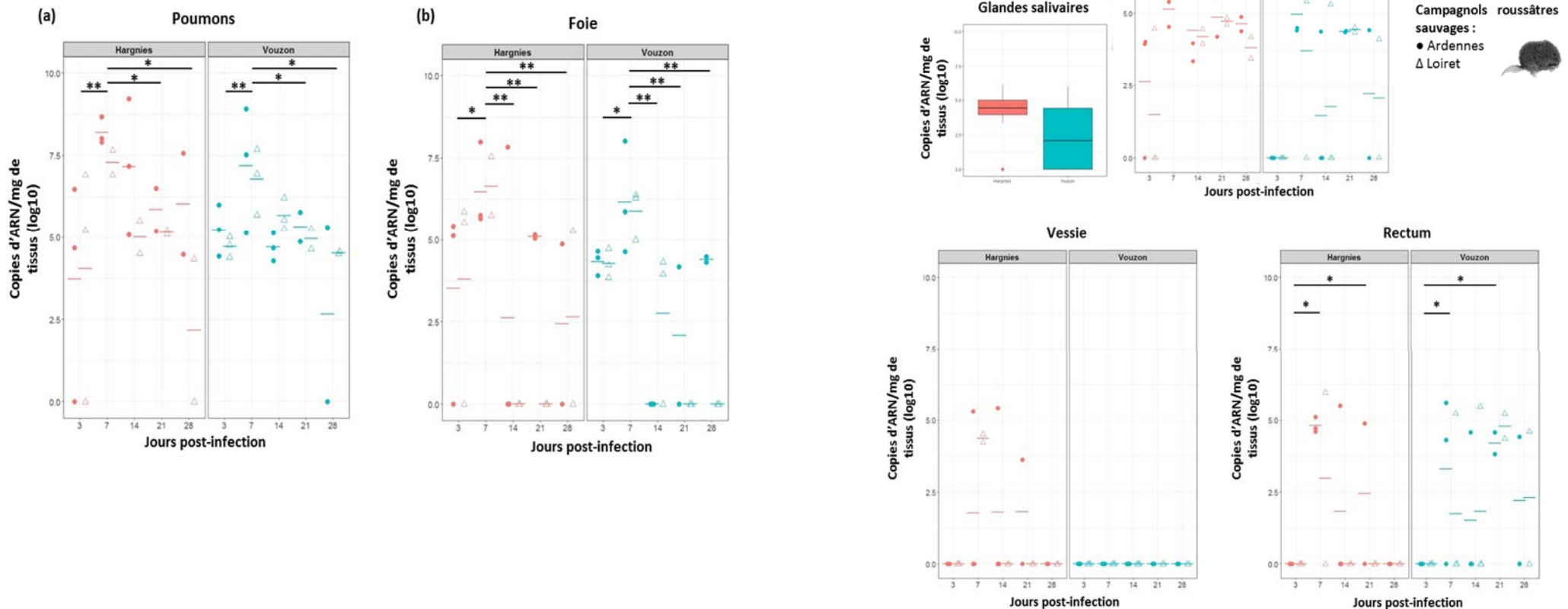




### 3) Etudes des souches françaises en conditions expérimentales



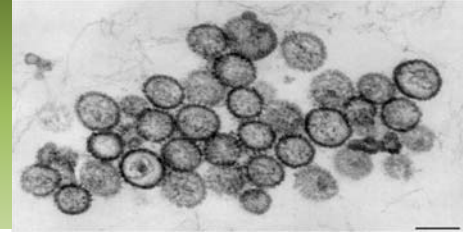
#### Réplication virale (quantification ARN viral)



- Réplication similaire dans les organes de persistance et le rectum
- Dans les glandes salivaires on observe une réplication similaire après J3 (où seule Hargnies est détectée)
- Dans la vessie, la réplication n'est détectée qu'avec la souche Hargnies



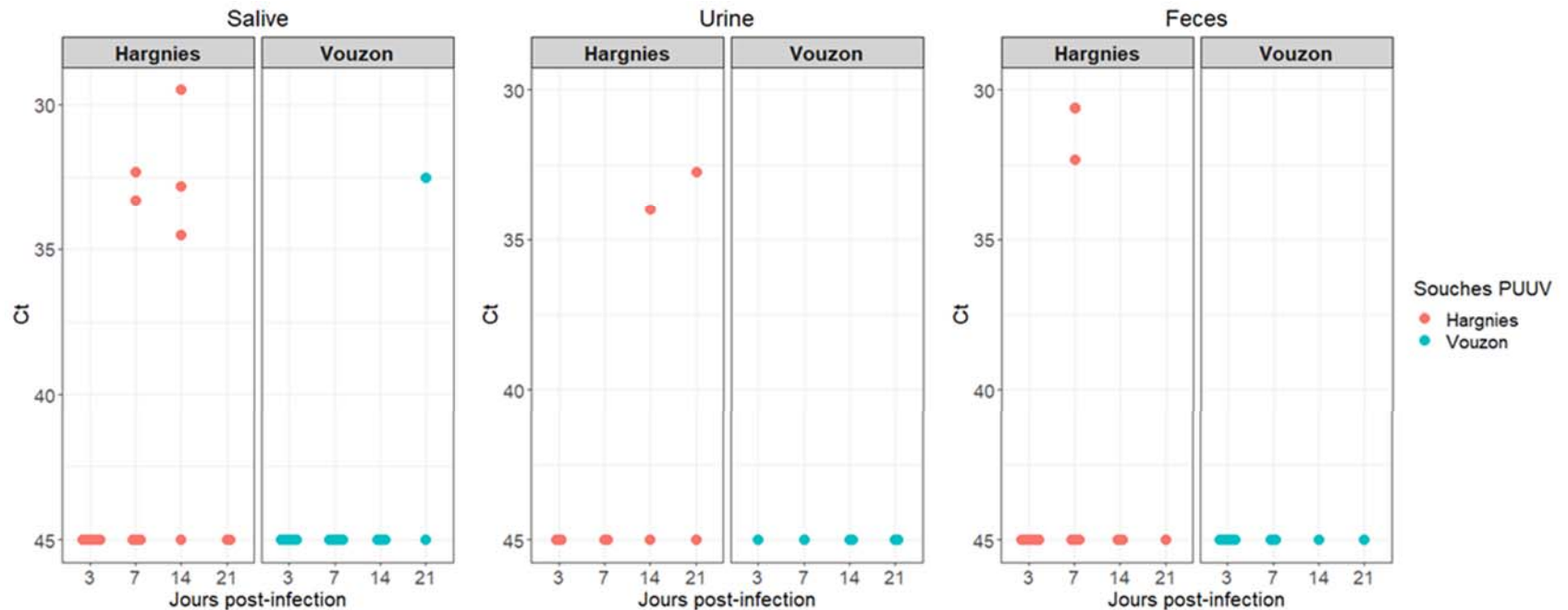
### 3) Etudes des souches françaises en conditions expérimentales



#### Quantification de l'ARN viral dans les excréats

- Pas d'excrétion virale détectée avec les campagnols sauvages (stress des animaux ?)

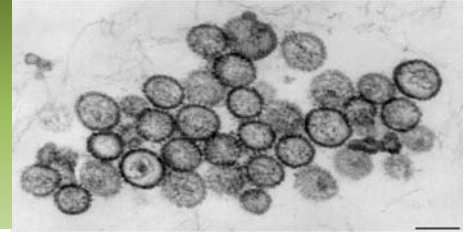
- ✓ Test sur des campagnols de laboratoire



- L'ARN viral est détecté presque uniquement avec la souche Hargnies dans les excréats des campagnols de laboratoire à partir de J7

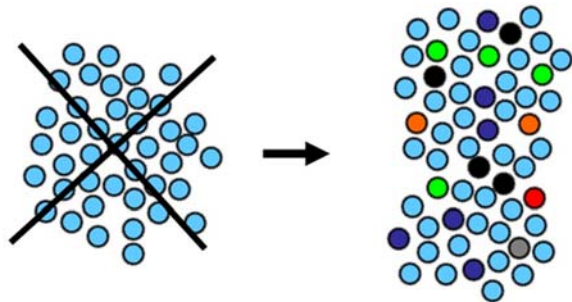


### 3) Etudes des souches françaises en conditions expérimentales



#### Suivi de la diversité virale intra-hôte au cours de l'infection

- ✓ Les virus sont présents chez leurs hôtes sous forme de quasi-espèces (ensemble de génotypes proches)



Weiner et al., Virology 1991; 180:842-848; Martell et al., J Virol 1992;66:3225-36.

➤ Cette diversité virale est impliquée dans:

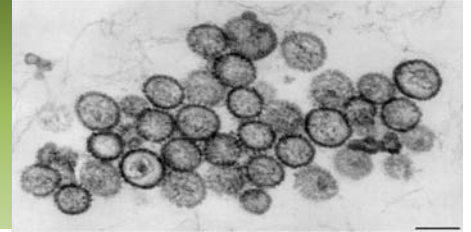
- La réponse immunitaire de l'hôte
- La pathogénicité/transmissibilité/persistance du virus
- Le saut d'espèce
- L'adaptation à un nouvel environnement (sens large)

→ Existe-t-il des différences dans la dynamique d'évolution intra-hôte de nos deux souches ?

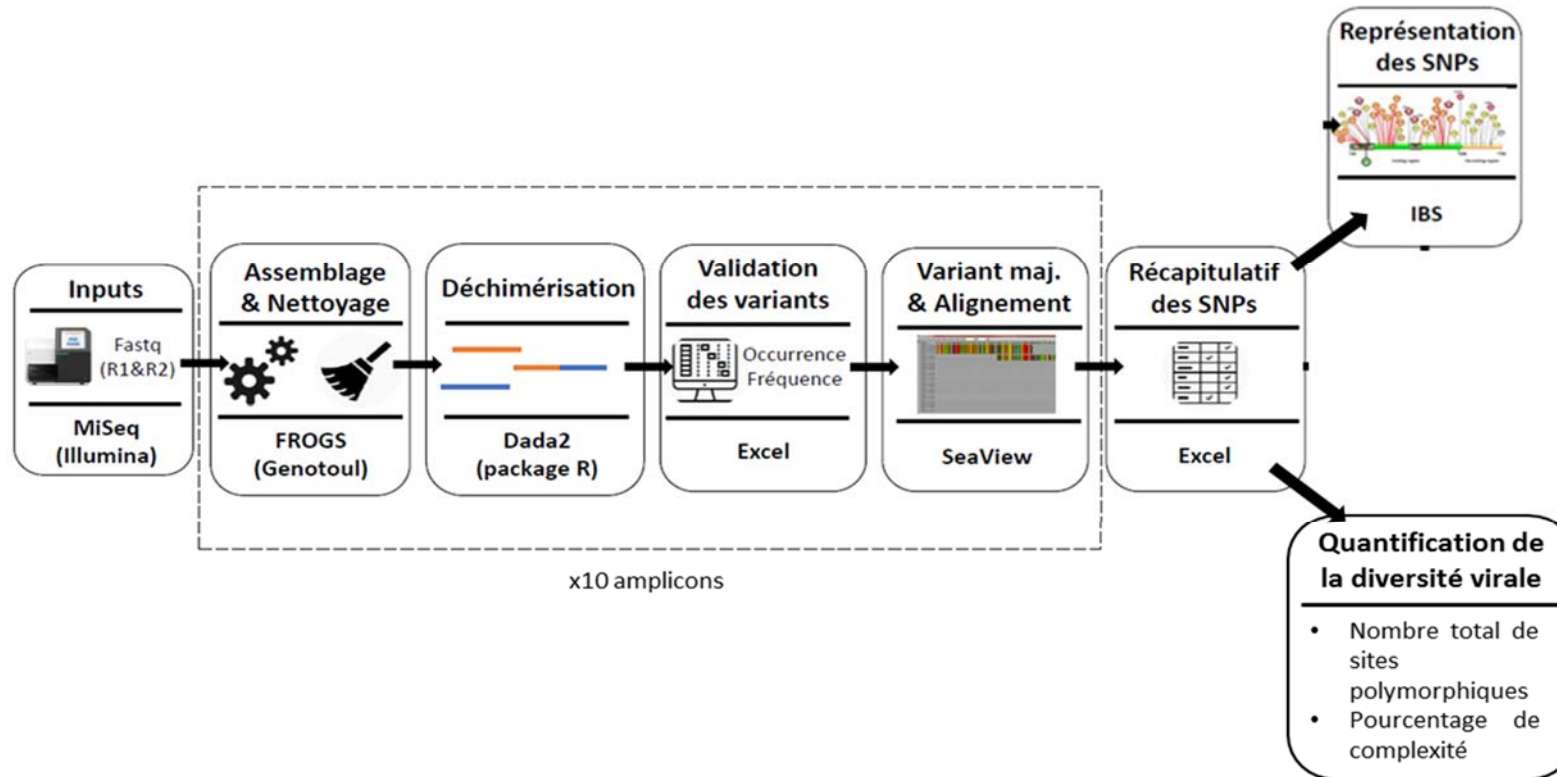




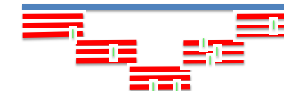
### 3) Etudes des souches françaises en conditions expérimentales



- ✓ Séquençage MiSeq (Illumina) (Segment S) sur les prélèvements réalisés au cours des infections expérimentales:

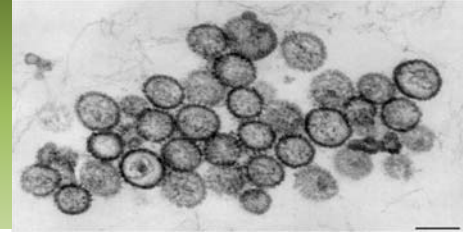


- Charges virales très faibles → stratégie « amplicons »
- Malgré cette stratégie, beaucoup d'échecs





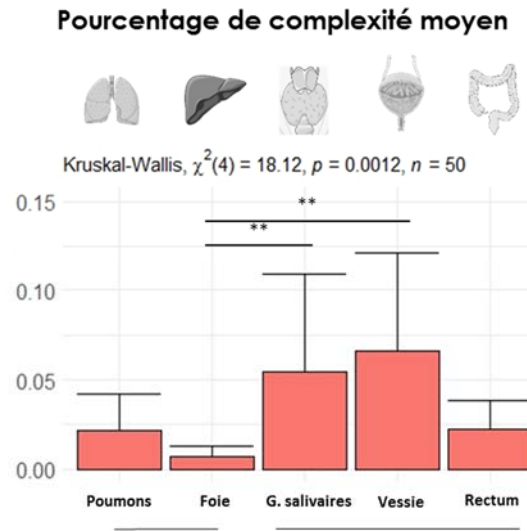
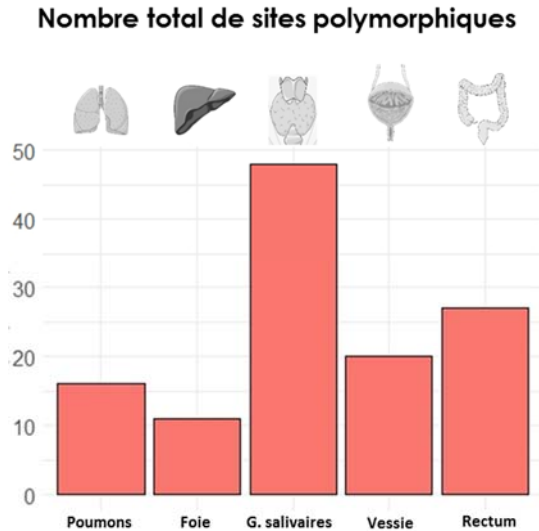
# 3) Etudes des souches françaises en conditions expérimentales



## Comparaison de la diversité entre les différents organes (J14)

(Croisement autochtones)

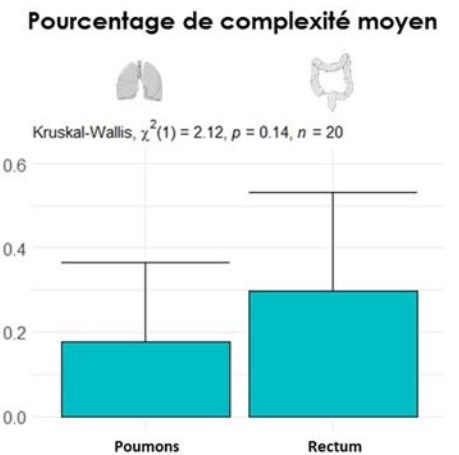
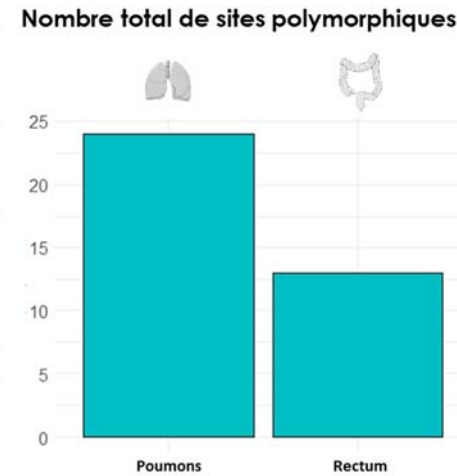
### Zone endémique



Organes excréteurs > organes persistance

### Zone non-endémique

Vessie: pas d'ARN viral  
Foie & glandes salivaires: échec

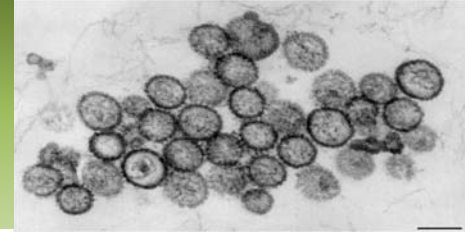


Organes excréteurs = organes persistance ?

- On semble observer une plus grande diversité dans les organes excréteurs pour la souche Hargnies.
- moins évident pour la souche Loiret



### 3) Etudes des souches françaises en conditions expérimentales

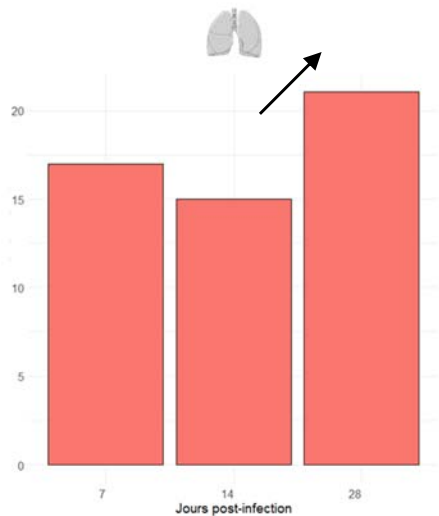


## Suivi de la diversité virale au cours du temps dans les poumons (persistance)

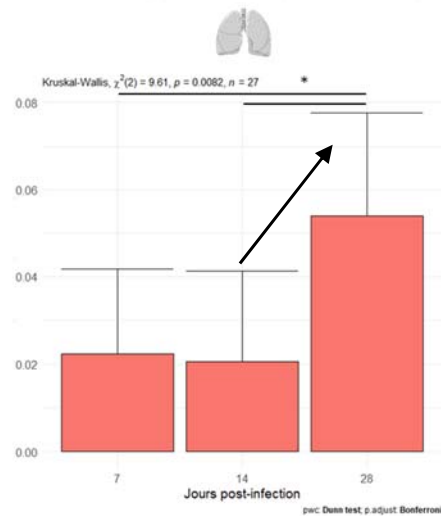
Zone endémique

Zone non-endémique

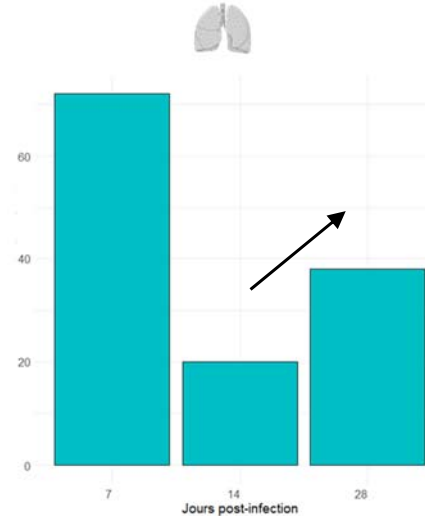
Nombre total de sites polymorphiques



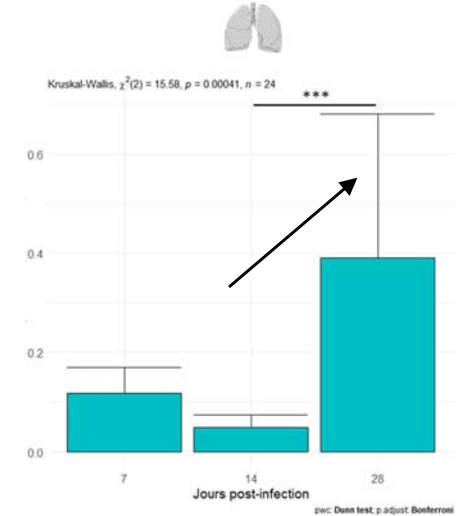
Pourcentage de complexité moyen



Nombre total de sites polymorphiques



Pourcentage de complexité moyen

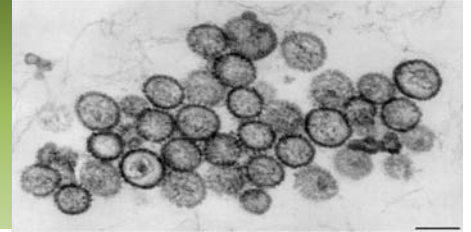


- La diversité virale semble diminuer jusqu'à J14 (Mise en place de la réponse immunitaire) puis ré-augmenter entre J14 et J28 → maintien d'un pool de diversité dans les organes de persistance ?
- Même cinétique pour les deux souches





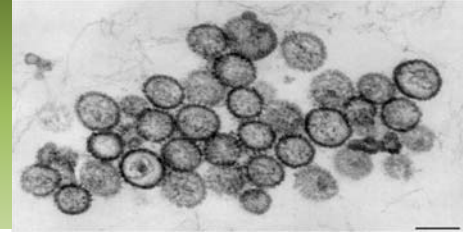
### 3) Etudes des souches françaises en conditions expérimentales



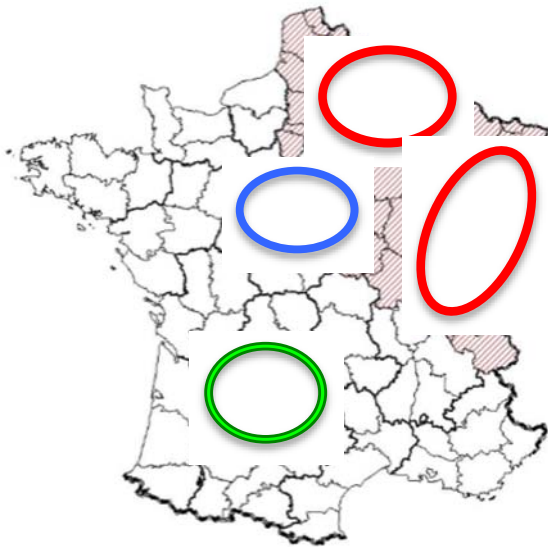
- La souche Hargnies (endémique) induit une plus forte séroconversion → rôle de la réponse immunitaire ?
- Des différences de niveaux ou de cinétique de réplication entre les deux souches sont observées dans certains organes excréteurs, pas dans les organes de persistance
- Sur des campagnols de laboratoire, seule la souche Hargnies permet la détection d'ARN viral dans les excréments dès J7.
- On observe une diminution de la diversité virale à J14, (période de séroconversion) puis une augmentation à J28, (parallèle à la diminution de l'ARN viral dans les poumons). Cela pourrait illustrer une réplication virale à bas bruit une fois la réponse immunitaire mise en place, tout en maintenant un pool de diversité dans les organes de persistance.
- La diversité virale est plus importante dans les organes excréteurs, au moins avec la souche Hargnies → meilleure chance de transmission à l'homme ?
- Ces résultats sont à prendre avec précaution à cause du faible effectif testé et de la forte variabilité interindividuelle



# Conclusion



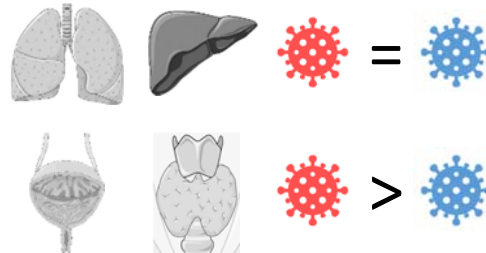
## Situation épidémiologique contrastée de la NE



1/ Réponse immunitaire du réservoir



2/ Réplication de PUUV dans son réservoir



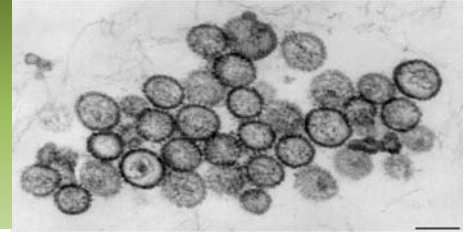
Effet « souches »

3/ Diversité intra-hôte de PUUV



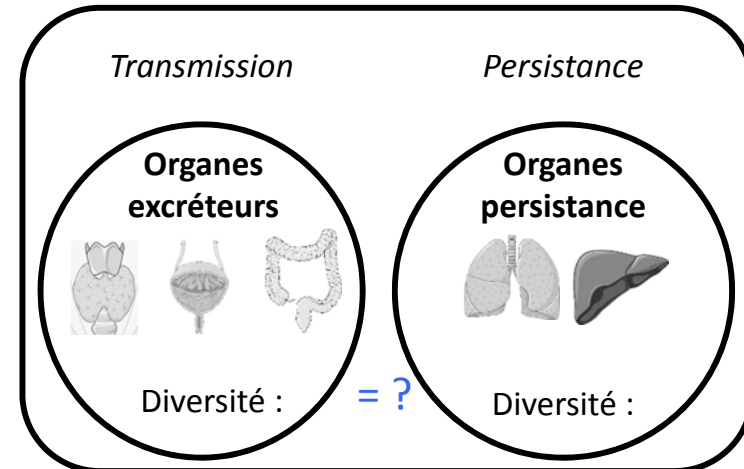
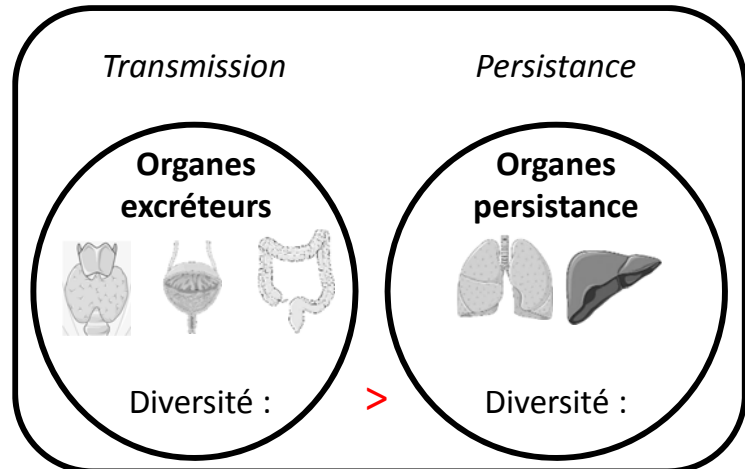


# Conclusion



Zone endémique  
**Souche Hargnies**

Zone non-endémique  
**Souche Vouzon**

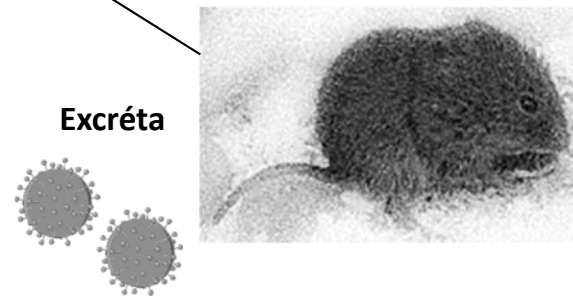


Réplication virale :

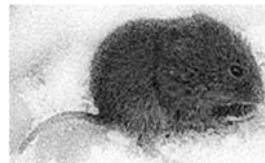
>

Excrétion virale :

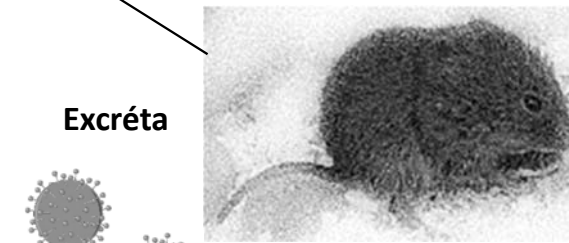
>



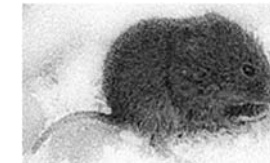
Excréta



Nombreux cas de NE



Excréta



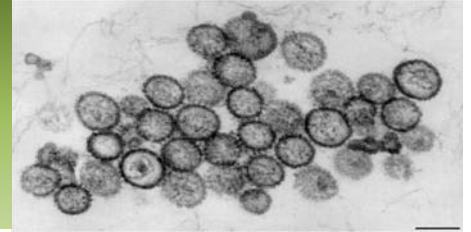
Peu ou pas de cas de NE





# Perspectives

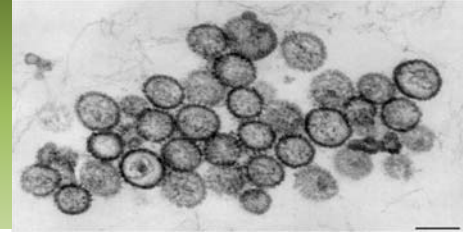
(plus ou moins lointaines)



- ✓ Etudes sérologiques chez l'homme en zone non endémiques
- ✓ Continuer la surveillance chez les rongeurs en zone non endémique
- ✓ Recherche de zone de contact entre clusters de souches « endémiques » et « non-endémiques » → réassortiments ?
- ✓ Etudes génomiques/phylogénétiques/diversité intrahôte sur les segments M et L du virus
  - ➔ Adaptation des protocoles de séquençage (Sanger et MinION ?)
  - ➔ Enrichissement des matrices virales ?
- ✓ Rôle des signatures en acides-aminés dans la virulence des souches PUUV
  - ➔ Etudes *in vitro* (génétique inverse) ? → compliqué...
  - ➔ Etudes *in silico* ?



# Remerciements



- Laure Benoit
- Anne Loiseau
- Sylvain Piry
- Emmanuelle Artige
- Philippe Audiot
- Nicolas Leménager
- Nathalie Charbonnel
- Maxime Galan
- Caroline Tatard
- Sarah Madrières
- Julien Pradel

- Séverine Murri
- Johann Vulin
- Sandra Lacote
- Philippe Marianneau

- François Chevenet



- Jean-Marc Reynes

Labex CEMEB



- Agence Ile de France Est
- UT Avallonnais-Morvan
- UT Tronçais
- UT ORLEANS
- UT Vitry aux loges
- Agence des Ardennes

