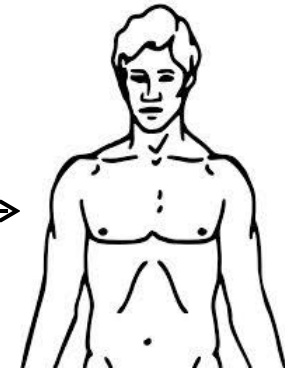
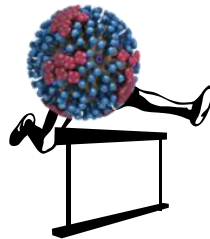


Adaptation d'un agent zoonotique de l'espèce réservoir à un hôte intermédiaire

l'exemple d'un virus influenza



Vincent Bourret^{a,b,c,*}, Jon Lyall^a, Guillaume Croville^{b,c}, Angélique Teillaud^{b,c}, Laurence Tiley^a, Jean-Luc Guérin^{b,c}

^a*Département de Médecine Vétérinaire, Université de Cambridge, Madingley Road, Cambridge CB3 0ES, Royaume Uni*

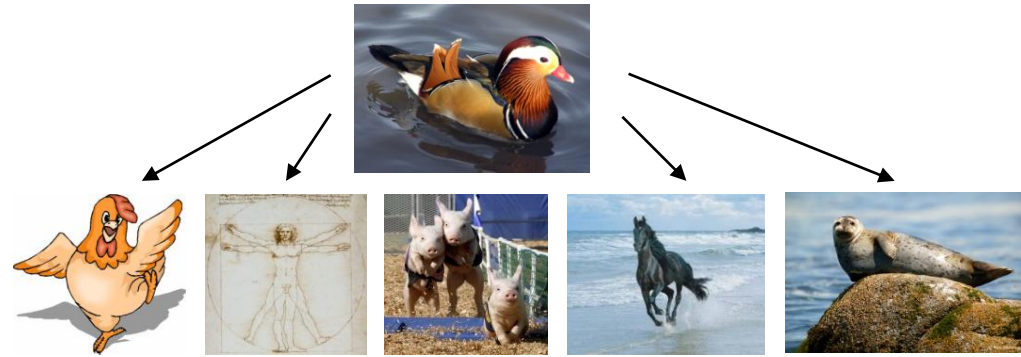
^b*Université de Toulouse, INP, ENVT, 31076 Toulouse, France*

^c*INRA, UMR 1225, IHAP, 31076 Toulouse, France*

**v.bourret@envt.fr*

Sauts d'espèce chez les virus influenza A

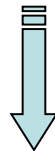
- Oiseaux aquatiques = “réservoir”



- Oiseaux et porcs : infections croisées naturelles et expérimentales

⇒ *Intérêt direct en élevage porcin*

⇒ *Intérêt en santé publique : adaptation à l'homme*



Appréhender l'**adaptation** du virus lors de son passage du **canard**
aux cellules de **porc**

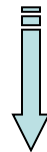
Variabilité génétique chez les virus influenza

Génome : **8 segments d'ARN** simple brin –

- ARN polymérase virale ARN dépendante

⇒ [9.10⁻⁶ ; 7.10⁻⁵ et plus] **erreurs** / nucléotide / cycle

- Possibilité de **réassortiment** génétique

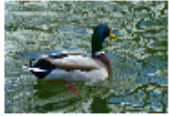


Virus **à évolution rapide et très adaptable**

Existe probablement au sein de chaque hôte naturel sous forme de **nuées de virus différents** mais au génome proche d'une séquence consensus

Passage d'une souche aviaire en cellules de porcs

Krimpen aan de Lek,
The Netherlands
Oct. 11th 1999



Mallard field sampling



Grown twice in hen's eggs
typed as H1N8
(Erasmus Medical Centre,
Rotterdam)



A/mallard/Netherlands/10/1999
virus stock



Aliquot sent to
Cambridge



Grown once in hen's eggs
(AHT, Newmarket)



A/mallard/Netherlands/10-Nmkt/1999 :
the « A » virus stock



10 passages in NPTTr swine cells (cf. 2: II.B)



Full genome sequence
analyses (cf. Chapter 4)



Full genome sequence
analyses (cf. Chapter 4)

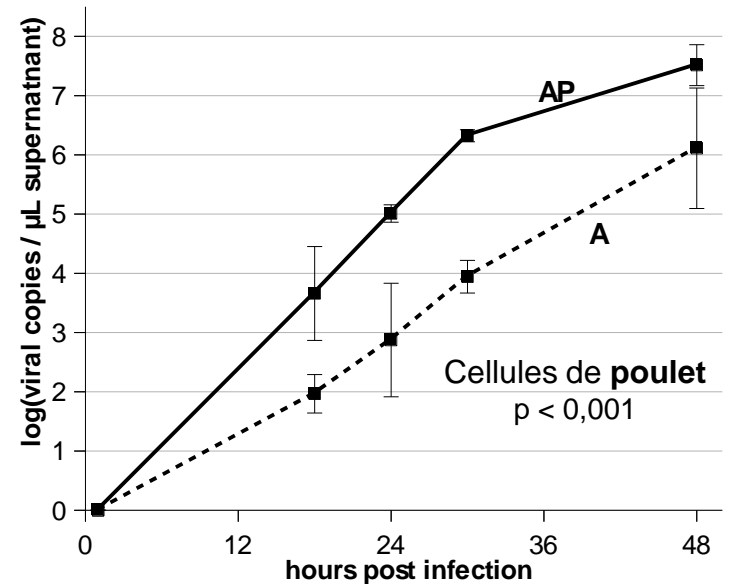
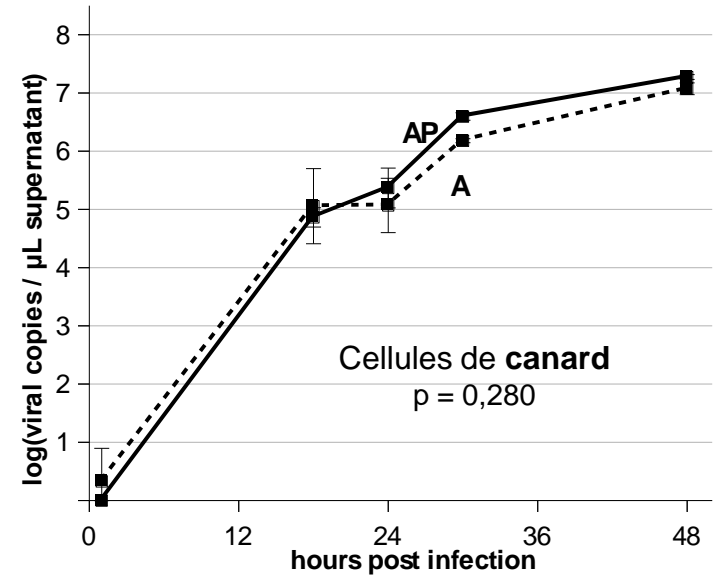
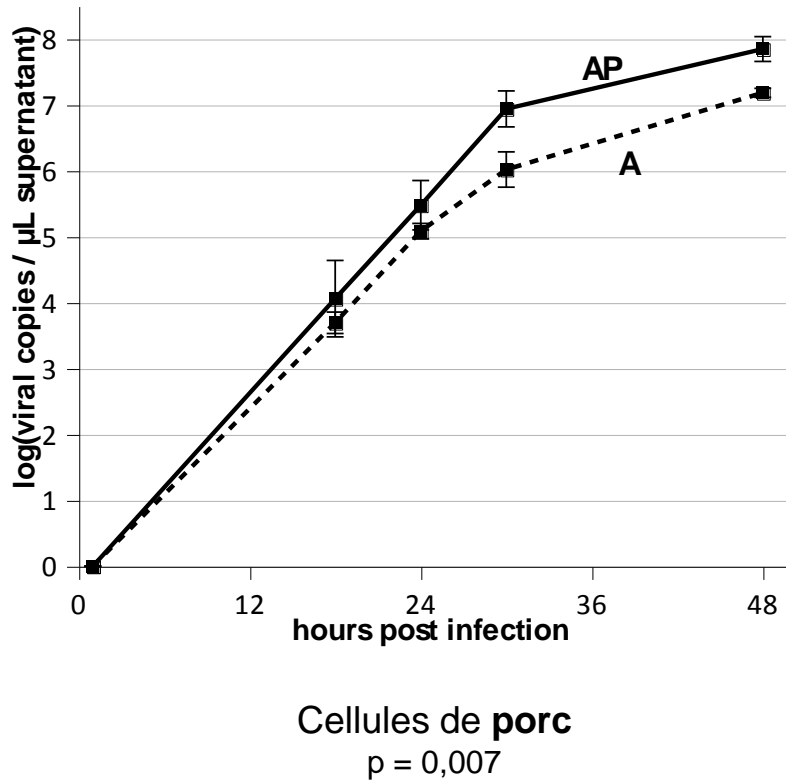
Virus : A/Mallard/Netherlands/10-Nmkt/99
(IAFP, H1N1)

Lignée cellulaire : *Newborn pig trachea* (NPTTr)

Phenotypic comparisons between
the **A** and **AP** virus stocks
(this Chapter) :

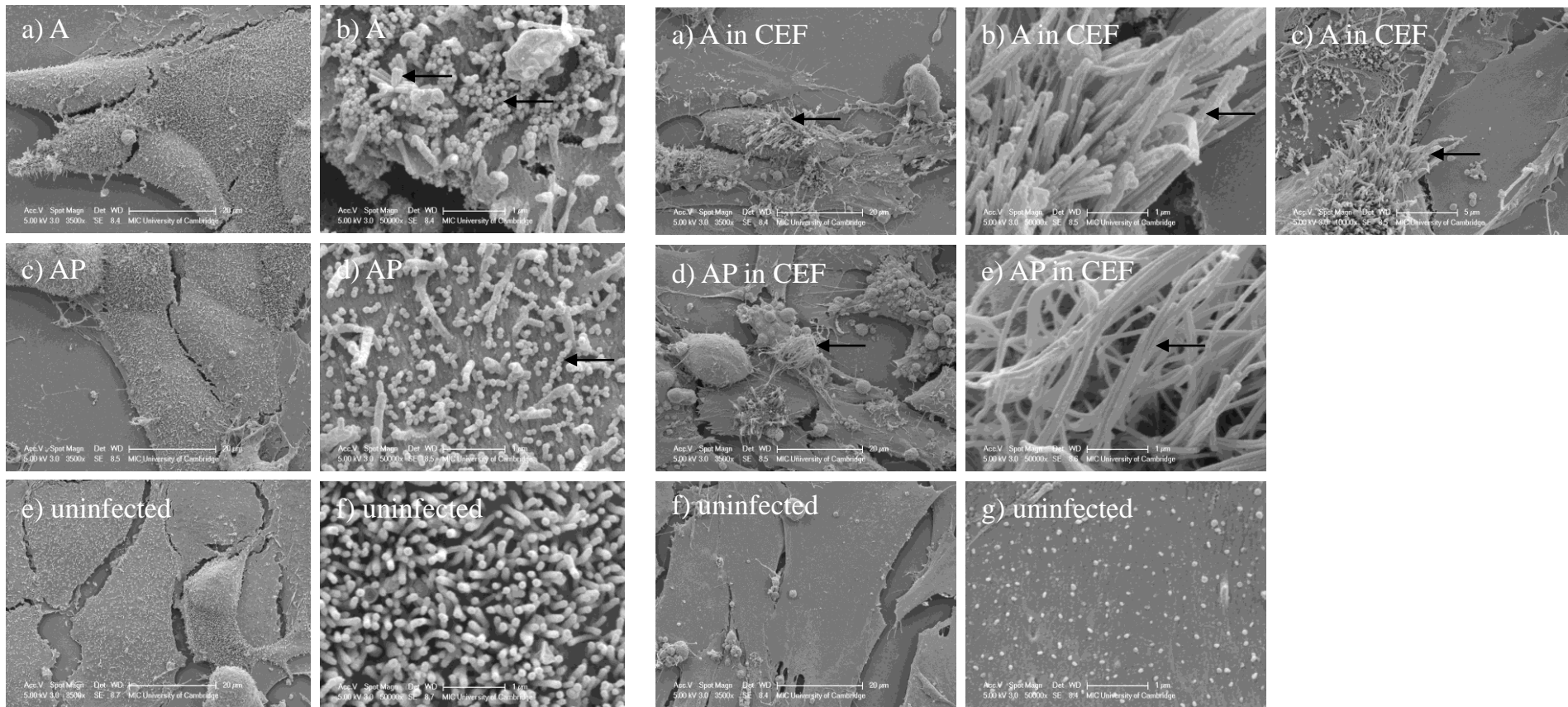
- **Growth kinetics** :
 - in swine cells
 - in duck cells
 - in chicken cells
 - in human cells
- **Filament formation** :
 - in swine cells
 - in chicken cells
 - in human cells

Vitesses de croissance virus parental vs. adapté



Implication de formes filamenteuses ?

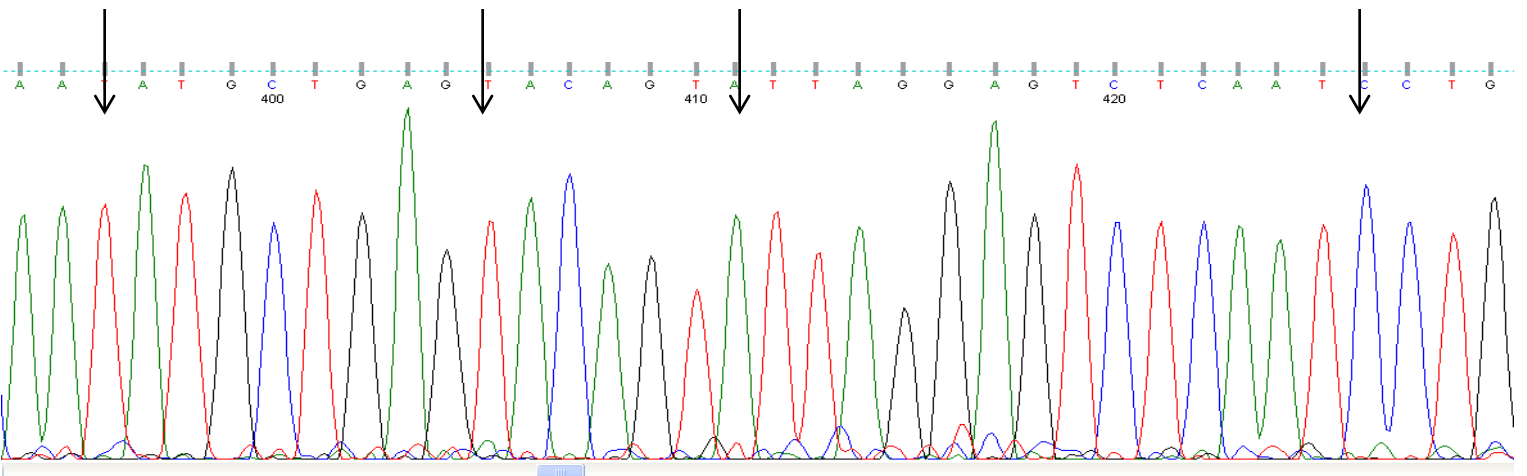
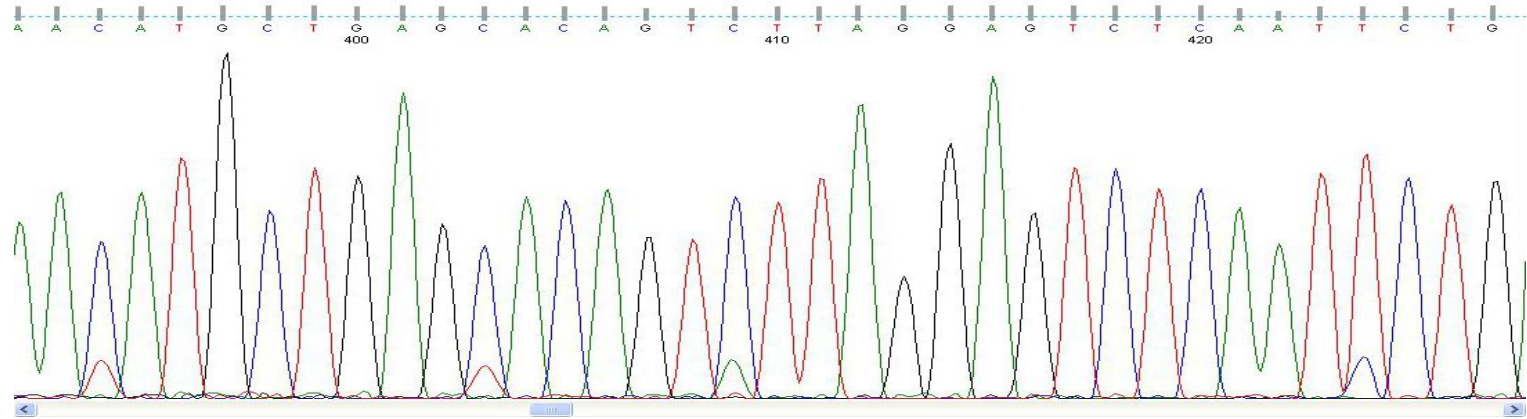
Les formes filamenteuses auraient en général une croissance plus lente



Cellules de porc

Cellules de poulet

Séquençage Sanger



Précurseurs minoritaires suspectés dans le virus parental
Correspondent à des allèles du virus adapté



Association sur les même brins ?
Sélection d'haplotypes complets ?

Pyroséquençage profond (454)

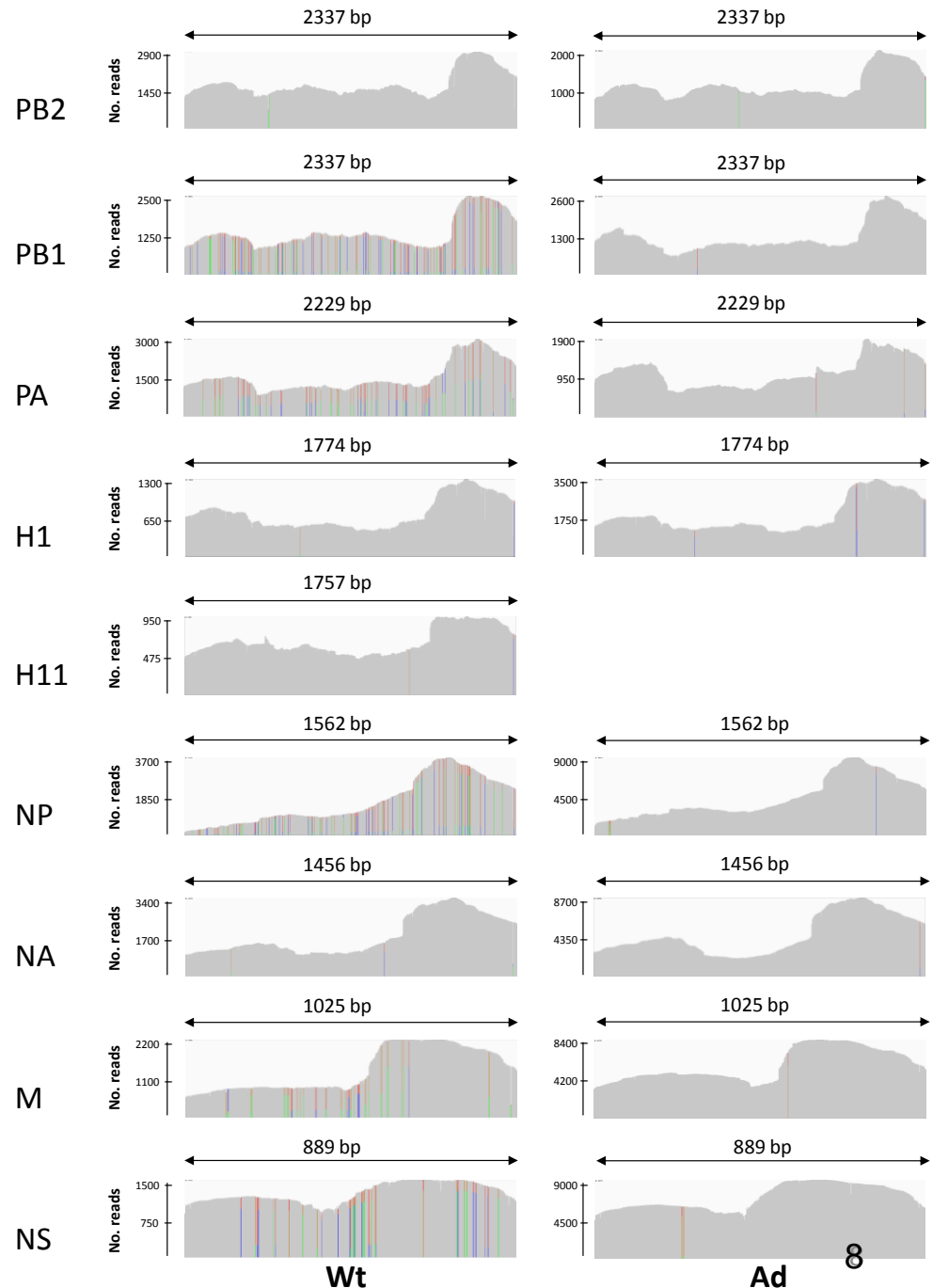


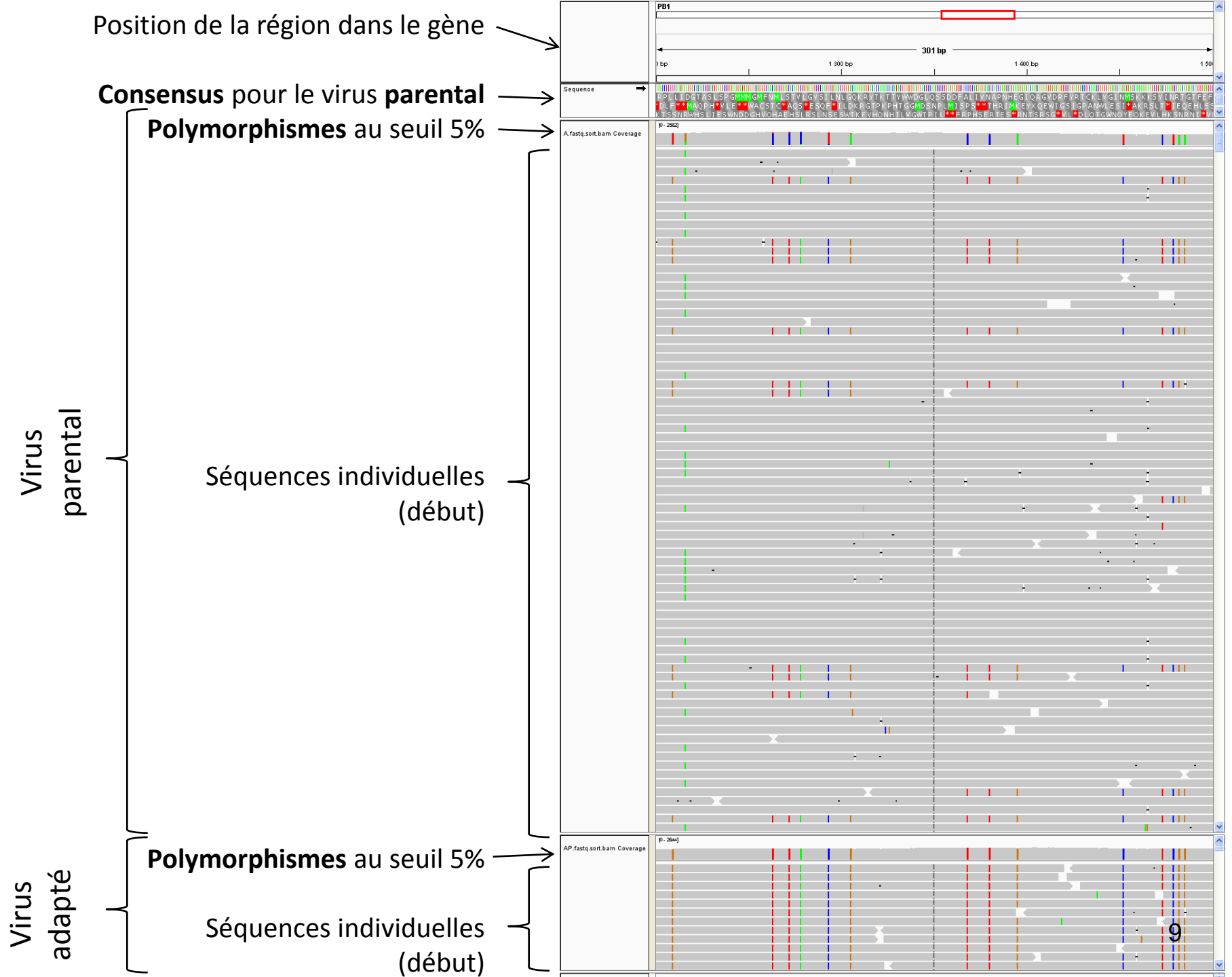
Identification de **sous-populations**
et **variants minoritaires**

Couverture complète des 2
génomomes

Profondeurs moyennes
proches de 2000 à 3000
lectures/position

Ici : représentation de
polymorphismes présents au seuil
5%



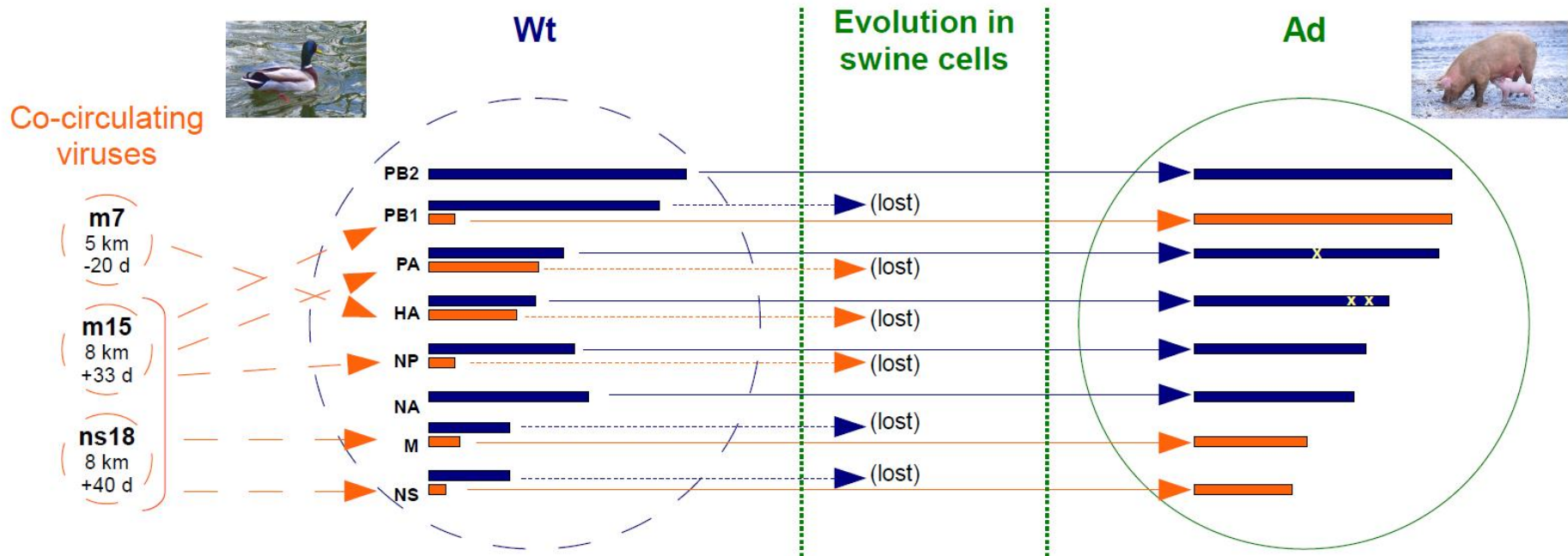


Reconstruction d'un scénario d'évolution virale

Généralement, association physique de polymorphismes sur les même brins

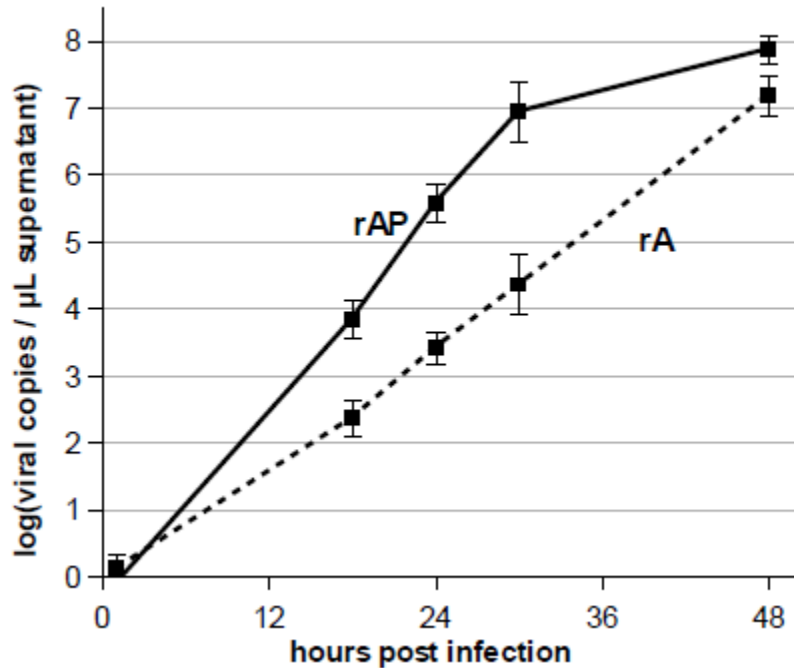
Origine des haplotypes minoritaires ?

→ proviennent d'autres virus isolés de canards autour de la même époque et du même lieu

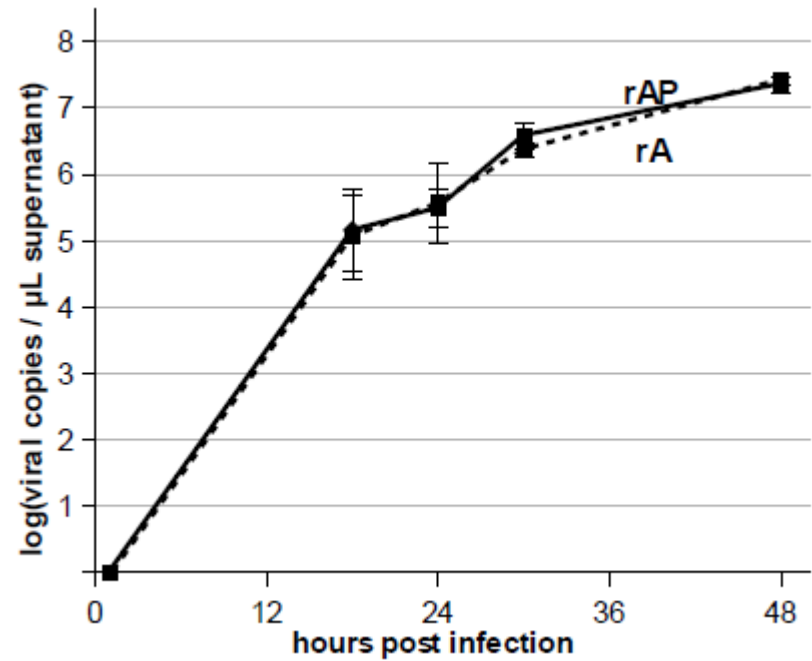


- Certains gènes n'ont pas évolué (PB2, NA)
- Certains présentait 2 allèles et l'allèle minoritaire a été perdu (PA, HA, NP)
- Certains présentait 2 allèles et l'allèle minoritaire est devenu dominant (PB1, M, NS)
- Des mutations ponctuelles sont apparues ou ont été sélectionnées (PA, HA)

Etude fonctionnelle : Reconstruction des virus parental et adapté

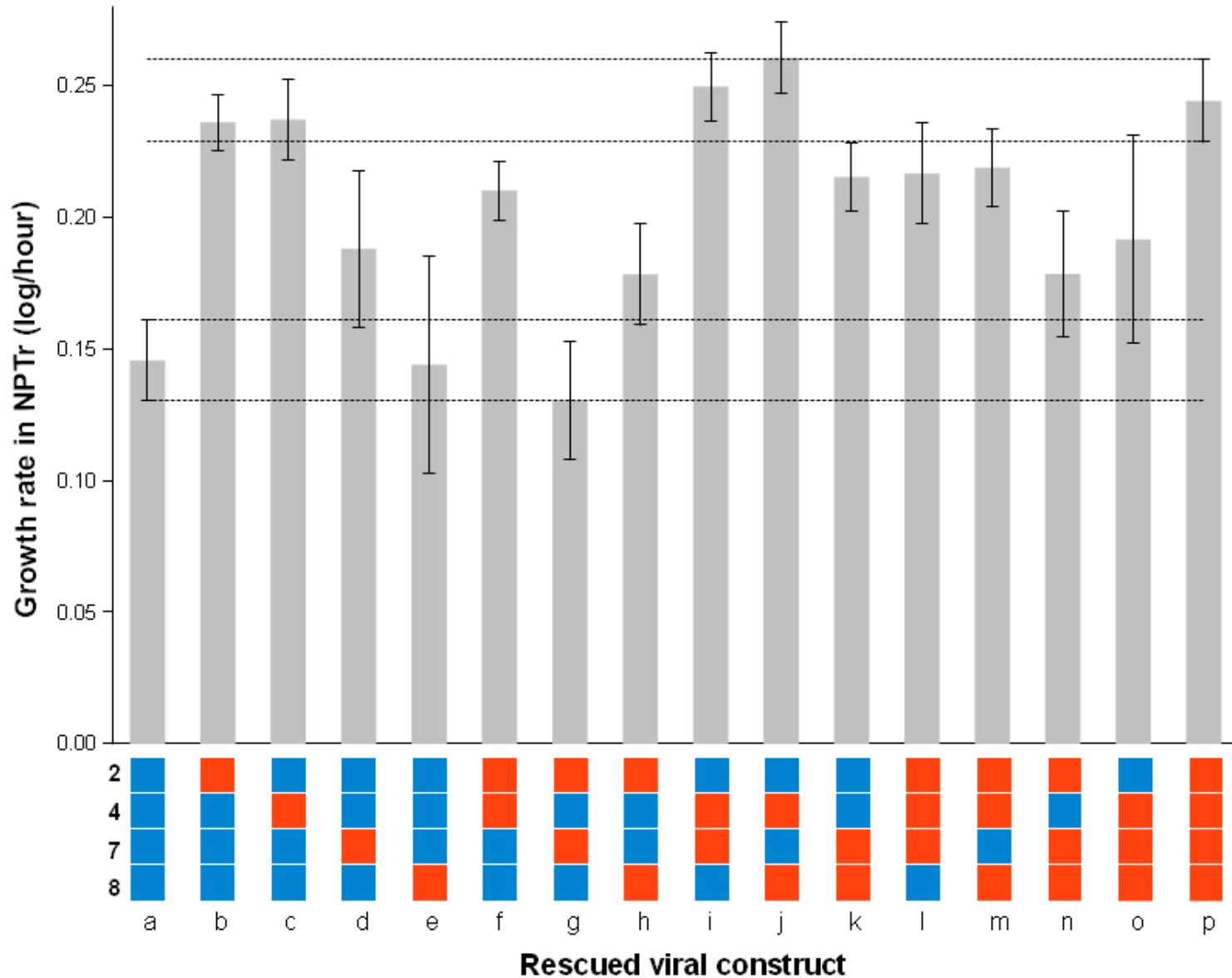


Cellules de porc



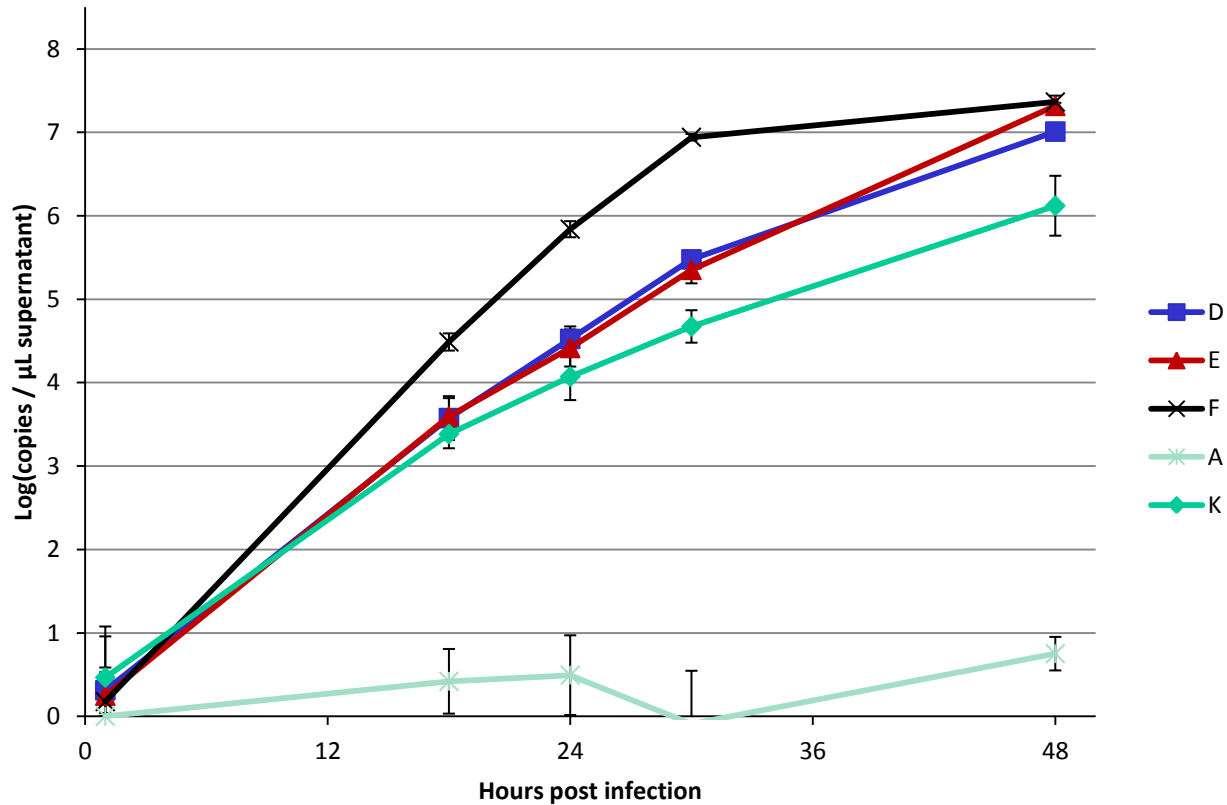
Cellules de canard

Etude fonctionnelle : 1- aptitude des différents réassortants



Etude fonctionnelle :

2- aptitude des mutants HA simples

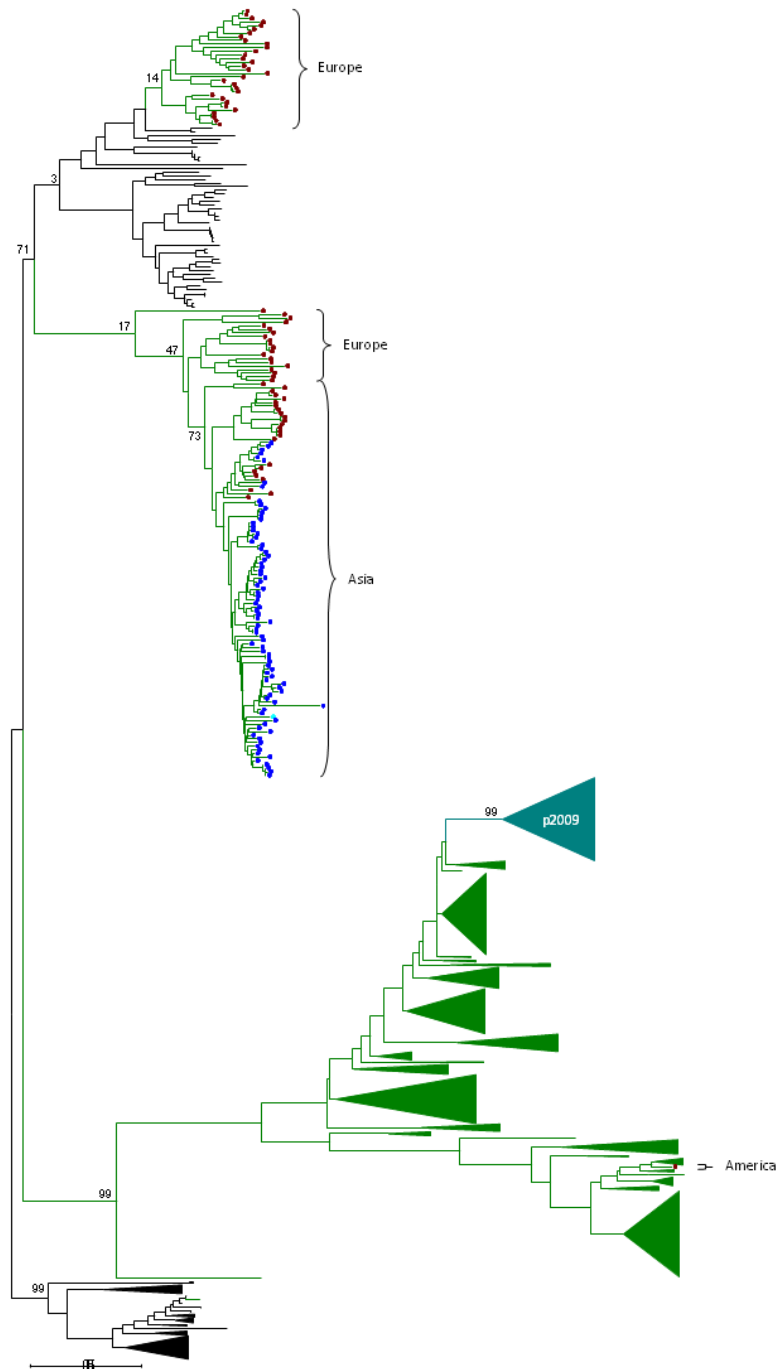


Interaction positive entre les deux mutations individuelles

Résultats phylogénétiques : seconde mutation HA

Arbre phylogénétique des
hémagglutinines H1 d'oiseaux
aquatiques (noir) et de porcs
(vert).

- S->F
- S->L



Conclusions

- Le séquençage profond a permis d'appréhender la variabilité génétique et les possibilités d'évolution offertes au virus. Des co-infections dans le réservoir naturel ont offert des options de réassortiment pour s'adapter à un nouvel environnement
- Deux mutations sur l'hémagglutinine permettent au virus de s'adapter au nouvel environnement. L'une de ces mutations est typique de l'hôte intermédiaire

Merci de votre attention !

Remerciements :

Personnel de la Plate-forme Génomique et de la Plate-forme Bio-informatique, Toulouse

Personnel du laboratoire de Virologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Personnel du Dept. de Médecine Vétérinaire, Université de Cambridge

Personnel de l'Animal Health Trust et de l'AH-VLA, R.-U.

Personnel du Centre Médical Erasmus, Rotterdam

Financement :

Cambridge Infectious Diseases Consortium

Ministère de l'Agriculture

INRA



Biais possibles

De couverture :

- Fragmentation ?
- Autres ?

De proportions :

- Multiplication du virus en culture
- Extraction ARN -> RT -> PCR -> emPCR

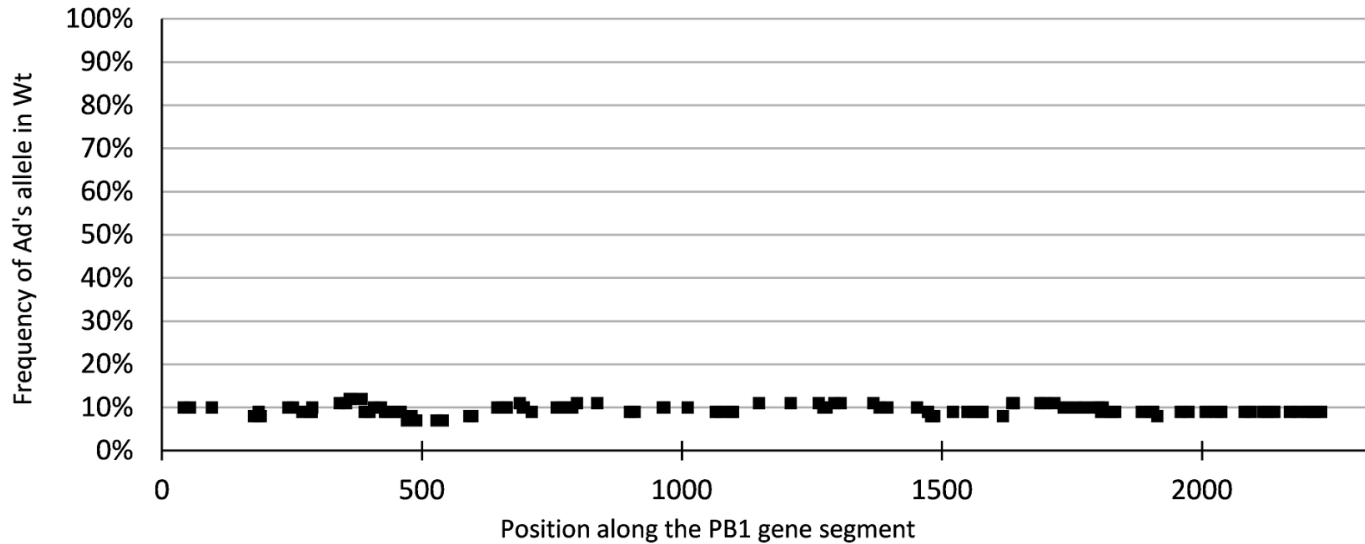
 Perte d'allèles rares si efficacité <100%

- Erreurs de RT, PCR, séquençage : distribution « imprévisible »

 Difficulté pour définir un **seuil** de confiance pour les polymorphismes présents à bas niveau

Etude de probabilités en cours pour les polymorphismes d'intérêt fonctionnel

Fréquence des allèles minoritaires le long du gène

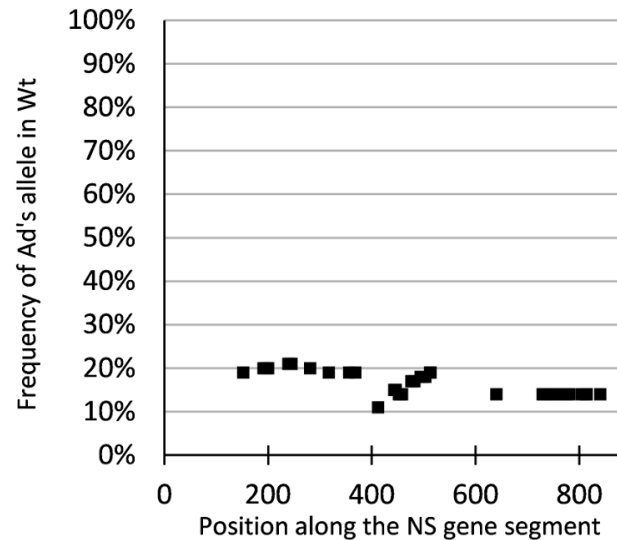
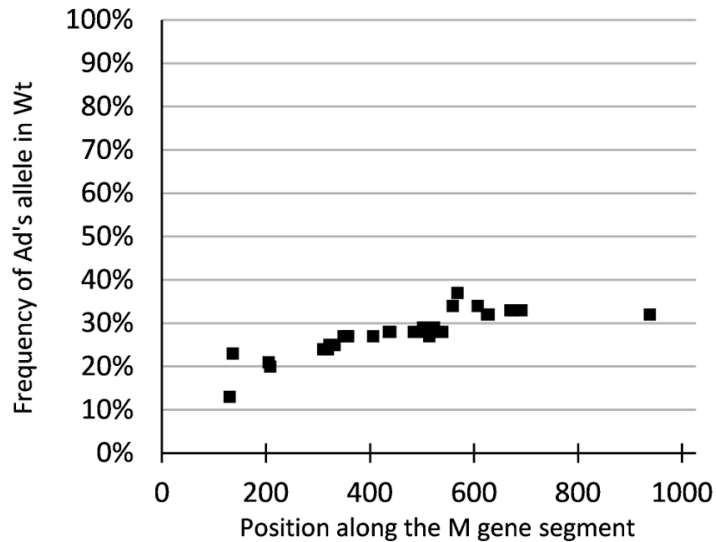
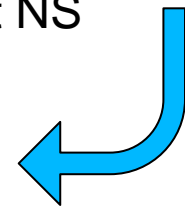


Suggèrent
des
**recombinaisons
homologues**

ou

**des artefacts de
PCR**

sur les gènes M
et NS



à discuter...