



6<sup>es</sup> Journées d'étude du pôle Santé & Société

# AGENTS INFECTIEUX ET VACCINS CHEZ L'HOMME ET L'ANIMAL

## Posters

Mercredi 30 mars  
&  
Jeudi 31 mars 2016

Amphithéâtre d'honneur  
de l'École nationale  
vétérinaire d'Alfort



Membres du pôle Santé & Société :



Sous le parrainage de :



Avec le soutien de :





## ABSTRACTS DES POSTERS DES 6<sup>es</sup> JOURNÉES D'ÉTUDE – SOMMAIRE

CARACTÉRISATION DES INTERACTIONS MOLÉCULAIRES VIRUS-HÔTE AU COURS DE L'INFECTION PAR LE VIRUS DE LA FIÈVRE APHTEUSE – Sarah BLAISE-BOISSEAU <i>et al.</i>	PAGE 4
CHARACTERIZATION OF IRSPI, A SERINE PROTEASE INHIBITOR IMPLICATED IN TICK FEEDING AND BACTERIAL INFECTION OF THEIR SALIVARY GLANDS: PRELIMINARY RESULTS – Adrien BLISNICK <i>et al.</i>	PAGE 5
DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DE STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA EN PATHOLOGIE HUMAINE – Jean-Winoc DECOUSSER <i>et al.</i>	PAGE 6
LE SYSTÈME VERIS HBV QUANTIFIE AVEC EXACTITUDE LES DIFFÉRENTS GÉNOTYPES DU VIRUS DE L'HÉPATITE B – Slim FOURATI <i>et al.</i>	PAGE 7
CHLAMYDIACEAE IN FRENCH POULTRY FLOCKS: HOST PREFERENCE AND WORKERS EXPOSURE – Karine LAROUCAU <i>et al.</i>	PAGE 8
A NEW ELISA ASSAY FOR GLANDERS DIAGNOSIS – Karine LAROUCAU <i>et al.</i>	PAGE 9
SUIVI DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE INDUITE PAR LA SOUCHE VACCINALE MIC1-3KO DE TOXOPLASMA GONDII, CHEZ SON HÔTE DÉFINITIF : LE CHAT – Delphine LE ROUX <i>et al.</i>	PAGE 10
MODÉLISATION IN VITRO DE L'INFECTION PAR LE VIRUS DE L'ENCÉPHALITE À TIQUES EN UTILISANT DES CELLULES NEURALES PRIMAIRES HUMAINES – Fares MAZIGH <i>et al.</i>	PAGE 11
DES DONNÉES DE SÉQUENÇAGE DE GÉNOME COMPLET AU DÉVELOPPEMENT D'UN OUTIL DE TYPAGE – Lorraine MICHELET <i>et al.</i>	PAGE 12
PERSISTENCE OF HIV MINORITY RESISTANT VARIANTS IN DNA OF TREATED PATIENTS BY UDS – Christophe RODRIGUEZ <i>et al.</i>	PAGE 13
PREDICTION OF NUCLEOTIDE ANALOGUE TREATMENT OUTCOME IN PEDIATRIC PATIENTS BY MEANS OF EVOLUTIONARY INFERENCE OF HBV PREC/C DOMAIN – Christophe RODRIGUEZ <i>et al.</i>	PAGE 14

---

## CARACTÉRISATION DES INTERACTIONS MOLÉCULAIRES VIRUS-HÔTE AU COURS DE L'INFECTION PAR LE VIRUS DE LA FIÈVRE APHTEUSE

SOPHIE BACH, GREGORY CAIGNARD, CINDY KUNDLACZ, AURORE ROMÉY, ANTHONY RELMY, KAMILA GORNA, EVE LALOY, DAMIEN VITOUR, STEPHAN ZIENTARA, LABIB BAKKALI-KASSIMI ET SANDRA BLAISE-BOISSEAU

UPE, ANSES, ENVA, INRA, UMR 1161, Laboratoire de santé animale d'Alfort, France

La fièvre aphteuse (FA) est une maladie animale virale hautement contagieuse affectant les artiodactyles domestiques et sauvages (principalement bovins, porcins, ovins, caprins) et dont l'impact socio-économique en cas d'épizootie est considérable. L'agent responsable, le FMDV (Foot and Mouth Disease Virus), est un virus du genre *Aphthovirus* de la famille *Picornaviridae*. Ce virus se caractérise par une importante variabilité génétique et antigénique et présente une distribution mondiale.

En matière de lutte contre la FA, le coût de production des vaccins inactivés et la diversité sérotypique du FMDV rendent complexes les stratégies de vaccination efficaces. L'immunité qu'ils confèrent n'est de plus que de courte durée. Par ailleurs, chez 15 à 50% des ruminants domestiques ou sauvages, le virus peut persister au niveau de l'oropharynx, et ce indépendamment du statut immunitaire de l'animal. Ces « porteurs asymptomatiques » représentent un risque potentiel de transmission du FMDV aux animaux sensibles. Les mécanismes d'établissement et de maintien de la persistance ne sont pas clairement élucidés à ce jour mais des travaux basés sur des approches *in vitro* indiquent une co-évolution du FMDV et des cellules-hôtes au cours de la persistance. Il y a par ailleurs un manque de connaissances spécifiques concernant la réponse antivirale innée chez les ruminants et son rôle possible dans l'établissement et/ou le maintien d'infections persistantes par le FMDV.

Dans le cadre du projet européen ANIHWA TRANSCRIPTOVAC nos travaux de recherche visent à étudier les interactions précoces entre le FMDV et l'hôte et plus particulièrement la réponse immune innée induite par ce virus et sa modulation dans le cadre d'une infection aiguë ou persistante dans un modèle de cellules épithéliales bovines, la lignée MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney).

Nous avons montré la permissivité de cette lignée au FMDV et avons établi des cellules MDBK infectées de manière persistante par un FMDV de type O, isolat O/FRA/1/2001. Dans le but d'identifier les interactions moléculaires spécifiques virus-hôtes intervenant au cours de l'infection aiguë ou persistante de cellules bovines, nous avons entrepris l'étude de l'« interactome » complet du FMDV de type O isolat O/FRA/1/2001 en cellule hôte bovine, par la méthode du double-hybride en levure. Dans ce but, nous avons initié le clonage, à partir de cette souche de FMDV, de l'ensemble des régions codant pour les protéines virales du FMDV O (système Gateway). Ces protéines seront alors utilisées comme « appâts » pour cribler une banque d'ADNc bovine établie à partir de la lignée MDBK. Les interactions moléculaires candidates identifiées à l'issue du crible, seront ensuite validées par une autre approche (co-immunoprécipitation/Western-blot et/ou de colocalisation par immunofluorescence, dans des cellules MDBK infectées (infection aiguë ou persistante). Ce travail pourra ensuite être étendu en comparant notamment les interactions établies par des protéines de FMDV persistants ou non persistants, de sérotypes différents et ou présentant des propriétés de virulence différentes.

Les données de cette étude devraient nous permettre de mieux comprendre la pathogenèse du FMDV par l'identification des voies de signalisation cellulaires modulées au cours de l'infection (aiguë ou persistante) et pourraient donc contribuer au développement de meilleures stratégies de contrôle de la fièvre aphteuse.

---

## CHARACTERIZATION OF IrSPI, A SERINE PROTEASE INHIBITOR IMPLICATED IN TICK FEEDING AND BACTERIAL INFECTION OF THEIR SALIVARY GLANDS: PRELIMINARY RESULTS.

ADRIEN BLISNICK, LADISLAV SIMO, MARGAUX VERHEYDEN, SARAH BONNET  
UMR BIPAR, 14 rue Pierre et Marie Curie, Maisons-Alfort, France

Despite the importance of ticks and tick-borne diseases in animal and human health, precise knowledge about pathogen transmission by ticks is significantly limited. Particularly, molecular interactions between the pathogens and their tick vector remain moreless a black box. Current control methods using acaricides do not seem to be effective due the potential development of resistance as well as risk of environmental contaminations. Therefore, finding new control strategies for arthropod vectors and diseases they transmit is the intermediate priority. One of the promising approach is, the vaccine strategy, targeting tick molecules as efficient antigens able to impair tick feeding and/or to block the pathogen transmission. Following this strategy, we identified potential vaccine candidates by selecting specific molecules that are up-regulated in *Ixodes ricinus* (one of the most important European vector) salivary gland after the invasion of the bacteria *Bartonella henselae* into this tissue. Using the transcriptomic tools, we identified IrSPI, an inhibitor of serine protease that belongs to the BPTI/kunitz protein family, representing the most up-regulated gene in the salivary gland after bacterial infection. Silencing of the IrSPI gene using the RNAi technique affected negatively both, tick blood feeding as well as bacterial infection of their salivary glands. Beside the salivary gland, a tissue specific reverse transcriptase-PCR showed the presence of IrSPI transcript in various visceral organs in tick body. In situ hybridization revealed that IrSPI mRNA is located in the limited number of cells containing secretory vesicles in salivary gland acini type II of partially fed *I. ricinus* female. The presence of secretory signal peptide motif of IrSPI, along with its localization in secretory cells of salivary gland supports the fact that IrSPI is secreted to host during the blood feeding. These findings strongly support our belief that IrSPI is a suitable candidate for the development of the vaccine against the tick and/or the pathogen they transmit. Future molecular and biochemical characterization of IrSPI, as our leading vaccine candidate against ticks, is now crucial for better understanding its biological function(s) in tick blood feeding and bacterial transmission.

---

## DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DE STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA EN PATHOLOGIE HUMAINE

CAMILLE CORLOUER<sup>1</sup>, MARINE DESROCHES<sup>1,2</sup>, JOSÉ VIVAS<sup>3</sup>, EMLA MEHIRI-ZGHAL<sup>4</sup>, OLIVIER LEMENAND<sup>5</sup>, JEAN-WINOC DECOUSSER<sup>1,2</sup> ET LE COLLÈGE DE BACTÉRIOLOGIE-VIROLOGIE-HYGIÈNE DES HÔPITAUX DE FRANCE

<sup>1</sup> Laboratoire de Bactériologie, Département de Microbiologie, CHU Henri MONDOR (94)

<sup>2</sup> Faculté de Médecine, UPEC (94)

<sup>3</sup> Laboratoire de Bactériologie, Hôpital de Santander, Cantabria (Espagne)

<sup>4</sup> Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Abderahman MAMI de pneumophthisiologie, Tunis, (Tunisie).

<sup>5</sup> Laboratoire de Bactériologie, CH de SAINT NAZAIRE (44)

**Introduction** : *Stenotrophomonas maltophilia* (Sm) est une bactérie environnementale opportuniste responsable d'infections chez le patient atteint de mucoviscidose et chez l'immunodéprimé. Sa multi-résistance naturelle aux antibiotiques favorise son émergence au sein d'une population hospitalière soumise à une forte pression de sélection. Les associations entre fond génétique et pouvoir pathogène sont peu explorées. Au-delà de sa diversité, la structuration populationnelle de Sm pourrait mettre en évidence un fond génétique commun chez certaines souches, notamment celles retrouvées chez les patients atteints de mucoviscidose.

**Objectif de l'étude** : décrire la sensibilité aux antibiotiques et la diversité génétique des souches de Sm responsables d'infections diagnostiquées à l'hôpital.

**Matériel et Méthode** : étude multicentrique (23 centres français, un centre en Tunisie et un en Espagne) prospective réalisée sur deux trimestres en 2013 et 2014. A partir d'un recueil de 235 souches, 83 ont été sélectionnées pour leur diversité clinique et géographique. Cet échantillon a été identifié par MALDI-TOF et caractérisé par antibiogramme (diffusion en milieu gélosé) et MLST. Une phylogénie par concaténation des 7 gènes de ménage utilisés pour le MLST a été également réalisée en enracinant l'arbre sur *S. rhizophila*.

**Résultats et discussion** : 83 souches ont été étudiées, provenant majoritairement de prélèvements respiratoires (42%) et d'hémocultures (22%) chez des patients dont l'âge variait entre 2 et 93 ans. Parmi ceux-ci, 12 souffraient de mucoviscidose. Les taux de résistances acquises étaient élevés, notamment pour les patients atteints de mucoviscidose ; les pourcentages de sensibilité étaient de 95% pour le cotrimoxazole, 83% pour la ciprofloxacine, de 43% pour l'association ticarcilline + acide clavulanique et de 70% pour la colistine. Parmi les 80 ST identifiés, 57 n'avaient jamais été décrits. La phylogénie globale montre une grande diversité génétique des souches étudiées, sans clusterisation nette associée à l'origine géographique ou clinique. Les souches de patients atteints de mucoviscidose (n=12) se répartissent de façon quasi homogène sur l'ensemble de l'arbre phylogénique.

**Conclusion** : les souches de Sm d'origine humaine identifiées en milieu hospitalier se caractérisent par (i) une fréquence élevée de résistances acquises aux antibiotiques notamment chez celles de patients atteints de mucoviscidose, (ii) une grande diversité génétique sans clusterisation liée à leur origine clinique, y compris pour celles de patients atteints de mucoviscidose. L'approche gagnerait d'une part à s'élargir à d'autres souches d'origine humaine mais aussi animale et environnementale, et d'autre part à remplacer l'approche restrictive du MLST par un core-génome élargi par séquençage du génome complet.

---

## LE SYSTÈME VERIS HBV QUANTIFIE AVEC EXACTITUDE LES DIFFÉRENTS GÉNOTYPES DU VIRUS DE L'HÉPATITE B

SLIM FOURATI<sup>1,2</sup>, DOMINIQUE CHALLINE<sup>1,2</sup>, JEAN DOMINIQUE POVEDA<sup>3</sup>, SYRIA LAPERCHE<sup>4</sup>, MAGALI BOUVIER-ALIAS<sup>1,2</sup>, ALEXANDRE SOULIER<sup>1,2</sup>, LILA POITEAU<sup>1,2</sup>, JEAN-MICHEL PAWLOTSKY<sup>1,2</sup>, STÉPHANE CHEVALIEZ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Centre National de Références pour les Hépatites virales B, C et delta, Laboratoire de Virologie Créteil, France

<sup>2</sup> INSERM U955, Créteil France

<sup>3</sup> Laboratoire Cerba, Cergy-Pontoise, France

<sup>4</sup> Centre National de Références pour les Hépatites virales B, C et delta, Institut National de la Transfusion Sanguine, Paris, France

**Buts du travail :** La détection et la quantification de l'ADN du Virus de l'hépatite B (VHB) sont indispensables au diagnostic et au suivi des patients atteints d'hépatite chronique B. Les techniques basées sur l'amplification en temps réel sont, aujourd'hui, les techniques de choix recommandées par les sociétés savantes internationales, du fait de leurs excellentes performances analytiques (sensibilité, spécificité, justesse et large intervalle de quantification linéaire) qui couvrent les besoins requis en pratique clinique. Cependant, les plateformes actuelles sont peu flexibles et nécessitent de grouper des échantillons par série. La plateforme VERIS offre une flexibilité supplémentaire avec un traitement instantané des échantillons permettant ainsi un rendu rapide du résultat (< 2 heures). Le but de ce travail était d'évaluer les caractéristiques intrinsèques du test moléculaire VERIS HBV.

**Méthodes :** La spécificité analytique a été évaluée à partir de 201 échantillons séronégatifs pour le VHB [absence d'antigène de surface du VHB (AgHBs) et d'anticorps anti-HBc]. La limite de détection a été déterminée par dilutions sériées du standard PHD802-03 de 30 UI/mL à 4 UI/mL, testées 20 fois (Seracare LifeScience). L'évaluation de la précision a été réalisée à partir du panel de linéarité PHD802 (Seracare LifeScience) qui contient 7 standards, chaque standard ayant été testé 3 fois. Afin d'évaluer la reproductibilité, deux niveaux de contrôle (« faiblement positif » et « fortement positif ») ont été quantifiés une trentaine de fois sur une période de 2 mois. L'influence du génotype du VHB sur la linéarité de quantification a été évalué à partir de 120 échantillons issus de patients infectés par différents génotypes du VHB (32 échantillons de génotype A, 7 de génotype B, 9 de génotype C, 34 de génotype D, 36 de génotype E, 2 de génotype F et 1 de génotype G) testés en parallèle à l'aide du test VERIS HBV et du test COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan (CAP/CTM) version 2.0.

**Résultats :** La spécificité de la trousse VERIS HBV était de 99.5% [intervalle de confiance 95% (IC95%) : 97.2 à 99.9%]. La limite de détection a été estimée à 7,5 UI/mL (IC 95% : 5,7-11,5 UI/mL) et était en accord avec celle fournie par le fabricant. En ce qui concerne la répétabilité et la reproductibilité, les coefficients de variation étaient respectivement compris entre 0,12%-3,64% et 1,03%-7,33%. La quantification de l'ADN du VHB à partir d'échantillons cliniques de différents génotypes du VHB testés en parallèle par le test VERIS HBV et COBAS CAP/CTM v2.0 montrait une excellente relation linéaire ( $r=0,97$ ,  $p<0,0001$ ). Une légère sous-quantification de l'ADN du VHB par la trousse VERIS a été observée dans 92 (76,7%) des 120 échantillons testés par rapport aux valeurs observées avec la trousse CAP/CTM v2.0 (différence médiane VERIS moins CAP/CTM v2.0 : -0.40 log UI/mL). Cette sous-quantification n'était pas liée au niveau de charge virale ou au génotype.

**Conclusions :** La trousse VERIS HBV est spécifique, sensible et reproductible. Elle permet une quantification exacte de l'ensemble des génotypes du VHB à partir d'échantillons plasmatiques. Ce test peut être utilisé en toute confiance pour la quantification de l'ADN du VHB en pratique clinique.

---

## CHLAMYDIACEAE IN FRENCH POULTRY FLOCKS: HOST PREFERENCE AND WORKERS EXPOSURE

HULIN, V.<sup>1</sup> ; BERNARD, P.<sup>2</sup> ; OGER, S.<sup>3</sup> ; VORIMORE, F.<sup>1</sup> ; AAZIZ, R.<sup>1</sup> ; CLÉVA, D.<sup>4</sup> ; DE BARBEYRAC, B.<sup>5</sup> ; BERRUCHON, J.<sup>3</sup> ; ROBINEAU, J.<sup>6</sup> ; DURAND, B.<sup>7</sup> ; SIARKOU, V.<sup>8</sup> ; SACHSE, K.<sup>9</sup> ; LAROUCAU, K.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University Paris-Est, Anses, Animal Health Laboratory, Bacterial Zoonoses Unit, Maisons-Alfort, France

<sup>2</sup> National Veterinary School, Oniris, Nantes, France

<sup>3</sup> Regional hospital, Les Oudairies, La Roche-sur-Yon, France

<sup>4</sup> Veterinary practice, L'Oie, France

<sup>5</sup> National Reference Center for Chlamydia, University of Bordeaux, Bordeaux, France

<sup>6</sup> SAS Breheret, La Poitevineière, France

<sup>7</sup> University Paris-Est, Anses, Animal Health Laboratory, Epidemiology Unit, Maisons-Alfort, France

<sup>8</sup> Laboratory of Microbiology and Infectious Diseases, School of Veterinary Medicine, Faculty of Health Sciences, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

<sup>9</sup> OIE Reference Laboratory for Chlamydiosis, Friedrich-Loeffler-Institut (Federal Research Institute for Animal Health), Jena, Germany

Avian chlamydiosis is a factor of economic loss to the poultry industry as well as a risk for zoonotic transmission to human. *Chlamydia psittaci* is the primary avian chlamydial pathogen. Although being mainly asymptomatic in birds, it can cause a disease called “psittacosis” in humans, with severe atypical pneumonia that leads to death in the most severe cases. Persons affected are mainly those whose occupations put them at risk of exposure, and a number of recent reports in France have confirmed that most of the human cases seemed to be linked to poultry. Currently there is evidence suggesting that avian chlamydiosis in poultry involves a new chlamydial agent, namely *C. gallinacea*. In order to evaluate the presence of Chlamydiaceae in poultry and the exposure of workers, surveys were conducted in two French poultry slaughterhouses and more specifically on mule duck flocks.

The results of both studies suggest: i) a host preference of *C. psittaci* and *C. gallinacea* for the ducks or other poultry species, respectively, in French flocks, and ii) a permanent but invisible exposure to *C. psittaci* for workers during all the poultry breeding process stages.

---

## A NEW ELISA ASSAY FOR GLANDERS DIAGNOSIS

KARINE LAROUCAU<sup>1</sup>, CLAIRE BERTIN<sup>1</sup>, MICKAEL ROCHE<sup>2</sup>, CÉCILE COLANERI<sup>1</sup>, RACHID AAZIZ<sup>1</sup>, MARCUS DIAS FALCÃO<sup>3</sup>, NORA MADANI<sup>1</sup>, PHILIPPE POURQUIER<sup>2</sup>, VANIA LUCIA SANTANA<sup>3</sup>, MOHAMMED SAQIB<sup>4</sup>, LOIC COMTET<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Anses, Animal health laboratory, Maisons-Alfort, France

<sup>2</sup> ID Vet, Montpellier, France

<sup>3</sup> Lanagro, Recife, Brazil

<sup>4</sup> Faculty of Veterinary Science, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan

Glanders is a zoonotic disease caused by *Burkholderia mallei*, a gram-negative bacterium. The internationally mandatory complement fixation test (CFT) for testing of equine sera is repeatedly leading to discrepant results. While false positive results pose a problem for diagnosticians, animal health authorities and owners, false-negative results can turn a risk into a possible threat.

An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on a native semi-purified antigenic fraction has been developed. Specificity was evaluated with sera from non-endemic areas and sensitivity was evaluated with sera coming from endemic areas. ELISA results were compared with CFT, Western-Blot and/or bacteriology.

Preliminary validation results showed an excellent specificity and a good sensitivity. External validation of the test in disease endemic areas (Pakistan, Brazil) as well as preliminary results will be presented.

This ELISA technique could be a good alternative to actual methods for the diagnosis of glanders.

---

## SUIVI DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE INDUITE PAR LA SOUCHE VACCINALE MIC1-3KO DE TOXOPLASMA GONDII, CHEZ SON HÔTE DÉFINITIF : LE CHAT.

DELPHINE LE ROUX<sup>1,2</sup>, VITOMIR DJOKIC<sup>2</sup>, SOLEN MORISSE<sup>3</sup>, CLÉMENT CHAUVIN<sup>1</sup>, VANESSA DORE<sup>4</sup>, FANNY BOURSIN<sup>3</sup>, AURÉLIE GRASSET-CHEVILLOT<sup>2</sup>, SÉBASTIEN PERROT<sup>4</sup>, ISABELLE VALLEE<sup>2</sup>, EDOUARD SECHE<sup>3</sup> AND RADU BLAGA<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Université Paris-Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR BIPAR, F-94700, Maisons-Alfort, France.

<sup>2</sup> Anses, Laboratoire de Santé Animale, UMR BIPAR, F-94700 Maisons-Alfort, France.

<sup>3</sup> Vitamféro, Université François Rabelais - UFR des Sciences Pharmaceutiques, F-37200 Tours, France.

<sup>4</sup> Université Paris-Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, BioPôle Alfort, F-94700, Maisons-Alfort, France.

La toxoplasmose est l'une des zoonoses parasitaires les plus répandues dans le monde. Elle est due à au parasite protozoaire, *Toxoplasma gondii*. C'est une maladie zoonotique d'importance majeure, de par son impact médical, économique et sociétal. Plus de 50% de la population humaine la contracte, le plus souvent sans signe clinique et entretient une toxoplasmose chronique asymptomatique pour le reste de sa vie [1-3]. L'infection humaine se fait principalement par voie orale, soit par ingestion d'oocystes extrêmement résistants, rejetés par les chats et les autres félinés (hôtes définitifs, HD) dans l'environnement souillant fruits, légumes ou eau de boisson ; soit par consommation de viande mal cuite contenant des kystes tissulaires à bradyzoïtes [1,5]. Les chats et les félinés en général, sont donc la source principale de contamination de l'environnement et du bétail. En 1999, un premier essai de vaccination de chats sauvages autour d'un élevage de porcs avec une souche mutante du parasite a clairement démontré une corrélation entre la réduction du nombre d'oocystes dans l'environnement et une diminution de contamination de la viande porcine [6]. Cette expérience a montré pour la première fois l'intérêt de vacciner les chats contre *T. gondii* afin de diminuer la contamination du bétail et de fait, protéger le consommateur de viande.

Nous avons effectué une vaccination expérimentale de chats en utilisant une souche vivante atténuée de *T. gondii* [7,8]. Cette souche vaccinale a été administrée soit de façon sous cutanée ou par voie orale, et nous avons suivi la réponse immunitaire des animaux suite à la vaccination. Les deux voies d'administration ont induit une production d'anticorps spécifiques à un titre élevé dans le sérum des chats, indiquant que la souche vaccinale est hautement immunogène. Cependant, la voie orale requiert un plus grand nombre de parasites pour induire la production d'anticorps, par rapport à l'administration sous-cutanée. Un retard dans la production d'anticorps a été également observé lorsque la souche vaccinale a été administrée par voie orale. Il est couramment admis que les anticorps spécifiques de *T. gondii* sont protecteurs contre une nouvelle contamination, chez les hôtes intermédiaires du parasite. Nous avons donc suivi l'excrétion d'oocystes par les chats vaccinés présentant des titres élevés d'IgG, après un test d'épreuve avec une souche sauvage de *T. gondii* (76K). De manière surprenante, des niveaux élevés d'IgG anti-*T. gondii* n'empêchent pas l'excrétion d'oocystes, indépendamment de la voie de vaccination. Ce résultat surprenant met en évidence la relation particulière et unique entre *T. gondii* et son hôte définitif, ce que nous étudions actuellement au niveau intestinal.

1. Tenter AM, et al. *Int J Parasitol* 2000, 30:1217-1258.

2. Innes EA. *Zoonoses Public Health* 2010, 57:1-7.

3. Robert-Gangneux F, Darde ML. *Clin Microbiol Rev* 2012, 25:264-296.

4. Dubey JP. *Toxoplasmosis of animals and humans*. 2010, 2nd edition.

5. Jones, J. L. & Dubey, J. P. *Foodborne toxoplasmosis*. *Clin. Infect. Dis.* 55, 845–851 (2012).

6. Mateus-Pinilla NE, et al. *J Parasitol* 1999, 85:855-860.

7. Ismael, A. B. et al. *J. Infect. Dis.* 194, 1176–1183 (2006).

8. Mévélec, M.-N. et al. *Vet. Res.* 41, 49 (2010).

---

## **MODÉLISATION IN VITRO DE L'INFECTION PAR LE VIRUS DE L'ENCÉPHALITE À TIQUES EN UTILISANT DES CELLULES NEURALES PRIMAIRES HUMAINES**

**MAZIGH FARES, MARIELLE COCHET, SARA MOUTAILLER, NADIA HADDAD, MURIEL COULPIER**

**UMR 1161 INRA-ANSES-ENVA Virology, Ecole Nationale vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France**

Le virus de l'encéphalite à tiques (TBEV) est l'arbovirus le plus important d'un point de vue médical en Europe et Asie du Nord-Est. De plus, on assiste actuellement à son expansion en Europe Centrale et en Europe du Nord. Comme d'autres Flavivirus vectorisés, il est responsable d'encéphalites pour lesquelles il n'existe actuellement aucun traitement efficace. Les modèles animaux in vivo et in vitro ont permis d'apporter des éléments importants de connaissance des interactions entre TBEV et leurs hôtes, mais ils sont limités par l'existence de variations inter-espèces. Disposer de modèles humains pour étudier les mécanismes par lesquels ce virus, ou d'autres Flavivirus, se propagent et endommagent le cerveau humain ou encore pour identifier des molécules antivirales est donc primordial pour le développement de thérapies adéquates applicables à cette zoonose. Pour répondre à cette problématique, nous avons développé des cultures mixtes de neurones et astrocytes primaires dérivés de progéniteurs isolés de fœtus humain. Nous montrerons ici nos premiers résultats de modélisation in vitro de l'infection par TBEV du système nerveux central humain.

---

## DES DONNÉES DE SÉQUENÇAGE DE GÉNOME COMPLET AU DÉVELOPPEMENT D'UN OUTIL DE TYPAGE

LORRAINE MICHELET<sup>1</sup>, AMANDINE HAUER<sup>1</sup>, THIERRY COCHARD<sup>2</sup>, MAXIME BRANGER<sup>2</sup>, FRANCK BIET<sup>2</sup>, MARIA-LAURA BOSCHIROLI<sup>1</sup>

INRA, UMR BIPAR, ANSES ENVA INRA, 14 rue Pierre Curie, 94 700 Maisons-Alfort

<sup>1</sup> LNR Tuberculose, UZB, Laboratoire de Santé animale, Anses, Maisons-Alfort

<sup>2</sup> UMR1282, Infectiologie et Santé Publique (ISP-311), INRA, Nouzilly

*Mycobacterium bovis*, membre du complexe *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC), est l'agent responsable de la tuberculose bovine. Cet agent pathogène est connu pour être hautement clonal. Par conséquent les études épidémiologiques sont difficiles avec les outils de typages classiques (spoligotypage et VNTR). De nouveaux outils de typage, notamment basés sur des données de WGS (whole genome sequencing), sont donc indispensables pour discriminer rapidement les souches de *M. bovis*.

Le WGS de 83 souches de *M. bovis*, représentant la diversité génétique des souches françaises (6 différents groupes clonaux) a été réalisé. Tous les génomes ont été alignés sur la séquence de référence *M. bovis* AF2122. Nous avons identifié les SNPs (single nucleotide polymorphism) et étudié plus précisément le ratio dN/dS. Nous avons porté un intérêt particulier à un groupe de gènes, connus pour jouer un rôle dans la virulence, la différenciation ou la survie de la bactérie.

Les analyses réalisées ont montré un nombre élevé de SNPs, cohérent avec la grande variabilité des souches françaises. Une sélection de SNPs a été réalisée selon plusieurs critères : (i) SNPs permettant de typer et classer les souches dans les différents groupes clonaux, (ii) SNPs localisées dans les gènes impliqués dans la virulence et la plasticité des souches. Ces SNPs seront utilisés dans le développement d'un nouvel outil de typage basé sur le séquençage ciblé combinant les technologies de l'Access Array et du MiSeq.

Les données obtenues de ces 83 génomes seront donc utilisés afin de mieux comprendre l'épidémiologie de *M. bovis* en France et de développer un nouvel outil qui sera utilisé sur un plus grand nombre de souches de la collection française. Cette méthode basée sur l'analyse des SNPs sera très utile, notamment dans le cas de souches fortement clonales circulant dans des régions endémiques.

---

## PERSISTENCE OF HIV MINORITY RESISTANT VARIANTS IN DNA OF TREATED PATIENTS BY UDS

CHRISTOPHE RODRIGUEZ, MARIE LAURE NÉRÉ, VANESSA DEMONTANT, MÉLANIE MERCIER-DARTY, MARION SPLITTGERBER, MAUD SALMONA, ISABELLE CHARREAU, MARIE LAURE CHAIX, JM MOLINA, AND C DELAUGERRE

Virology & INSERM Unit U955, Henri Mondor Hospital, Créteil, France

**Background:** In patients on effective antiretroviral therapy with previously therapeutic failure with drug-resistance mutations (DRM) detected in plasma, standard genotypic test performed in HIV-cellular DNA detects fewer resistance mutations. The underestimation of drug resistance mutation has implications for patient management, particularly in case of switch. The low detection of DRM could be due to the lack of sensitivity of Sanger sequencing that cannot detect DRM present on variants below 20% of the viral population. Ultra deep sequencing (UDS) is a powerful tool able to detect minority resistant variants (MRV) with a threshold of 1%. Our aim is to compare HIV DNA resistance mutations using UDS at two thresholds (> 20% that is considered as the Sanger sequencing cut off and >1% for the detection of MRV) in well-controlled patients with multiple DRM detected in plasma.

**Methods:** We included 169 extensively treated patients from the ANRS-EASIER. All of them had already received three antiretroviral drug classes (NRTI, NNRTI and PI) and had plasma HIV-1 RNA < 400 copies/ml at inclusion. Protease (PR) and reverse transcriptase (RT) genes were amplified on HIV DNA from whole blood using ANRS protocol. RT (804 bp) and PR (548 bp) amplicons were sequenced using UDS by Roche/454 GS FLX+. Sequences were analyzed using AVA software (Roche) and in house software PyroPack® for RT and PR. Detection of mutations were analyzed using two cut off (20% and 1%). Drug resistance interpretation was according to the 2015 French ANRS algorithm. We present here the results provided from the 84 first patients.

**Results:** We obtained 82 PR sequences (mean reads 5300, mean length 474 bp) and 78 RT sequences (mean reads 9000, mean length 496 bp). Median number of DRM at 20% and 1% respectively was 5 and 6 for NRTI mutations, 1 and 1 for NNRTI mutations and 8 and 11 for PI mutations. Using the 1% threshold, number of patients harboring resistance to at least one antiretroviral increased from 59 to 68 patients for NRTI, from 52 to 64 patients for NNRTI and from 56 to 69 patients for PI, respectively.

In 15 patients (18%), we described at least one stop codon in RT (n=14) and/or PR (n=3) sequences. For 5 out of 15 patients, the stop codons were detected in more than 60% of the viral population.

**Conclusion :** In this study, archived DRM detection was observed more frequently for each resistance codon in RT and PR gene using UDS compared to classic Sanger sequencing. Resistance to RT and PI inhibitors increased for 13 % to 20% and could jeopardize antiretroviral regimen in case of treatment switch. UDS sequencing may be use to detect archive DRM in HIV DNA in clinical practice.

DRM were reported at all major and minor codons in RT and PR genes at both threshold 20% and 1% according to the highly experienced patients.

---

## PREDICTION OF NUCLEOTIDE ANALOGUE TREATMENT OUTCOME IN PEDIATRIC PATIENTS BY MEANS OF EVOLUTIONARY INFERENCE OF HBV PreC/C DOMAIN

CHRISTOPHE RODRIGUEZ, ETIENNE AUDUREAU, MELANIE MERCIER-DARTY, STEPHANE CHEVALIEZ, JEAN-MICHEL PAWLOTSKY

Virology & INSERM Unit U955, Henri Mondor Hospital, Créteil, France

**Introduction:** Nucleos(t)ide analogues (NUC) are the standard treatment for chronic hepatitis B in pediatric patients.

However, predictors of success, that could guide treatment indications, are lacking. The HBV PreC/C region plays a key role in the regulation of the HBV lifecycle. GOAL: To assess, by means of ultra-deep sequencing, whether the PreC/C region sequence impacts on treatment outcomes, including HBe seroconversion, HBV DNA level decrease and ALT normalization, in NUC-treated pediatric patients with long-term follow-up.

**Methods:** 157 pediatric patients (103 males, 54 females, median age 13.1) with chronic HBeAg-positive hepatitis B were studied. They were treated with adefovir dipivoxil, 10 mg qd, and followed for a median of 136 weeks (48 to 192). The HBV PreC/C domain sequence was determined, from serial samples taken at D0 and on treatment, by means of ultra-deep sequencing using GS FLX (Roche/454). Sequence data were analyzed with Pyropack®. General linearized methods and classification methods were used with cubic spline smoothing and interpolation algorithms to assess the predictive role of signature sequences at baseline and of their on-treatment kinetics.

**Results:** Ultra-deep sequencing generated 235 million-base PreC/C sequences from 339 serial samples. A molecular signature at positions 1742 and 1743 was associated with age ( $p < 10E-4$ ). The HBV DNA level decrease at week 48 was only associated with a mutation at position 1764 ( $p < 10E-4$ ). HBe seroconversion at week 48 was associated with mutations at positions 1762 ( $p = 0.02$ ) and 1764 ( $p = 0.04$ ) in the basal core promoter region. In patients  $>12$  years ( $N = 75$ ), 3 groups of baseline mutations were significantly associated with long-term ALT normalization ( $p < 0.05$ ) including: (i) mutations at positions 1742 and 1743, within the positive regulator domain of CURS-B that belong to the basal core promoter, independently of patient age; (ii) mutations at positions 1757/1759/1769 and 1773 within the AT-rich domain that binds TATA-binding protein, a domain critical for HBe protein transcription, and (iii) the stop codon mutation at position 1896 in the PreC region. Kinetics analysis confirmed the implication of these positions in identifying four patient profiles with distinct mutation evolutions, associated with age ( $p < 10E-3$ ) and predictive of subsequent clinical outcomes (viral load decrease at week 48, long-term ALT normalization,  $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** In pediatric patients, clinical and virological NUC-treatment outcomes appear to be related to signature sequences in the PreC/C domain that are directly or indirectly involved in HBe antigen expression. PreC/C sequencing may be used to guide treatment decisions.



## Avec la participation de :

- Jean Armengaud (CEA)
- Didier Raoult (IHU Méditerranée)
- Béhazine Combadière (Cimi-Paris)
- Jean-Christophe Audonnet (Merial)
- Bertrand Schwartz (ANR)
- Alice Bousselet (Aviesan)

## Comité scientifique :

### ■ Agents infectieux :

- Jean-Michel Pawlotsky (UPEC)
- Jean-Winoc Decousser (UPEC)
- Patrick Fach (Anses)
- Muriel Vayssier-Taussat (INRA)
- Damien Vitour (Anses)

### ■ Vaccins :

- Jean-Daniel Lelièvre (UPEC)
- Nabila Seddiki (UPEC)
- Bernard Klonjowski (EnvA)
- Jennifer Richardson (INRA)
- Sophie Le Poder (EnvA)

Plus d'informations sur le pôle **SANTÉ & SOCIÉTÉ** et ses journées sur :

<http://journee-sante-societe.fr>

**Comité d'organisation :** Pascal Boireau (Anses), Jean-Daniel Lelièvre (UPEC), Bernard Klonjowski (EnvA), Jean-Michel Pawlotsky (UPEC), Romain Gherardi (UPEC), Christine Huynh (UPEC), Rachid Aaziz (Anses)

### Membres du pôle Santé & Société :



### Sous le parrainage de :



### Avec le soutien de :

