

Evolution du *Cyprinid herpesvirus 3* au cours de passages en série en culture cellulaire incluant un stress thermique

Nurul Novelia Fuandila¹, Floris Schatt², Marie-Ka Tilak¹, Arnaud Soulier³, Masters IMHE, Bioinformatique et Eco-Epi (promos M1 2023 et 2024)³, Catherine Breton⁴, Camélia Sennaoui³, Anna-Sophie Fiston-Lavier¹, Anne-Sophie Gosselin-Grenet^{2*} et Jean-Christophe Avarre^{1*}

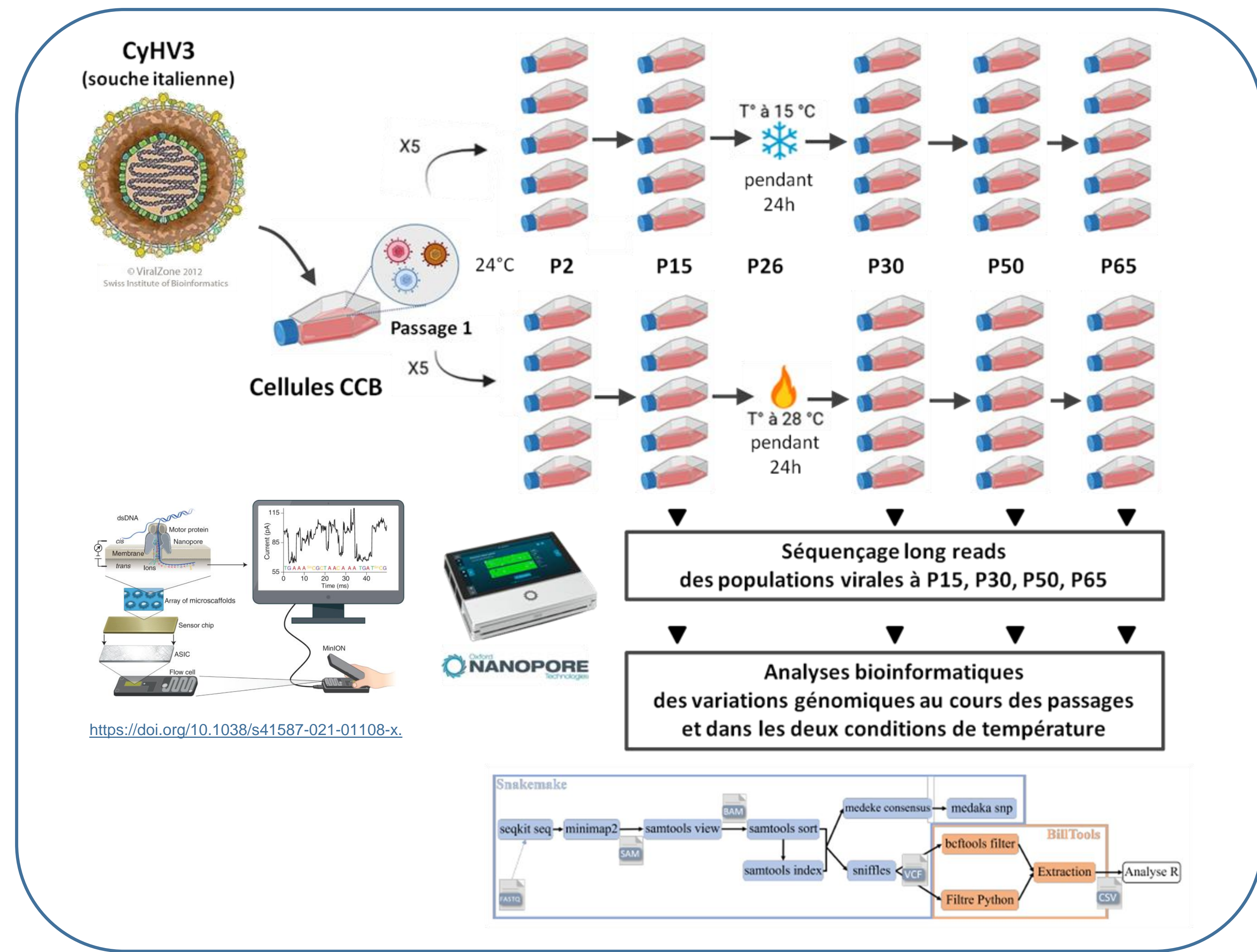
¹ISEM, Univ Montpellier, CNRS, IRD, Montpellier, France * auteurs correspondants
²DGIMI, Univ Montpellier, INRAE, Montpellier, France
³Univ Montpellier, Faculté des Sciences, Montpellier, France
⁴CGIAR System Organization, Montpellier, France

INTRODUCTION

L'importance des variations structurales (VS) dans la diversité génétique et l'évolution des virus est encore largement sous-estimée. Pour aborder cette question, nous avons étudié l'évolution *in vitro* du *Cyprinid herpesvirus 3* (CyHV3), un herpesvirus hautement pathogène pour la carpe commune et la carpe koï, dont le génome est un ADN double brin linéaire de très grande taille (295 000 paires de bases).

Pour cette étude, un isolat italien du CyHV3 a été propagé dans 10 sous-cultures identiques de cellules de carpe CCB, puis passé en série 65 fois, à raison d'un passage par semaine. Au passage 26 (P26), un stress thermique a été appliqué pour évaluer son effet sur la dynamique des variations génomiques (Figure ci-contre). Le séquençage en lectures longues (technologie Oxford Nanopore) des 10 sous-cultures à P15, P30, P50 et P65 a été réalisé, et les variations structurales ont été recherchées par comparaison avec le génome de référence KHV-U.

Cette étude, qui contribue aux connaissances sur les mécanismes d'évolution des grands virus à ADN, présente l'originalité d'avoir impliqué les étudiants de plusieurs masters de l'Université de Montpellier dans le cadre d'un projet pédagogique innovant et collaboratif (projet BILL, voir en bas de poster).



I - Profondeur et couverture du séquençage

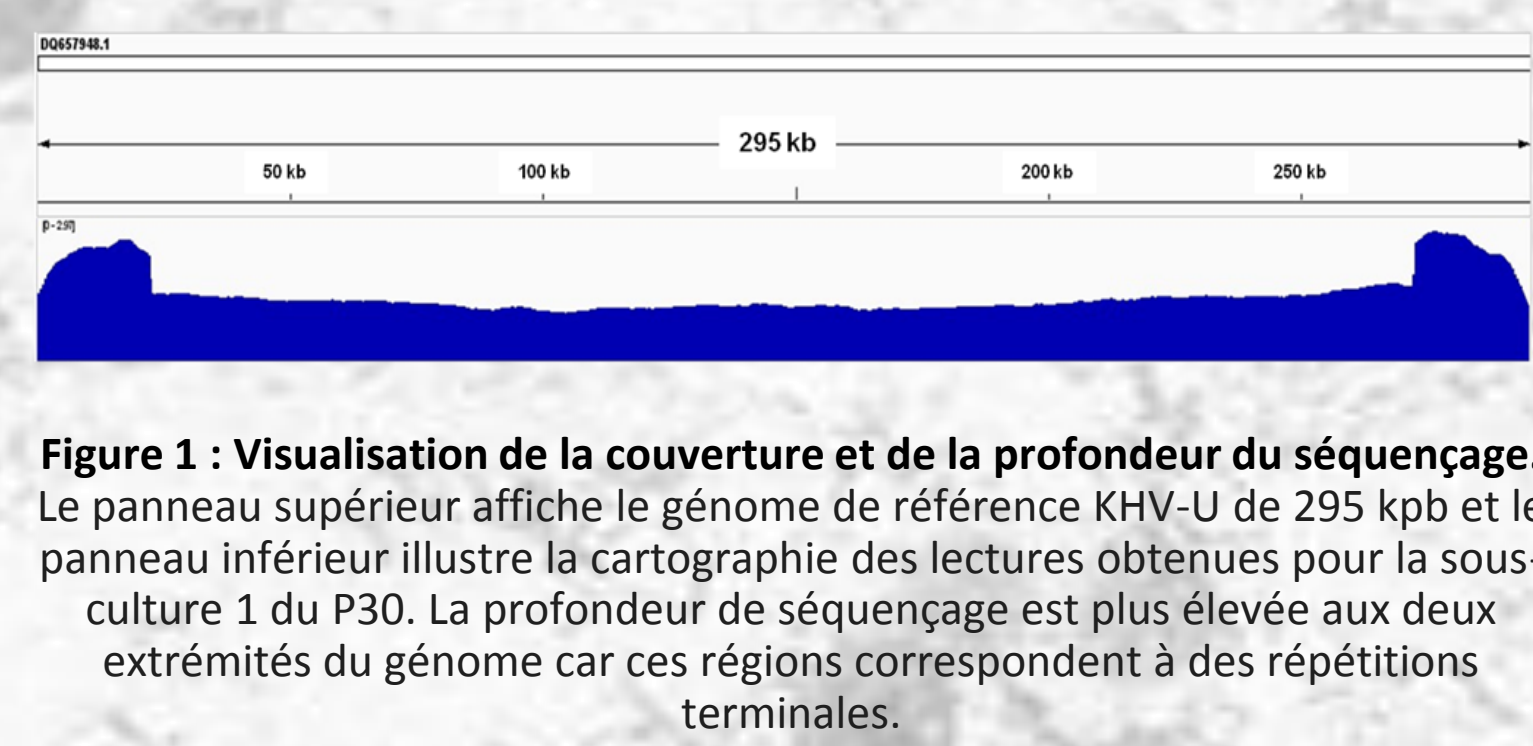


Table 1 : Profondeur du séquençage en fonction des passages. La moyenne de profondeurs de séquençage a été calculée pour les 10 sous-cultures de chaque passage.

Passage	Profondeur (X)		
	moyenne	min	max
P15	1750	348	3944
P30	3502	1243	5644
P50	1296	425	2775
P65	342	85	833

Figure 1 : Visualisation de la couverture et de la profondeur du séquençage. Le panneau supérieur affiche le génome de référence KHV-U de 295 kpb et le panneau inférieur illustre la cartographie des lectures obtenues pour la sous-culture 1 du P30. La profondeur de séquençage est plus élevée aux deux extrémités du génome car ces régions correspondent à des répétitions terminales.

✓ Dans l'ensemble, les génomes étaient entièrement couverts par les données de séquençage (Fig. 1) avec des profondeurs moyennes variant de 342X à 3 502X selon les sous-cultures (Table 1).

II - Nature, localisation et fixation des variations structurales au cours des passages

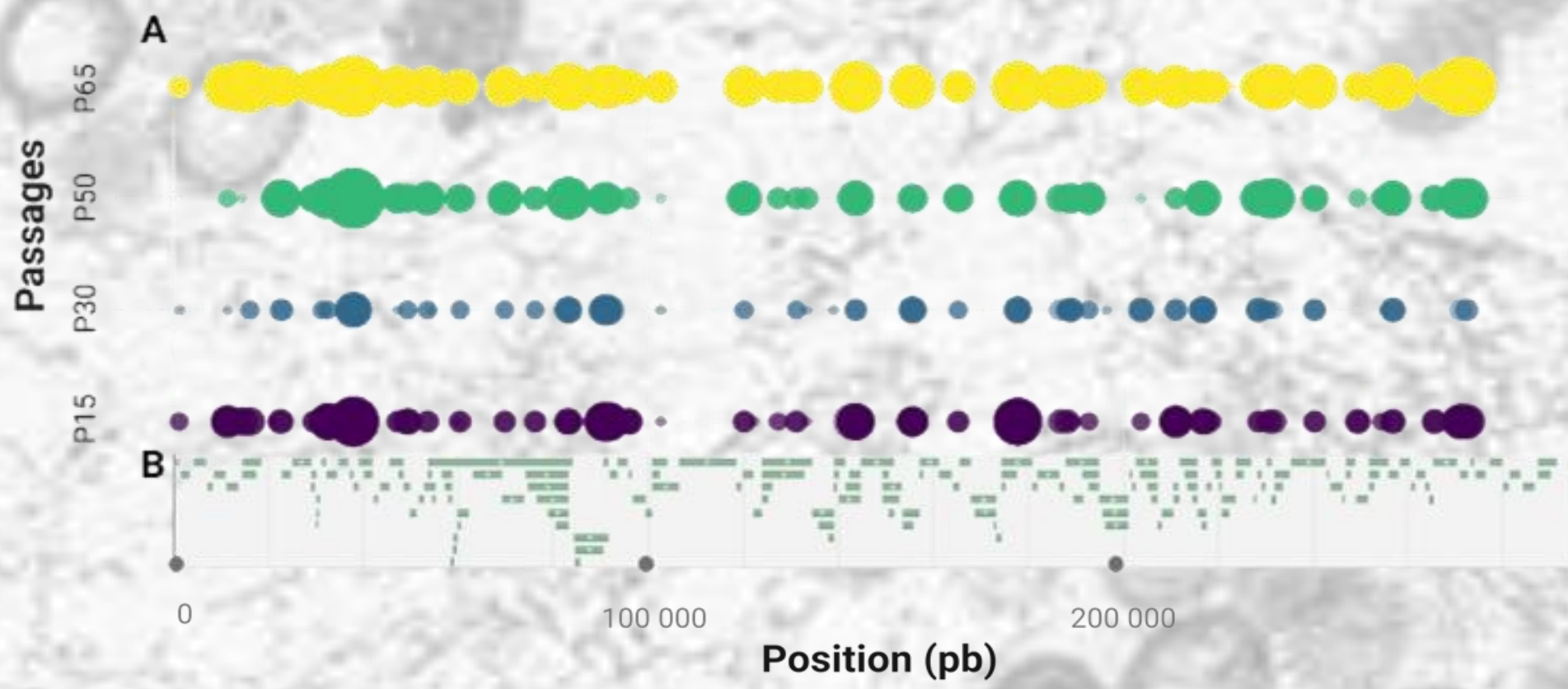


Figure 2 : Répartition des variations structurales sur le génome du CyHV-3. Localisation (A) des variations structurales pour les différents passages et (B) des différents gènes sur le génome de référence KHV-U. Les cercles jaunes, verts, bleus et violets correspondent aux passages P65, P50, P30 et P15, respectivement. La taille du cercle est proportionnelle au nombre de variations.

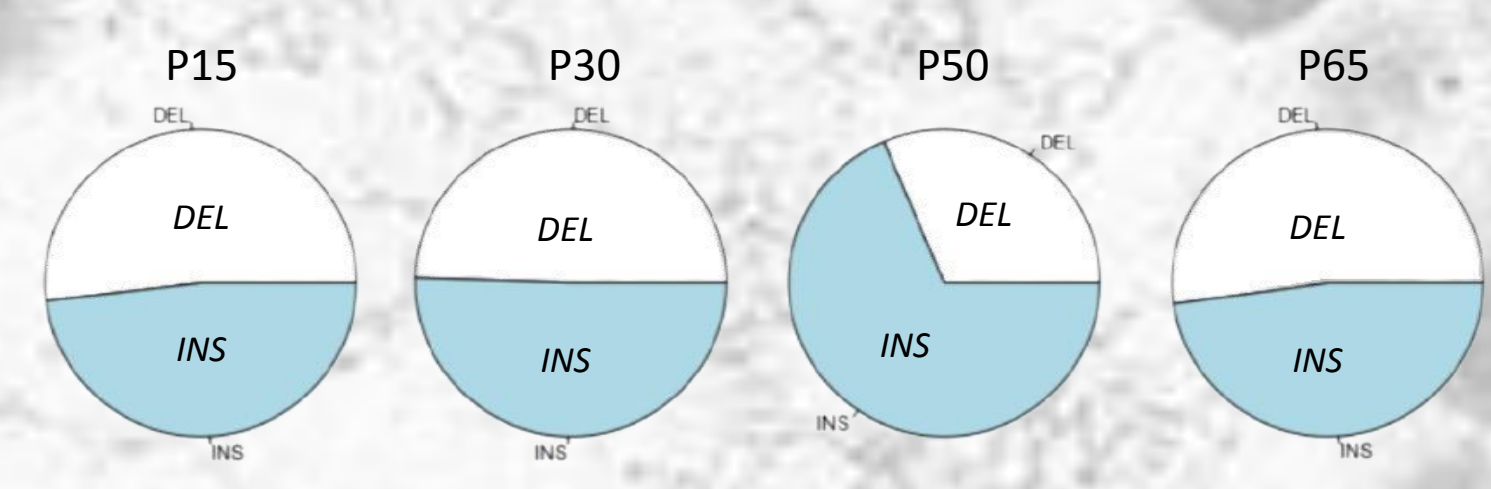


Figure 3 : Nature des variations structurales au cours des passages. DEL = délétions (blanc), INS = insertions (bleu).

✓ La distribution des VS est relativement homogène le long du génome, avec des pics d'abondance plus élevés observés autour de 45, 90, 180 et 220 kpb, ainsi que dans les répétitions terminales (Fig. 2). La majorité des VS consiste en des insertions et délétions, avec une très faible proportion de duplications (Fig. 3). Les VS s'accumulent entre P30 et P65 et près d'un tiers est partagé entre les 4 passages (Fig. 4).

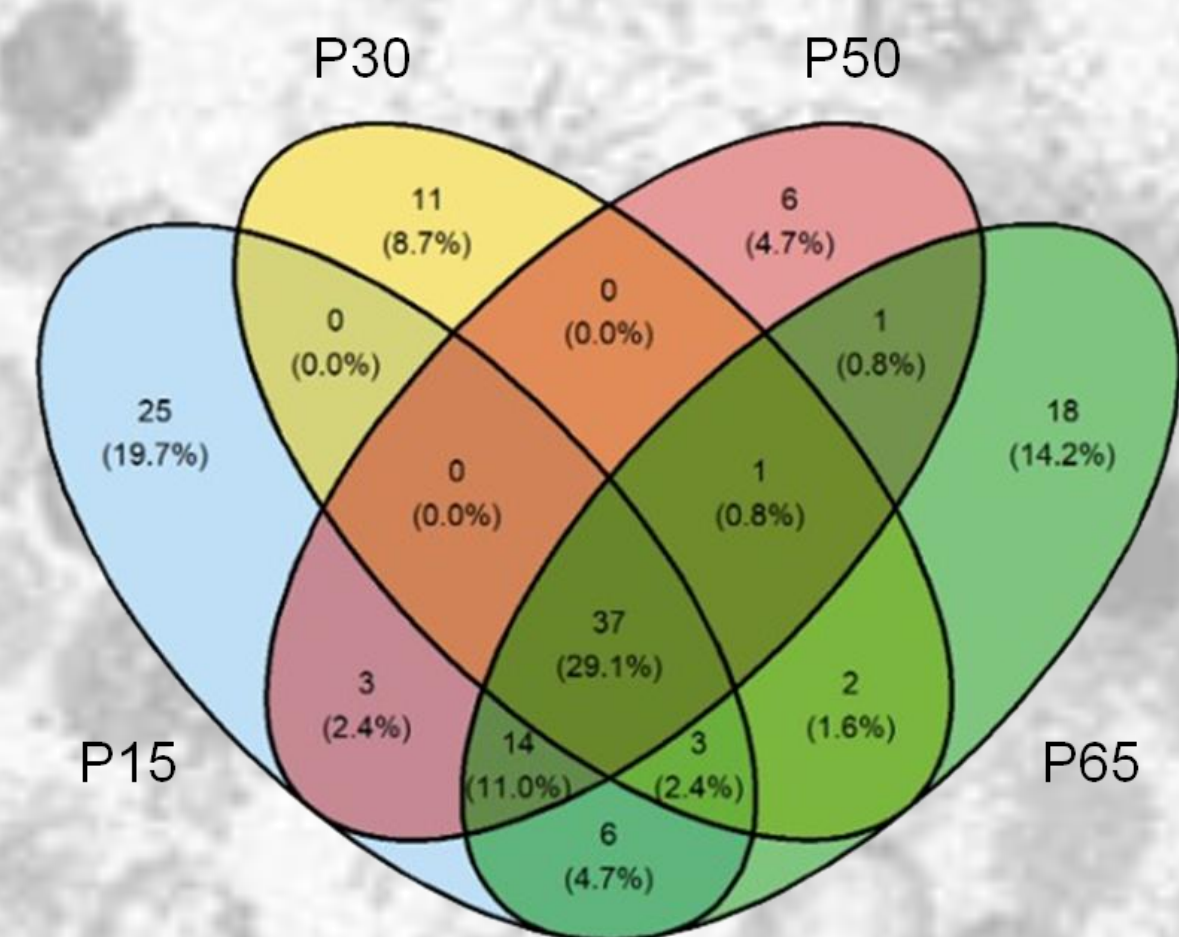


Figure 4 : Diagramme de Venn présentant le nombre de variations partagées entre les passages. Les variations structurales des P15, P30, P50 et P65 sont dans des ellipses bleue, jaune, rose et verte, respectivement.

III - Dynamique des variations structurales au cours des passages et impact des stress thermiques

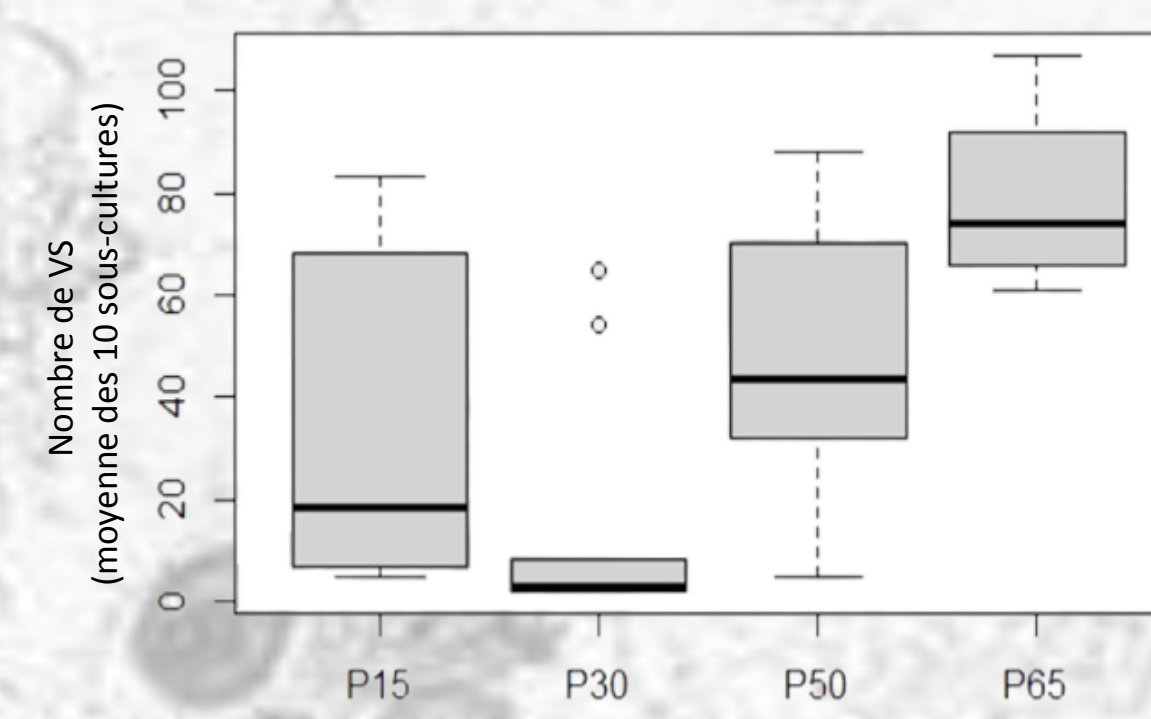


Figure 5 : Nombre total de variations structurales au cours des passages. Le nombre de VS est significativement plus faible pour le passage P30 par rapport aux autres passages.

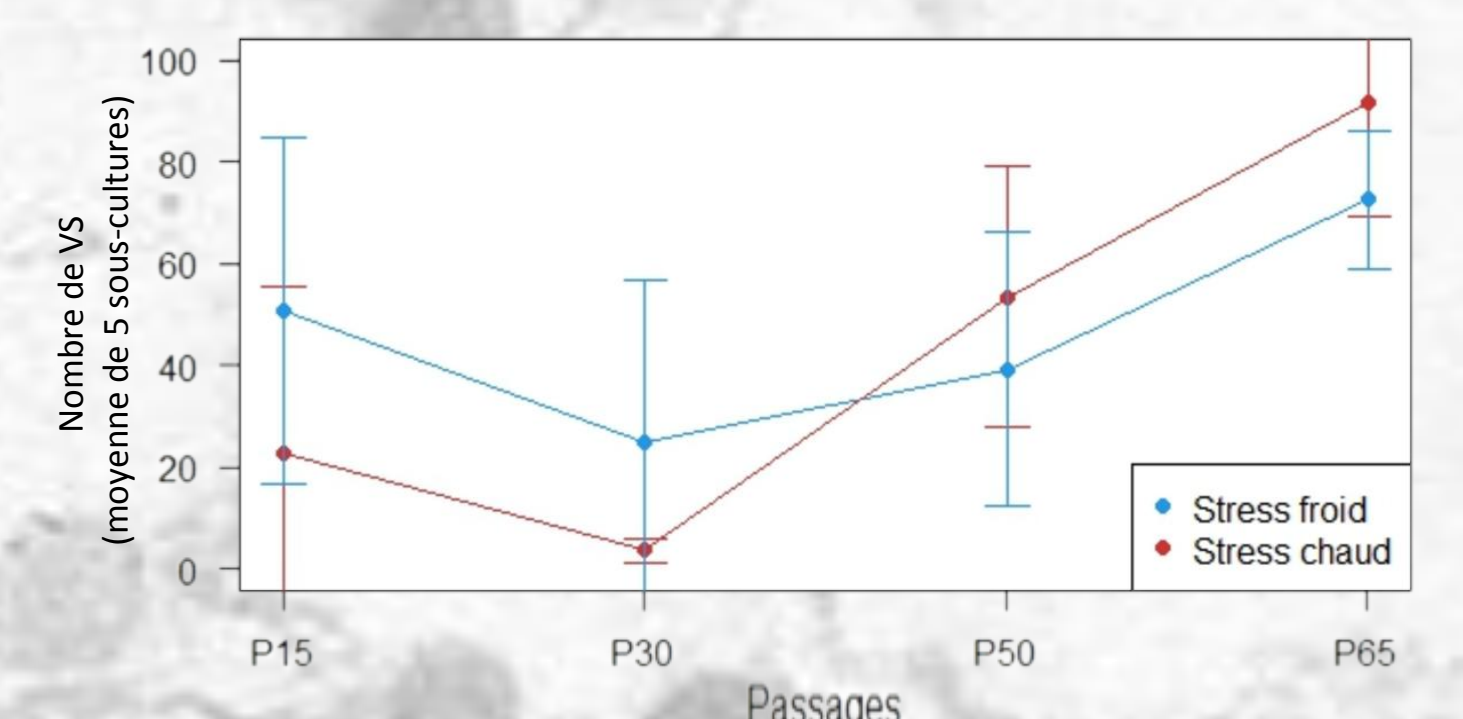


Figure 6 : Impact des stress thermiques sur la moyenne du nombre de variations structurales au cours des passages.

✓ L'application d'un stress thermique induit une réduction du nombre de VS. Cependant, l'absence de différence entre les deux séries de sous-cultures suggère que les deux types de stress thermique induisent le même effet réducteur sur l'accumulation des VS.

IV - Analyse des variations structurales

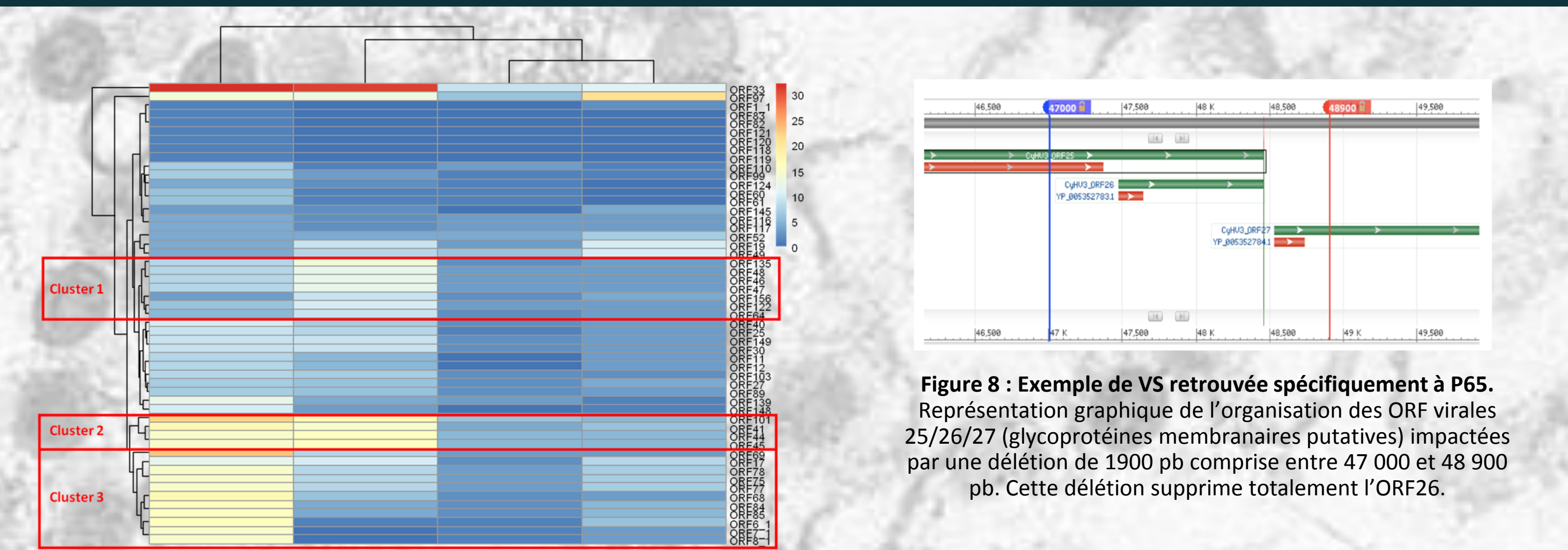


Figure 7 : Classification Ascendante Hiérarchique du nombre de variations structurales basée sur les passages (axe horizontal) et les gènes (axe vertical). Les couleurs représentent des gammes de nombre de VS. Les passages P15 et P30 sont groupés dans un même cluster. L'ORF33 est celle qui se distingue le plus des autres avec un nombre de VS particulièrement élevé à P50 et P65 (>30). Dans le cas du P50, le plus grand nombre de VS concerne les ORF 135, 48, 46, 47, 156, 122, 64 (cluster 1) et les ORF 101, 41, 44, 45 (cluster 2). Pour P65, la hiérarchisation se fait au niveau du cluster 2 et du cluster 3, constitué des ORF 69, 17, 78, 75, 77, 68, 84, 85, 6_1, 7_1 et 8_1. Le cluster 1 présente un nombre de variants qui diminue entre P50 et P65.

✓ Parmi les 82 positions sur lesquelles les différents variants sont observés, 53 sont dans des séquences codantes, dont 28 codent pour des protéines putatives. Les ORF associées aux positions décrites ont été analysées par paratubérisation (Fig. 7). Certaines ORF sont caractérisées par un nombre élevé de VS, qui augmente au cours des passages. C'est le cas de l'ORF33 qui code pour une protéine putative de l'ADN terminase impliquée dans l'encapsidation de l'ADN viral. D'autres ORFs présentent des VS qui apparaissent spécifiquement à P65, notamment la délétion dans les ORF 25/26/27 qui codent pour des glycoprotéines putatives (Fig. 8).

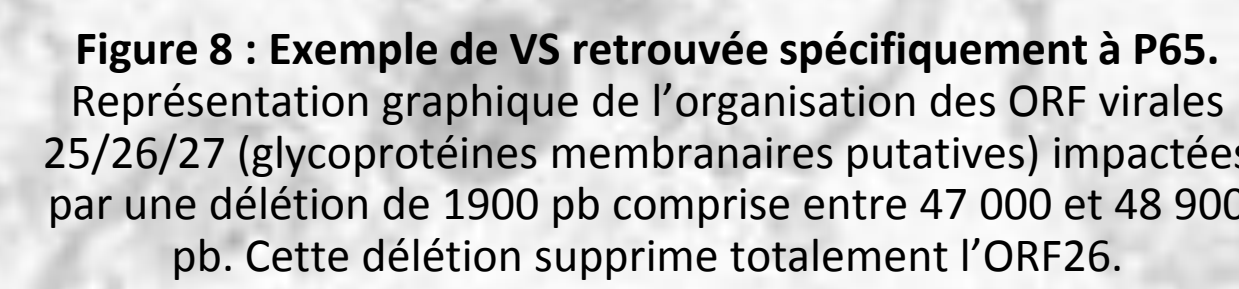


Figure 8 : Exemple de VS retrouvée spécifiquement à P65. Représentation graphique de l'organisation des ORF virales 25/26/27 (glycoprotéines membranaires putatives) impactées par une délétion de 1900 pb comprise entre 47 000 et 48 900 pb. Cette délétion supprime totalement l'ORF26.

Conclusion et perspectives : Le séquençage en lectures longues des variants viraux de CyHV3 issus de 10 sous-cultures de CCB passées 65 fois, a révélé que les VS, dont le nombre est relativement faible à P15, diminue à P30 pour augmenter à nouveau significativement à P50 et P65. L'application d'un stress thermique, froid ou chaud, réduit ainsi la dynamique d'accumulation des VS. Les VS, qui consistent en des insertions et délétions, s'accumulent avec une distribution relativement uniforme le long du génome, mais avec quelques hotspots, notamment dans les répétitions terminales. Les ORF impactées codent selon les cas pour des protéines putatives de l'enveloppe virale, des protéines impliquées dans la réplication virale, l'encapsidation du génome viral ou l'échappement à la réponse anti-virale. Cette étude, actuellement en cours de finalisation, contribue aux connaissances sur les mécanismes de la diversité génétique et de l'évolution viraux, essentielles pour développer des stratégies préventives telles que la mise au point de vaccin contre l'herpesvirose de carpe (Klaffack *et al.*, 2019, 2022; Fuandila *et al.*, 2022, 2023).

