

Virome humain

Master Sciences et Santé

UE Microbiologie- Pathologies

Jeudi 15 février 2024

Dr Céline Bressollette-Bodin – Service de virologie, CHU Nantes, Nantes Université

Objectifs

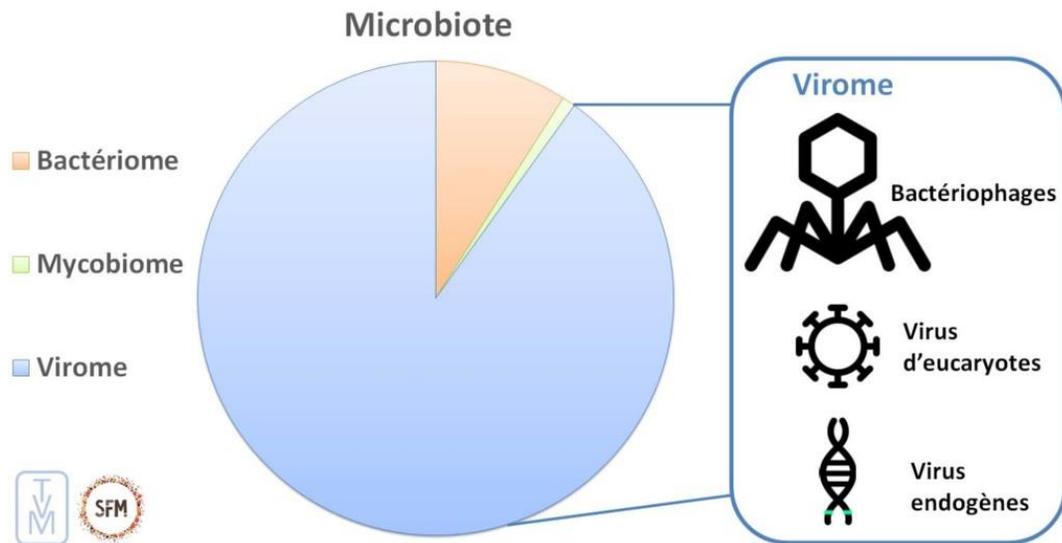
- Expliquer les principes des techniques de métagénomique, appliquées à l'étude du virome
- Citer les différents composants du virome humain (virus « humains » vs phages, virus intracellulaires vs extracellulaires)
- Citer quelques exemples de virus associés à des grands compartiments biologiques (HPV/peau, Anellovirus,...)
- Expliquer en se basant sur quelques exemples, en quoi la composition du virome peut être le reflet de situations pathologiques

Le Virome humain

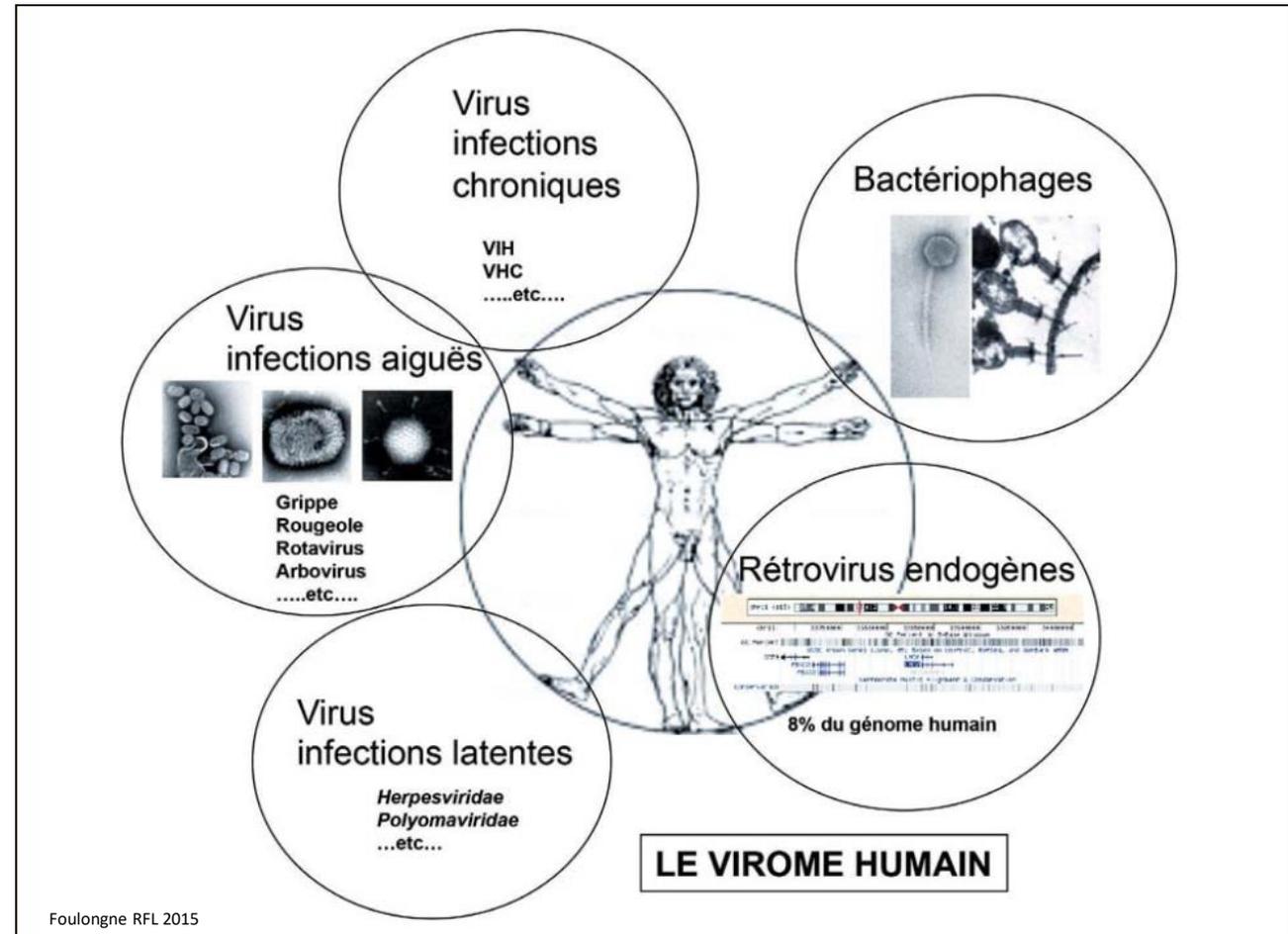
Ensemble des virus présents à la surface et dans le corps humain

= composante virale du microbiote humain

= métagénome viral

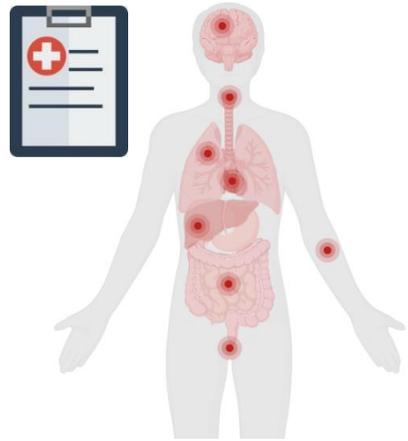


Traité de Virologie médicale 2019



Foulongne RFL 2015

Comment étudier le virome – *méthodes de diagnostic microbiologique*



Recherche microbiologique



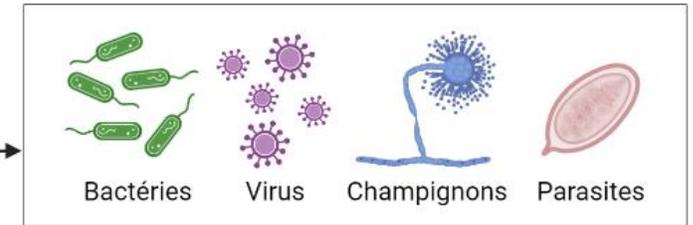
Diagnostic



Prise en charge



Surveillance



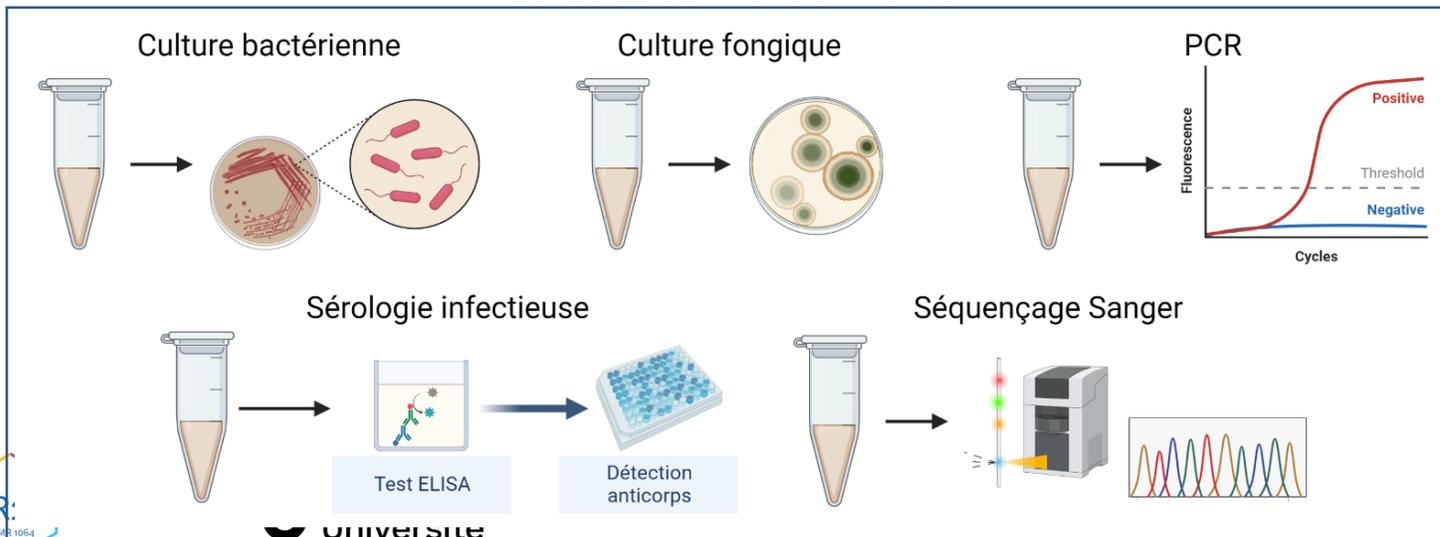
Bactéries

Virus

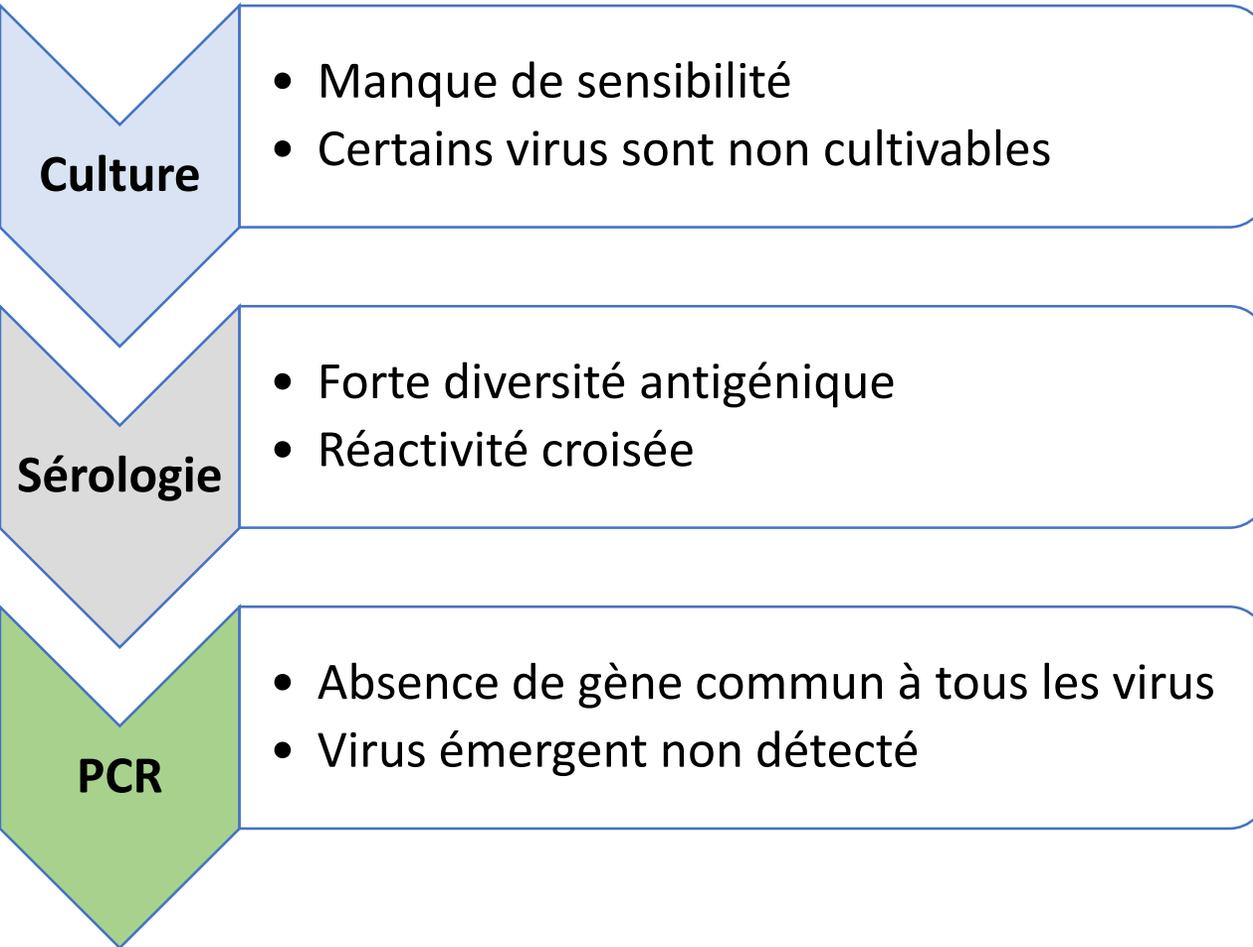
Champignons

Parasites

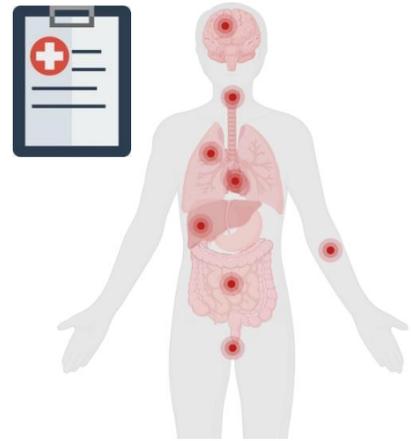
Méthodes conventionnelles



Comment étudier le virome?



Comment étudier le virome – *méthodes de diagnostic microbiologique*



Recherche microbiologique



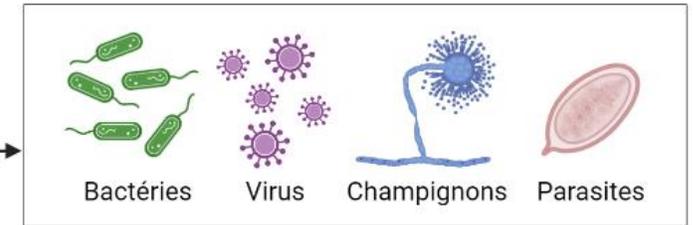
Diagnostic



Prise en charge



Surveillance



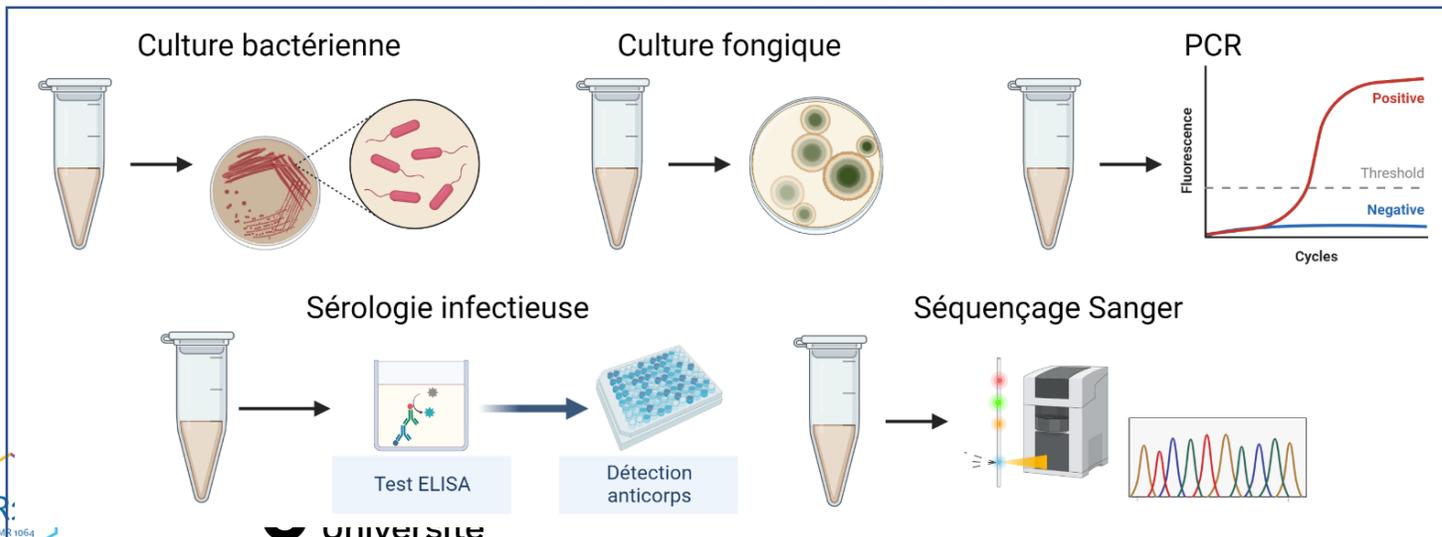
Bactéries

Virus

Champignons

Parasites

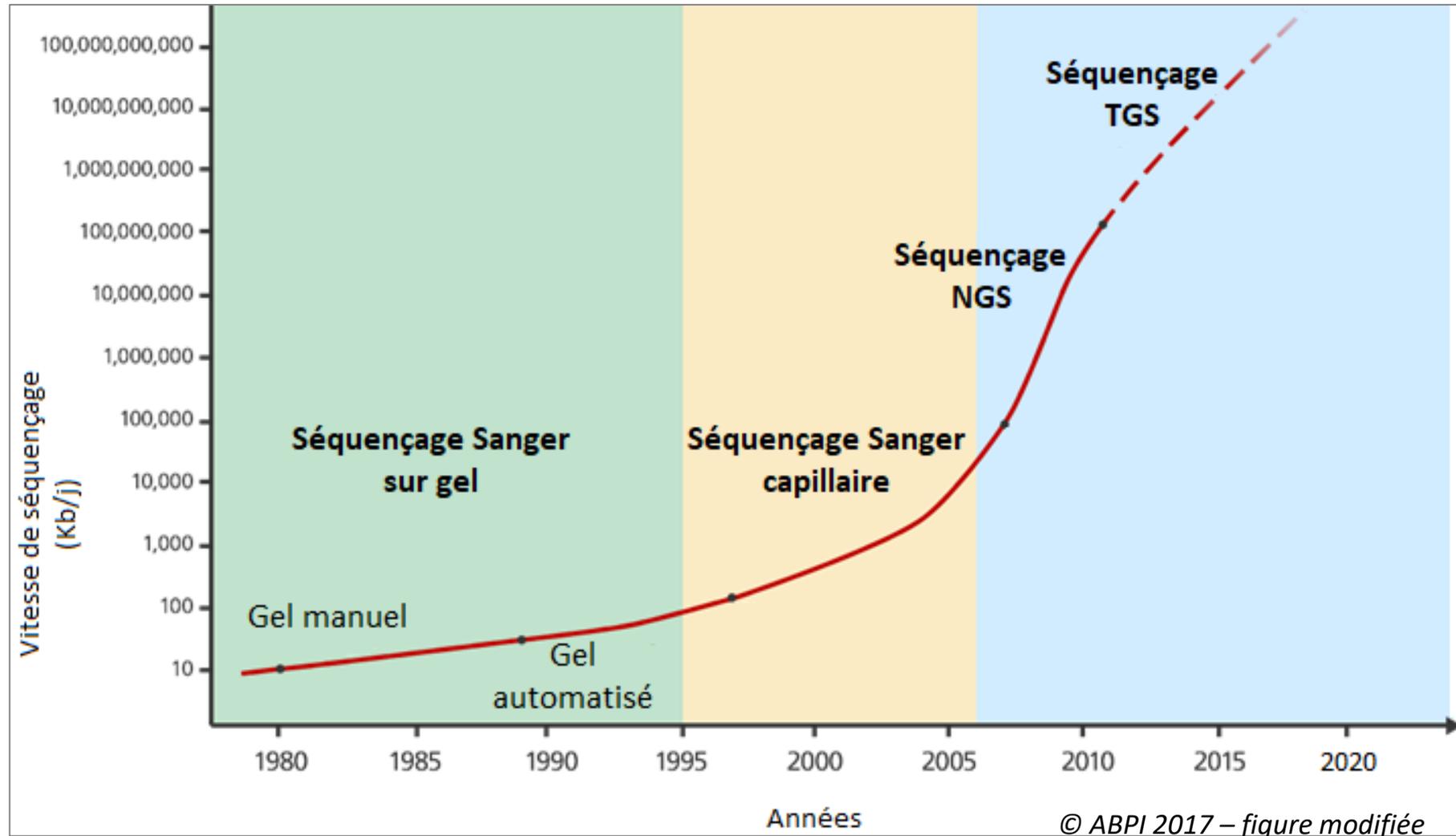
Méthodes conventionnelles



Technologies de séquençage à haut débit



Evolution des techniques de séquençage





Les stratégies de séquençage à haut débit en microbiologie clinique :

Approche ciblée

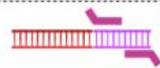
Matériel de départ

Séquençage ciblé (tNGS)



Séquençage d'amplicons

Amorces spécifiques :



Amplicons gène 2



Méthode

Seule une région spécifique de micro-organismes est séquencée

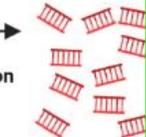


Résultat final

Séquençage d'un génome entier (WGS)



Fragmentation aléatoire



Tout le génome du micro-organisme isolé est séquencé

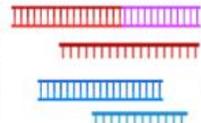


Approches non ciblées

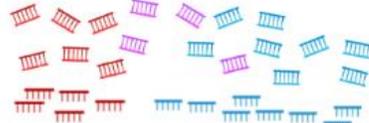
Métagénomique shotgun (SMg)



Séquençage shotgun



Fragmentation aléatoire



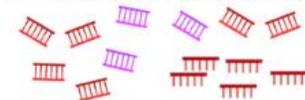
Tous les génomes de l'échantillon (micro-organismes + humain) sont séquencés



Métagénomique shotgun ciblée (tSMg)



Enrichissement/Déplétion



Seuls les génomes de micro-organismes sont séquencés



Légende

Culture microbienne



Echantillon biologique



Bactéries



Virus



Champignons



Parasites



Homme

Pathogènes

ADN



Gène 1

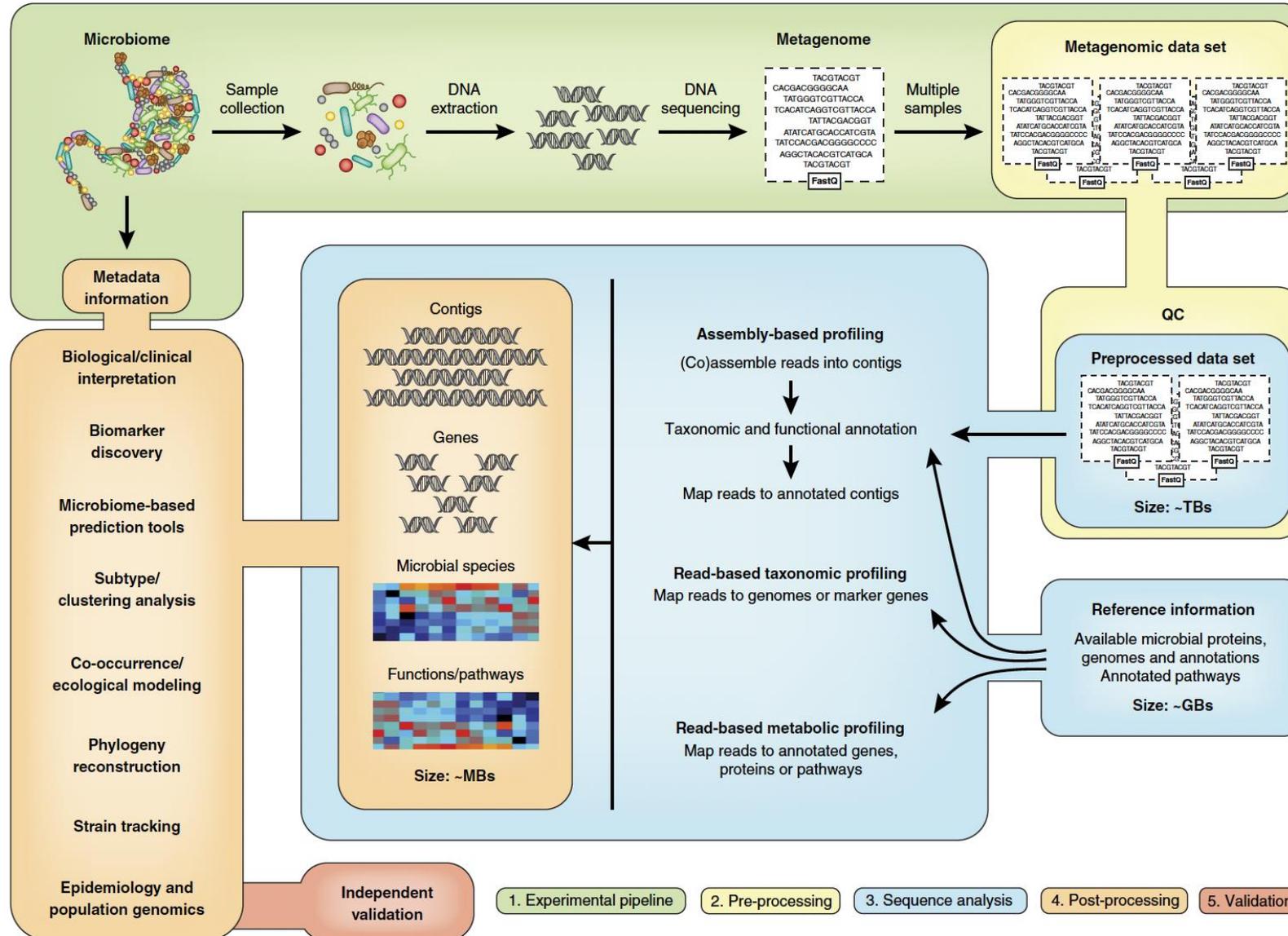
Gène 2

Humain

ARN

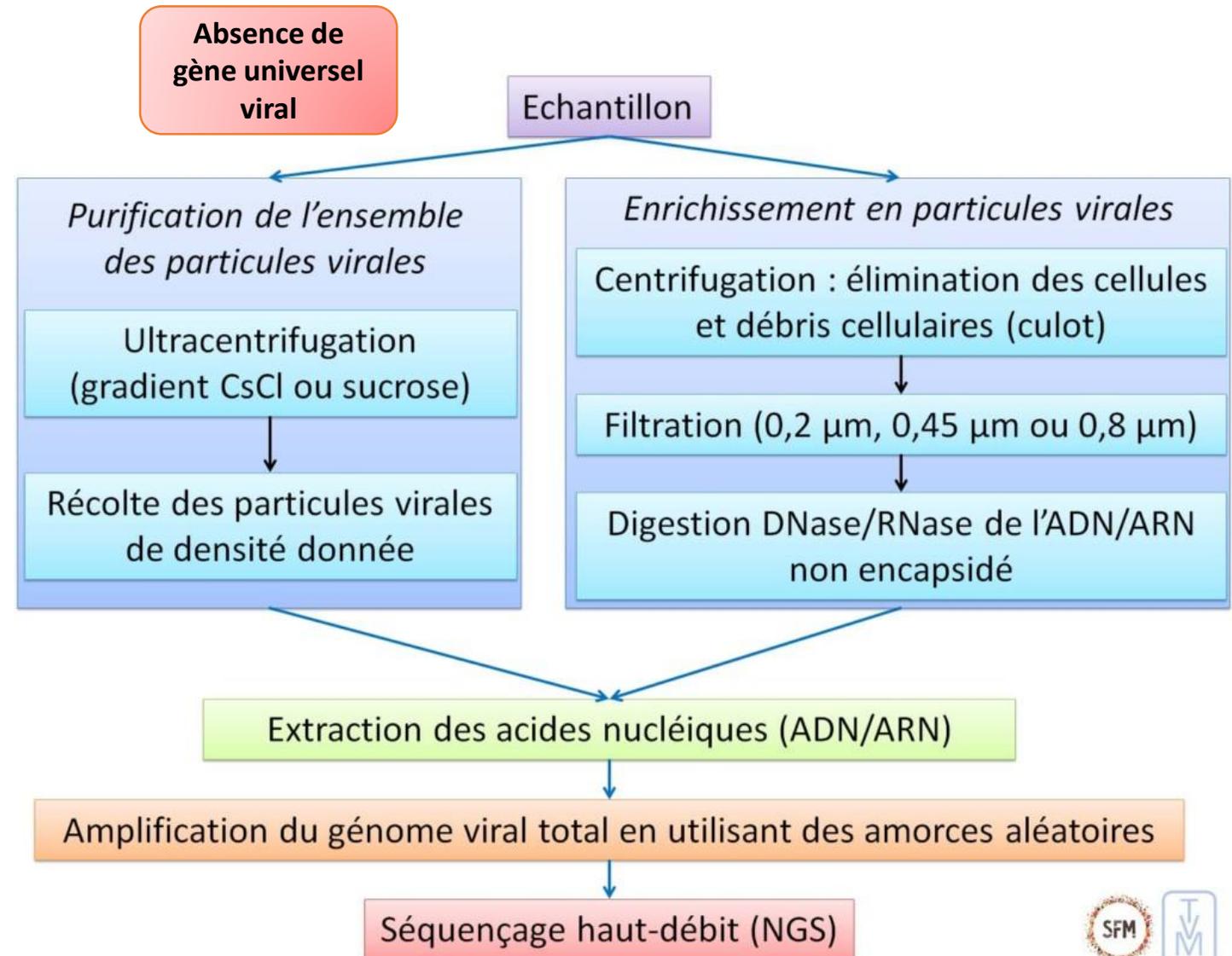


Metagenomique shotgun



Etudes du virome – Métagénomique virale

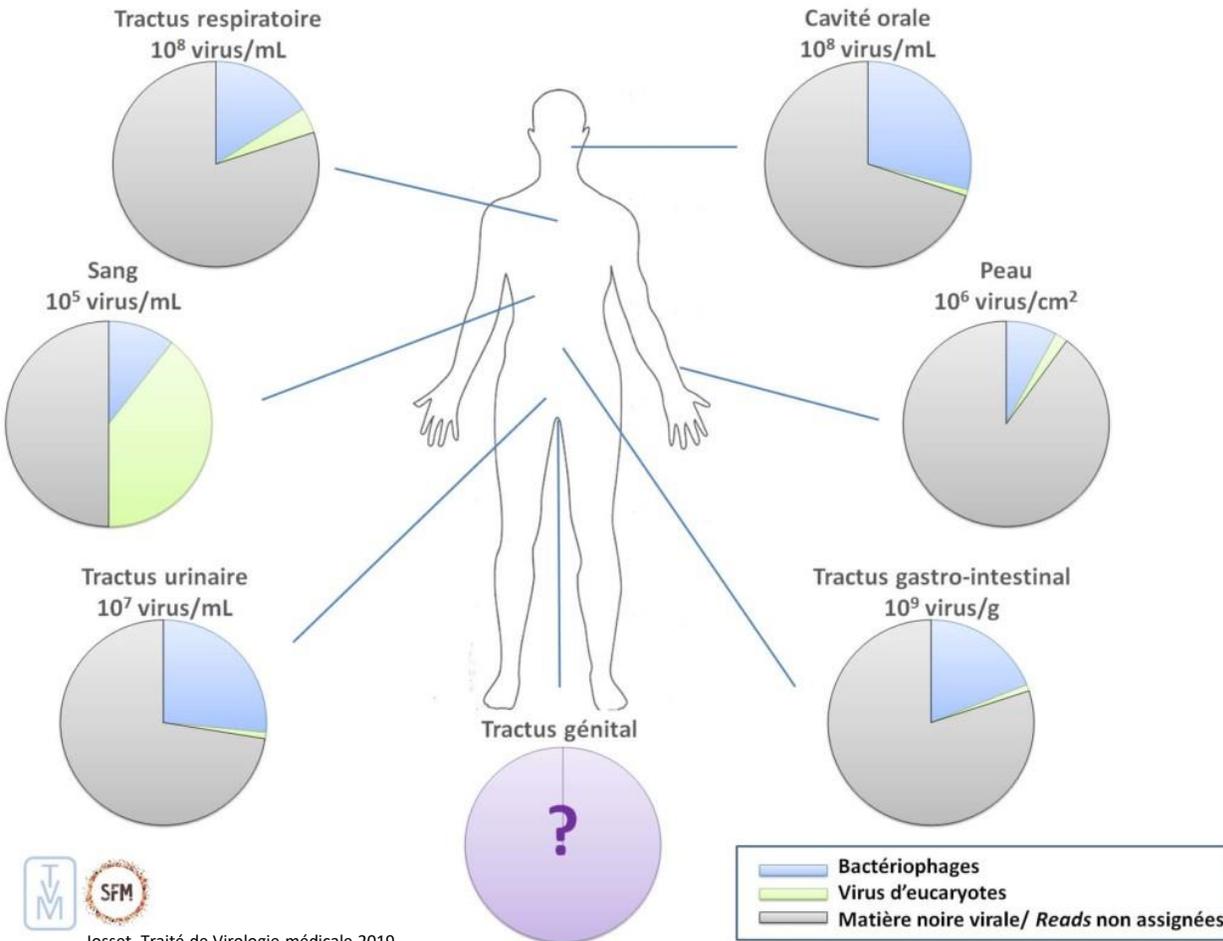
- Description de la composition du virome
- Identification de nouveaux virus
- Liens entre composition du virome et maladies chroniques/aiguës
- Diagnostic d'infection dans un contexte particulier



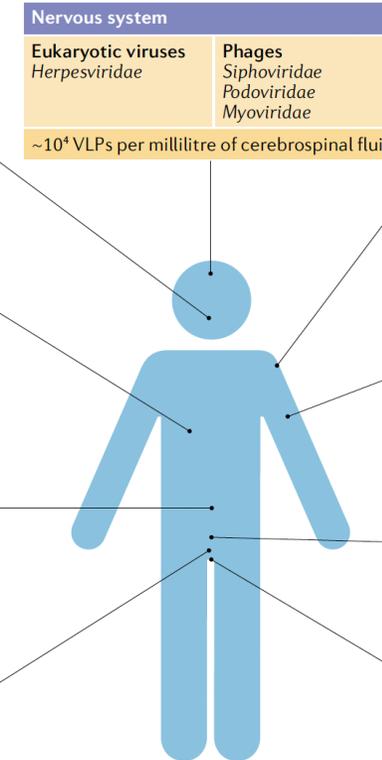
Caractéristiques du virome extracellulaire

- Variabilité interindividuelle
 - Seule une petite fraction du virome est partagée par 50% des individus (bactériophages++)
- Variabilité selon l'âge, le système immunitaire, facteurs environnementaux
- Stabilité temporelle intra-individuelle
 - Composition du virome gastro-intestinal et oral stable chez un individu au cours du temps \neq virome cutané

Composition du virome extracellulaire



Oral cavity	
Eukaryotic viruses Herpesviridae Redondoviridae Anelloviridae Papillomaviridae	Phages Siphoviridae Podoviridae Myoviridae
~10 ⁸ VLPs per millilitre of saliva	
Lung	
Eukaryotic viruses Anelloviridae Redondoviridae Adenoviridae Herpesviridae Papillomaviridae	Phages Siphoviridae Podoviridae Myoviridae Microviridae Inoviridae
Gastrointestinal tract	
Eukaryotic viruses Anelloviridae Adenoviridae Caliciviridae Picornaviridae Herpesviridae Circoviridae Virgaviridae	Phages Siphoviridae Podoviridae Myoviridae Microviridae Inoviridae
~10 ⁹ VLPs per gram of faeces	
Vagina	
Eukaryotic viruses Anelloviridae Herpesviridae	Phages Siphoviridae Podoviridae Myoviridae Microviridae



Nervous system	
Eukaryotic viruses Herpesviridae	Phages Siphoviridae Podoviridae Myoviridae
~10 ⁴ VLPs per millilitre of cerebrospinal fluid	

Blood	
Eukaryotic viruses Anelloviridae Herpesviridae Picornaviridae	Phages Siphoviridae Podoviridae Myoviridae Microviridae Inoviridae
~10 ⁸ VLPs per millilitre of saliva	

Skin	
Eukaryotic viruses Adenoviridae Anelloviridae Circoviridae Herpesviridae Papillomaviridae Polyomaviridae	Phages Siphoviridae Podoviridae Myoviridae

Urinary system	
Eukaryotic viruses Papillomaviridae Polyomaviridae Herpesviridae	Phages Siphoviridae Podoviridae Myoviridae
~10 ⁷ VLPs per millilitre of urine	

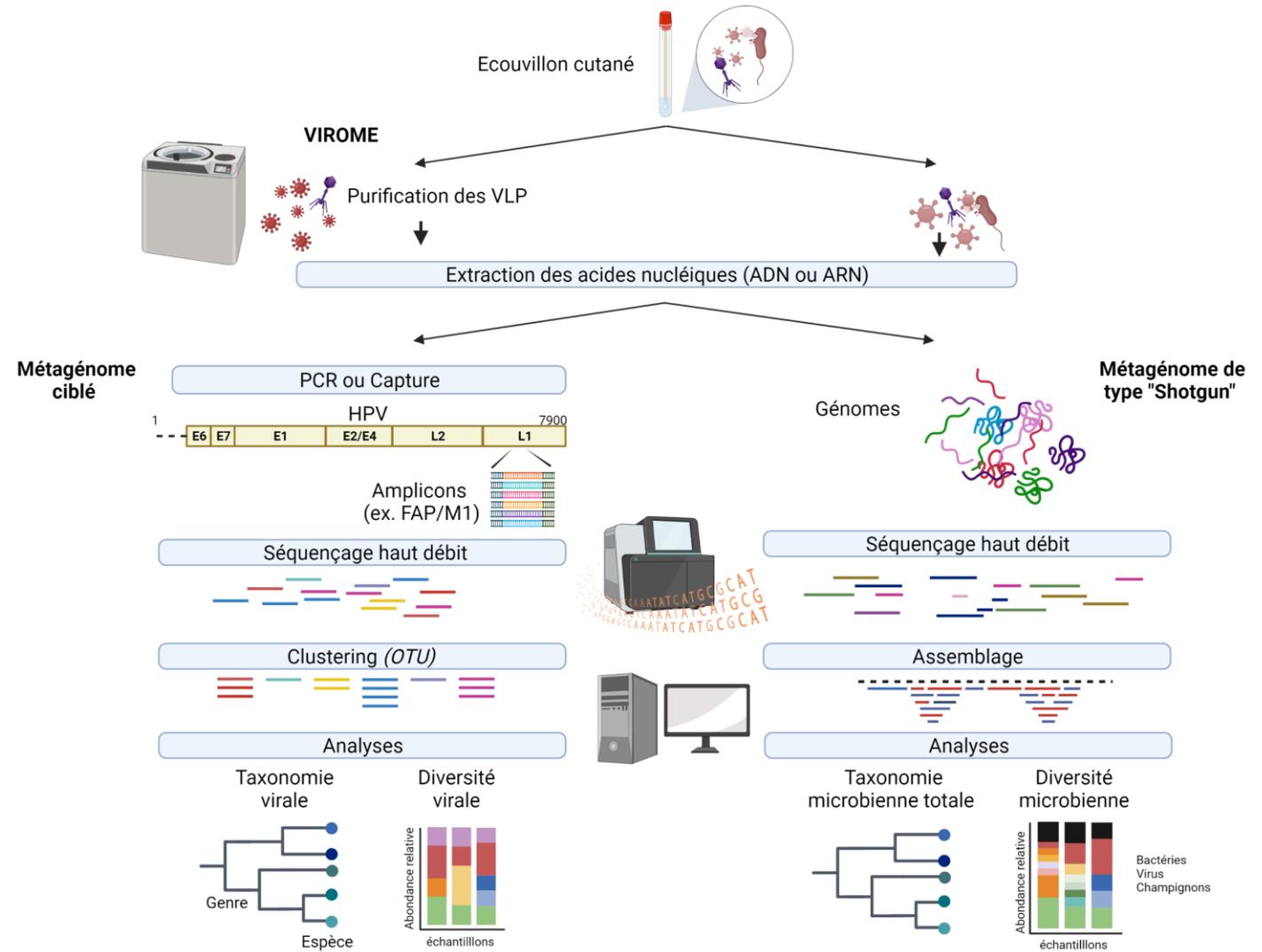
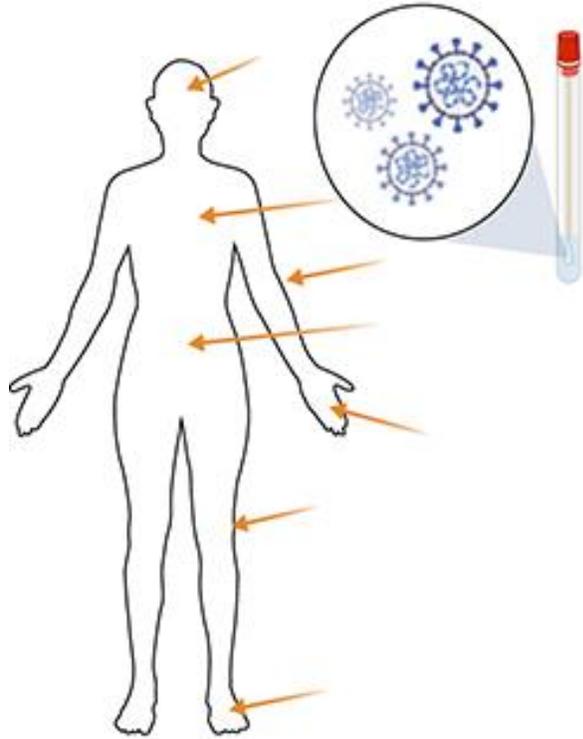
Semen	
Eukaryotic viruses Anelloviridae Papillomaviridae Herpesviridae	Phages Unknown

Liang, Nat Rev Microbiol 2021

« **Dark matter** » > séquences non identifiées (pas d'alignement avec séquences connues)
 > Probablement **phages**

Virome cutané

A



Le virome cutané

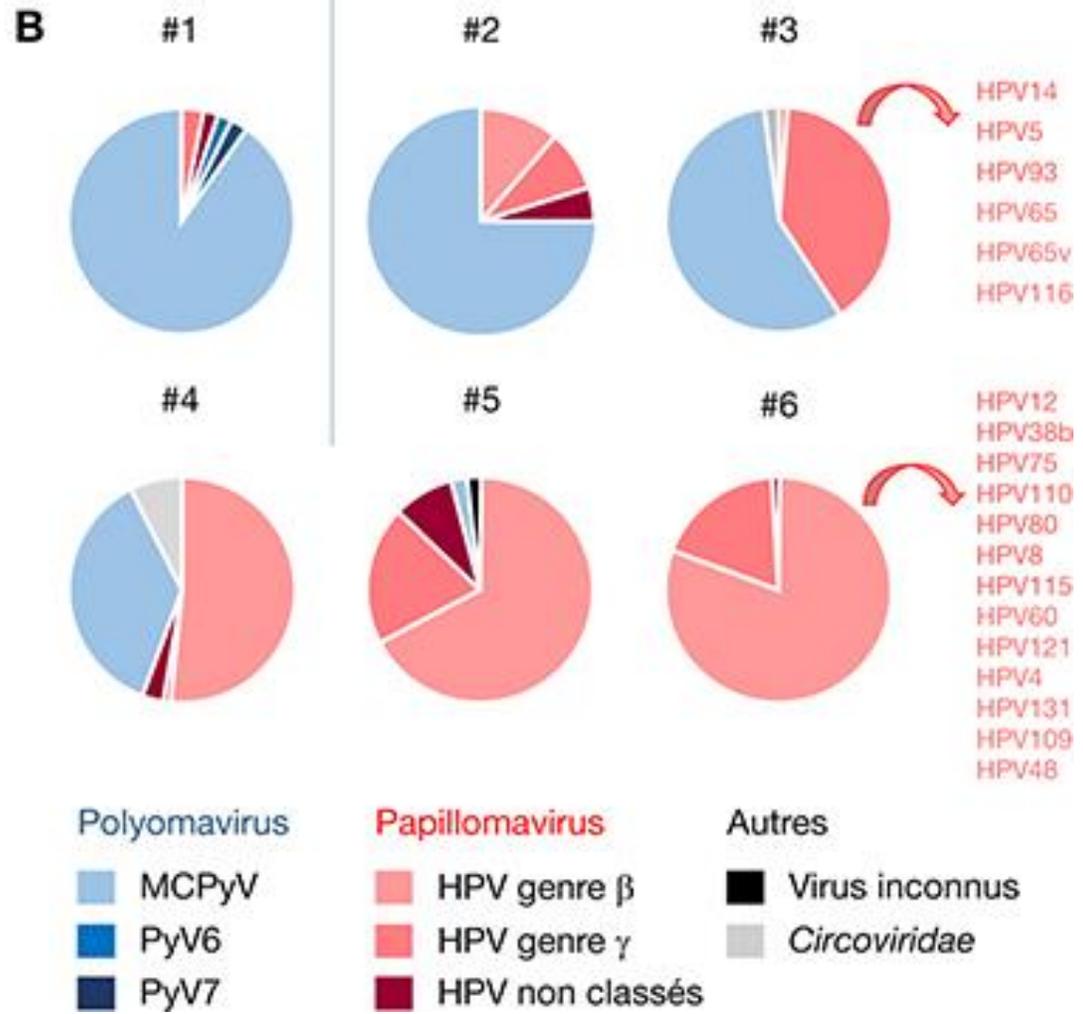
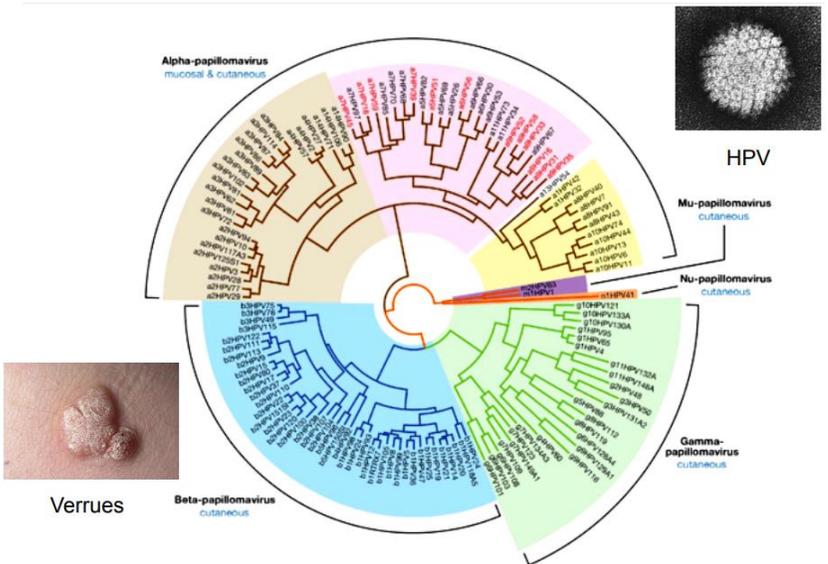
= virus résidents et virus présents transitoirement

β- et γ-papillomavirus humains

→ Couche superficielle de la peau

→ Diversité interindividuelle

Polyomavirus humains 6, 7 et polyomavirus de Merkel (potentiellement oncogène)

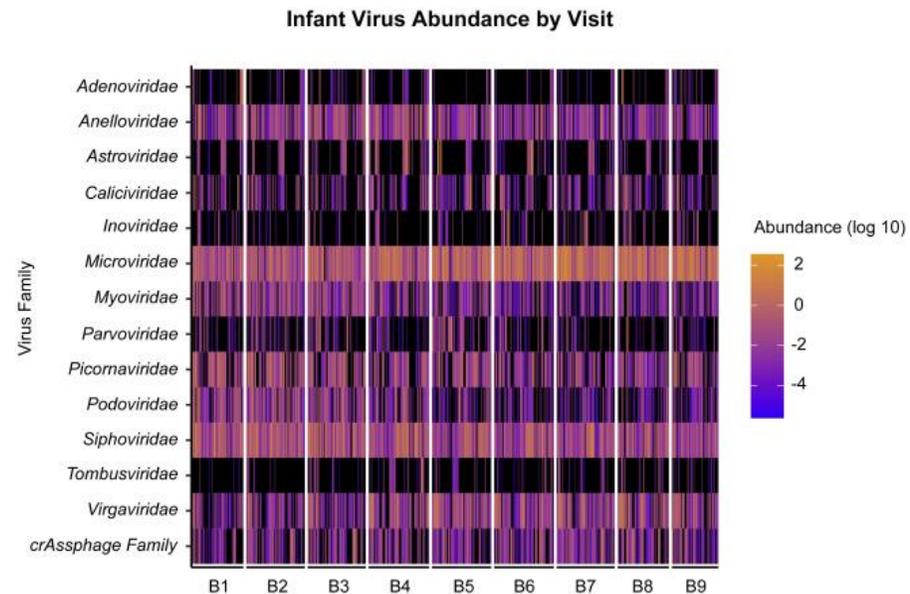
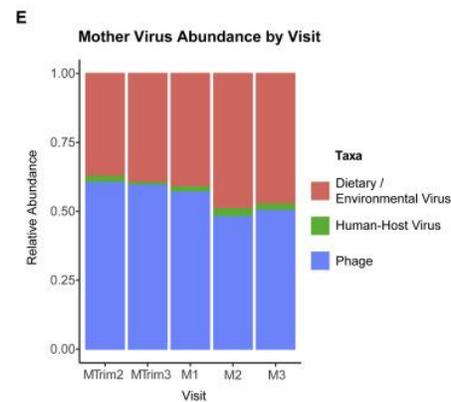
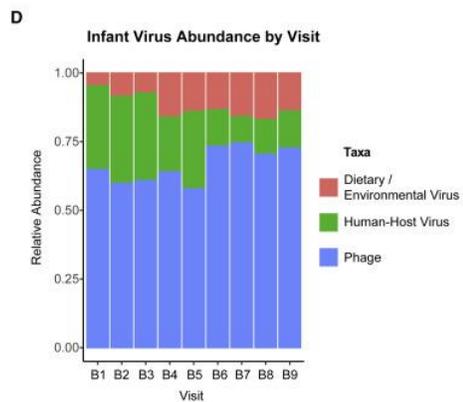
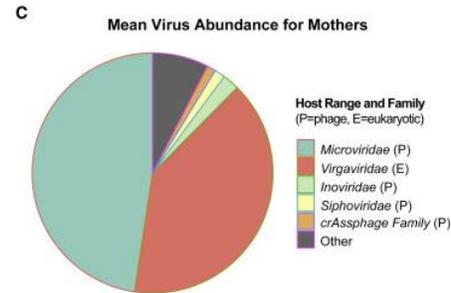
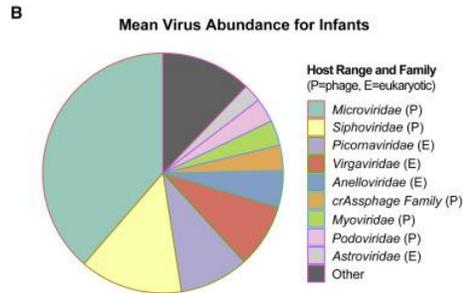
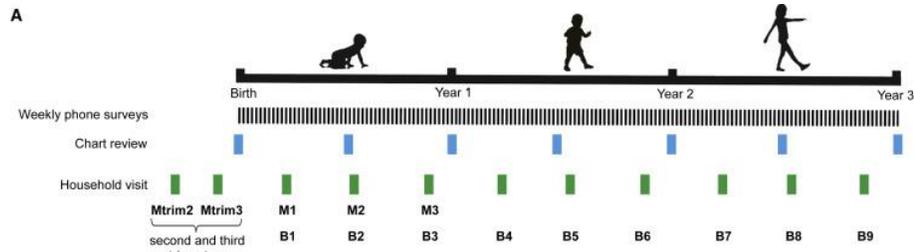


Virome intestinal

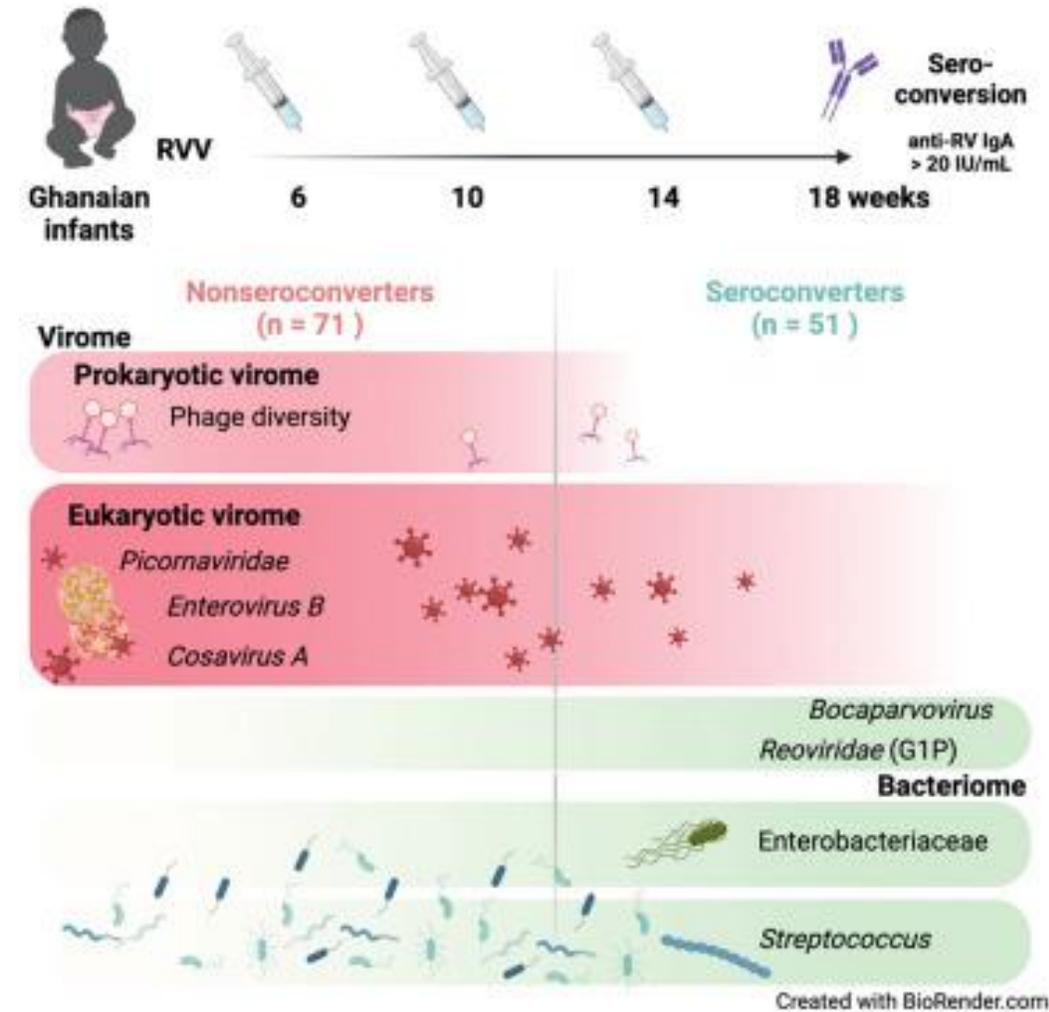
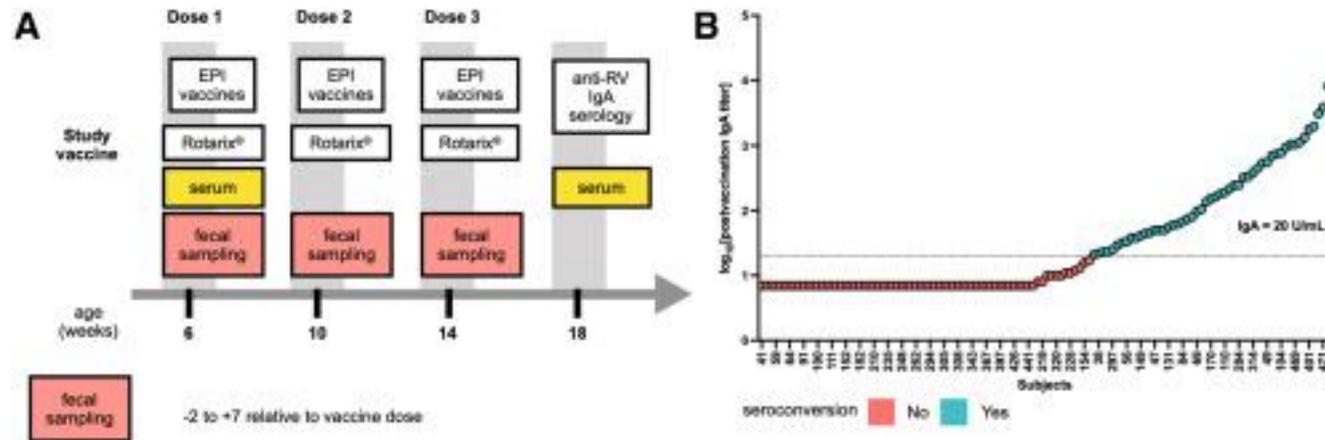
- Chez l'enfant: portage et sécrétion asymptomatique permanente de virus (Entérovirus et Parechovirus ++)
- Adenovirus, Circovirus, Picornavirus, Anellovirus, Parvovirus, Bocavirus...
→ Virus qui peuvent se maintenir sous forme d'infection persistante asymptomatique
- Nombreux bactériophages
→ Reflet de la flore bactérienne résidente
- Nombreux virus de plantes → consommation d'aliments contaminés par ces virus
- Virus animaux non humains:
 - En transit avec aliments carnés?
 - Compatibles ou en adaptation à une situation de commensalisme?

Acquisition du virome digestif

- Divergence des viromes du tractus digestif entre nouveaux nés / mère : fréquence augmentée des *picornaviridae* / *anelloviridae* chez nné
- Augmentation de fréquence des virus associés à alimentation
- Acquisition du virome : ++ origine alimentaire (allaitement), environnementale (contacts cutanés, surfaces), infections



Impact de la composition du virome digestif sur l'efficacité d'un vaccin oral



Virome respiratoire

- Virus majoritaires: *Anelloviridae*, *Papillomaviridae*, *Herpesviridae* (HHV-6, HHV-7) *Siphoviridae* (bactériophages)
- Adenovirus, Picornavirus et Coronavirus fréquemment retrouvés chez l'enfant
- Perturbation de la composition du virome dans contexte de dysfonction immunitaire/pathologies chroniques:
 - Mucoviscidose...
 - Patients transplantés d'organe solide

Virome sanguin

The blood DNA virome in 8,000 humans



March 22, 2017

Ahmed Moustafa¹, Chao Xie², Ewen Kirkness¹, William Biggs¹, Emily Wong¹, Yaron Turpaz², Kenneth Bloom¹, Eric Delwart³, Karen E. Nelson⁴, J. Craig Venter^{1,4*}, Amalio Telenti^{1,4*}

¹ Human Longevity Inc., San Diego, California, United States of America, ² Human Longevity Singapore Pte. Ltd., Singapore, ³ Blood Systems Research Institute, Department of Laboratory Medicine, University of California San Francisco, San Francisco, California, United States of America, ⁴ J. Craig Venter Institute, La Jolla, California, United States of America

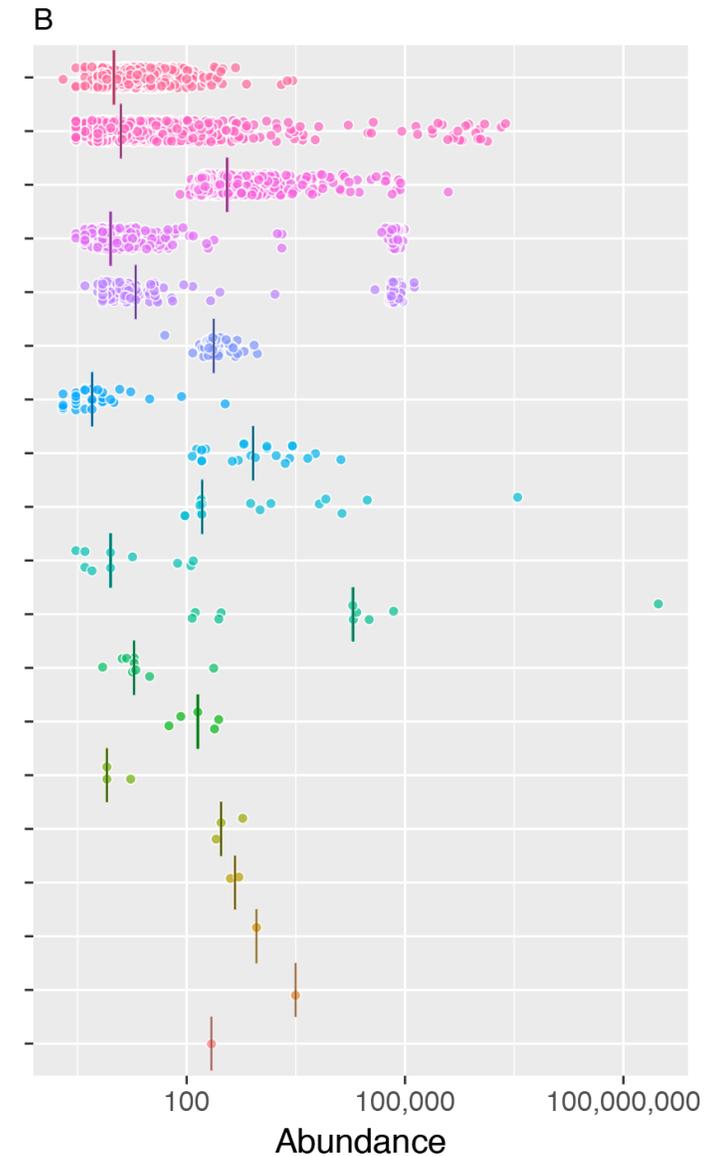
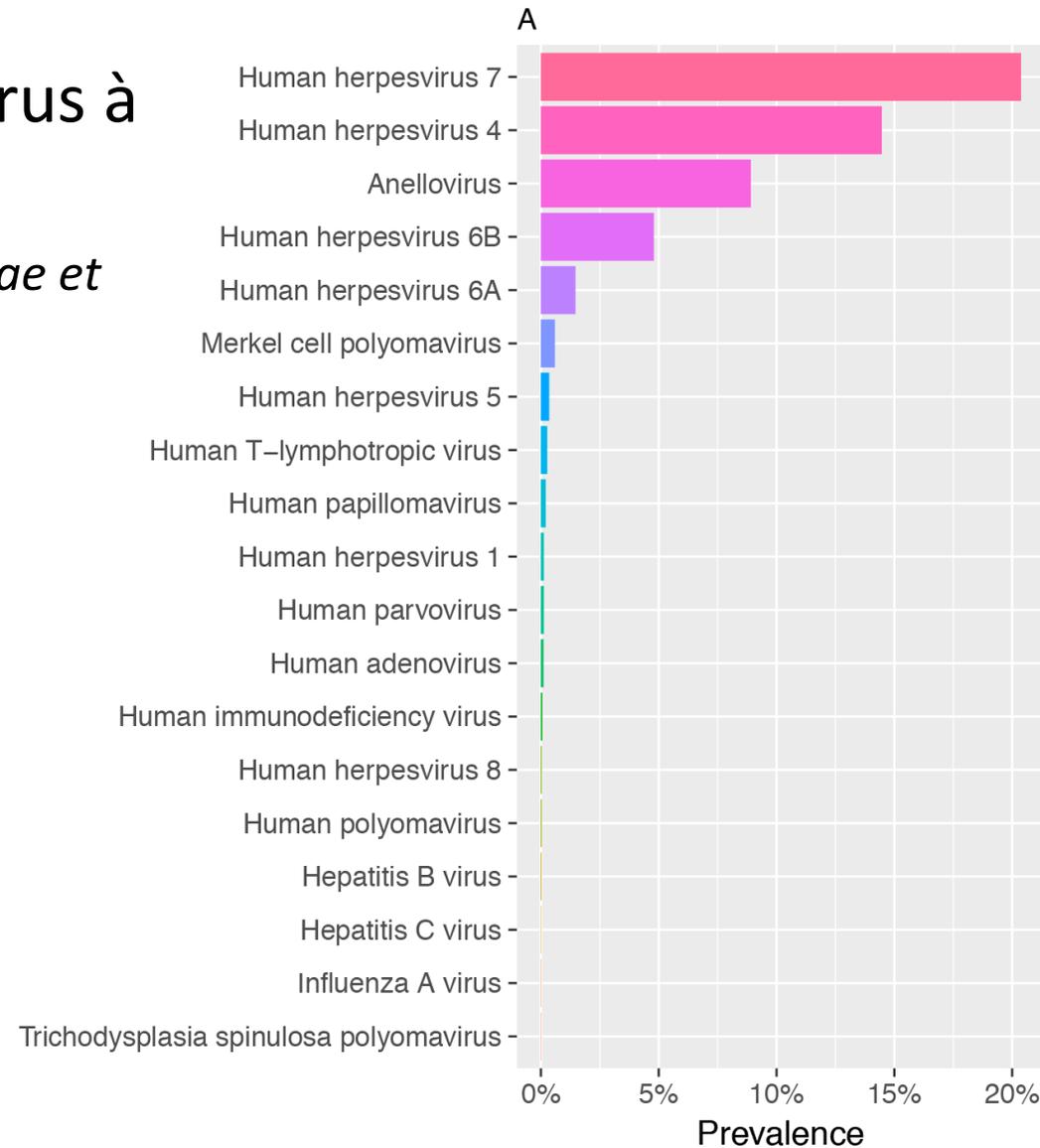
- Caractérisation du virome à partir de prélèvements sanguins issus de 8240 individus
- Patients entre 2 mois et 102 ans (médiane: 56 ans)
 - 71% Européens
 - 13% Africains
 - 2% Asie du Sud-Est



Virome sanguin

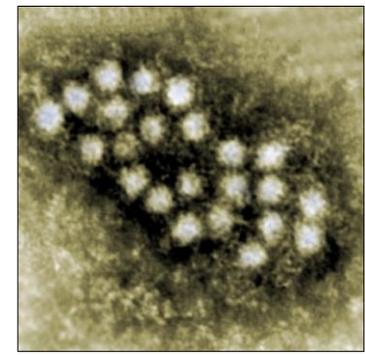
- Prédominance de virus à ADN

→ *Anelloviridae*, *Polyomaviridae* et *Herpesviridae*



Moustafa et al., 2017

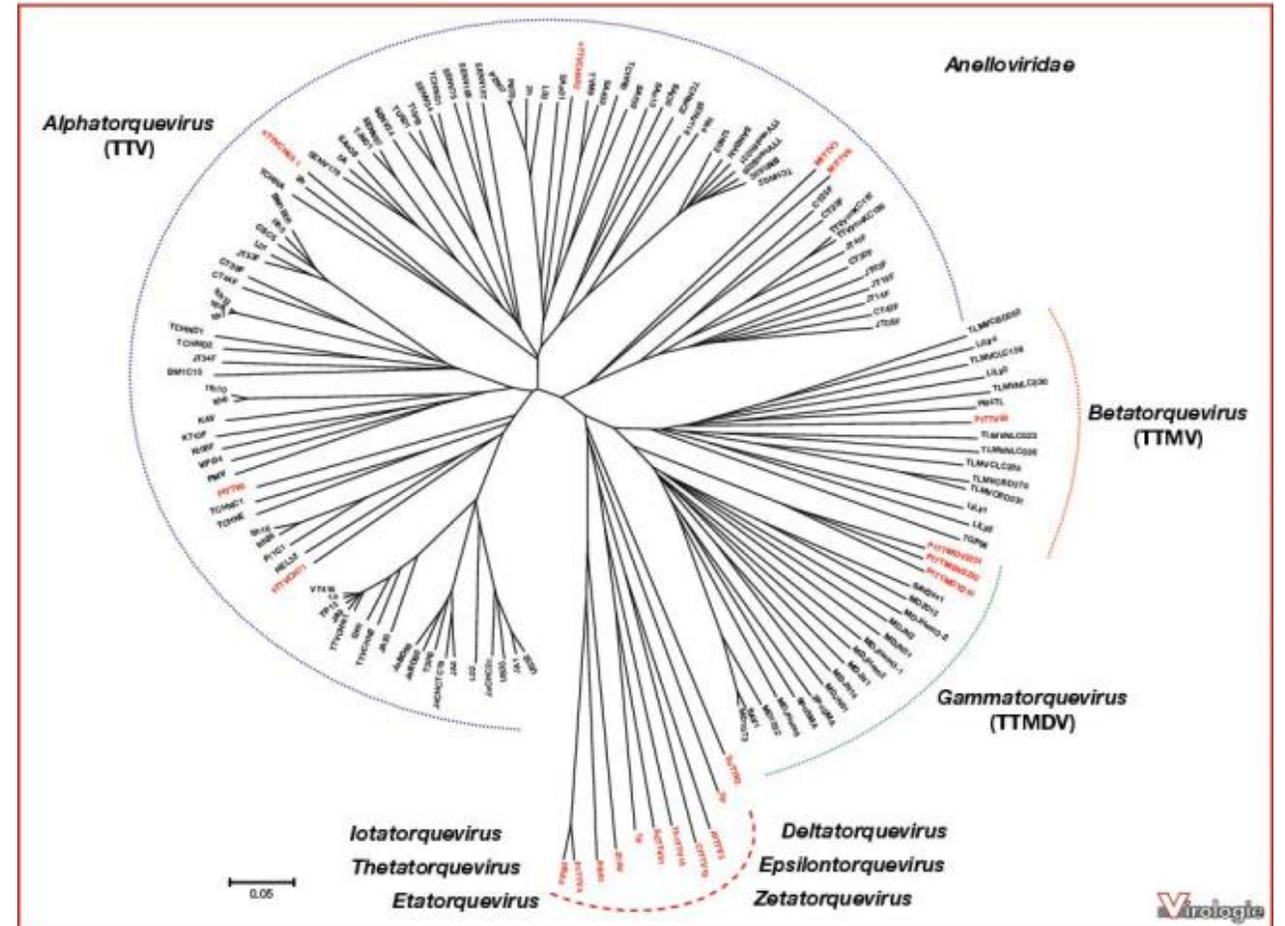
Les anellovirus – focus sur les Torque Teno Virus



- Famille des *Anelloviridae*
- Virus à ADN simple brin circulaire
- non enveloppé de 30 nm
- non cultivable
- variabilité génomique ++

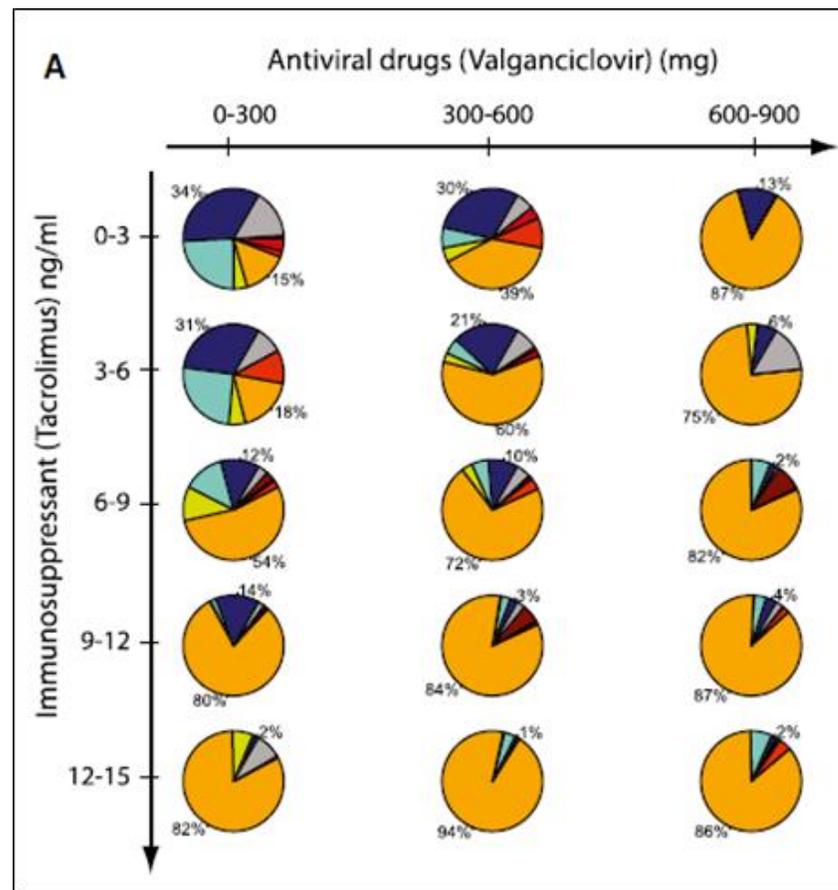
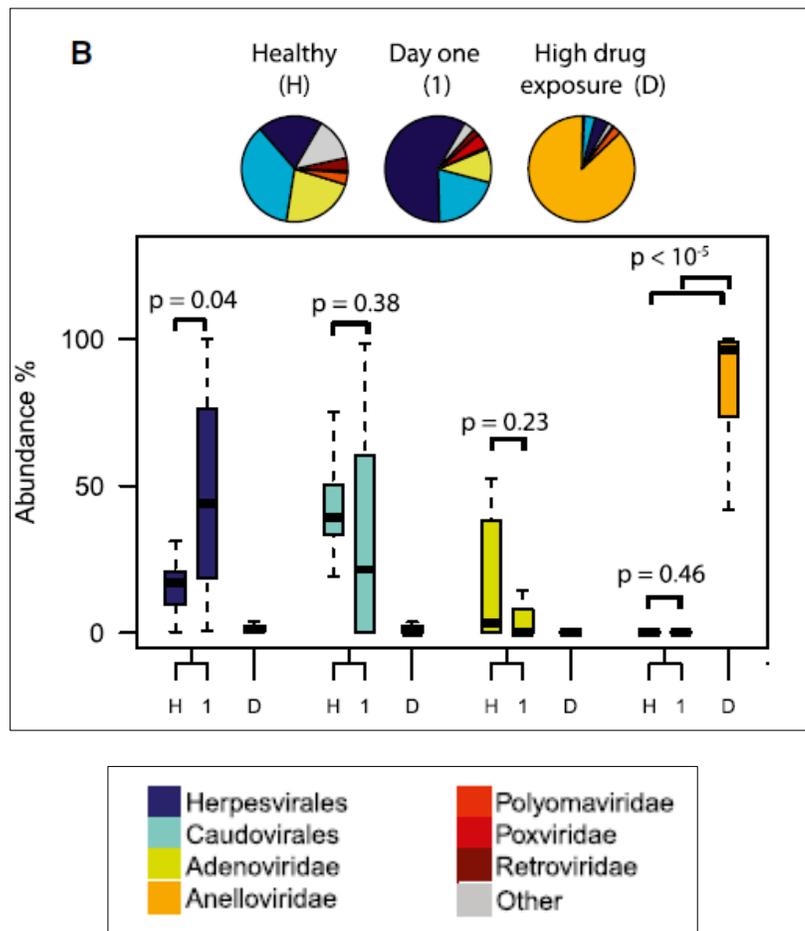
- Prévalence:
> 80-95% de prévalence
- Distribution mondiale

- Tropisme = LyT mais aussi dans MO, foie, estomac, poumons, rate, tissus nerveux, PBMC...
- Absence de pouvoir pathogène



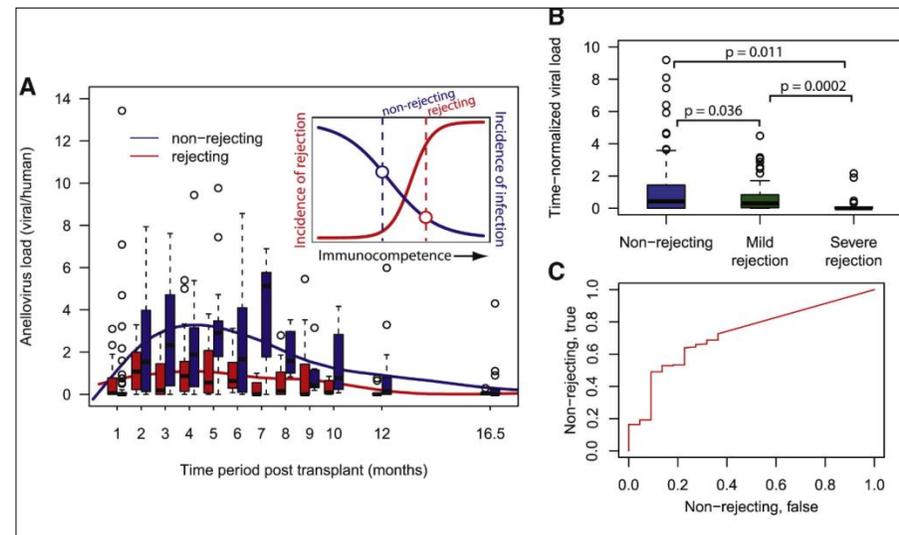
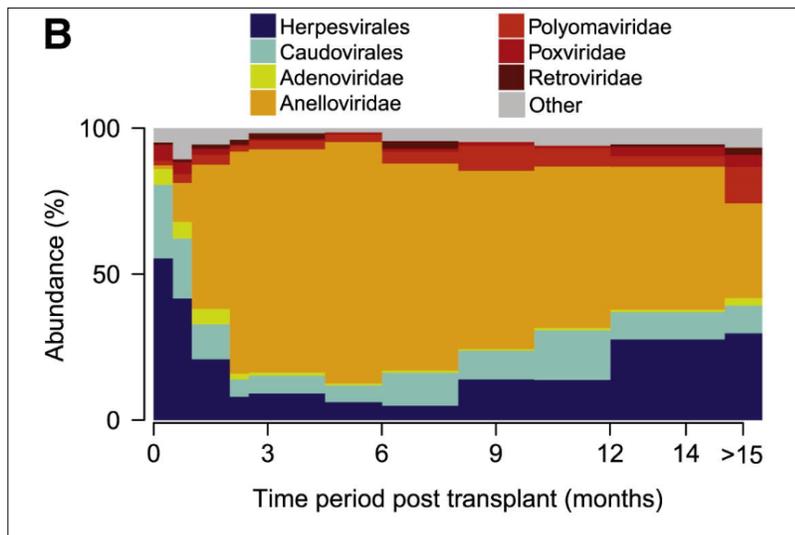
Spandole *et al.*, 2015
Focosi *et al.*, 2015

TTV et transplantation



Variation du virome en fonction de l'intensité du ttt IS et du ttt anti-CMV
Majorité d'anellovirus sous IS + antiviraux

TTV et transplantation



→ Charge virale Anellovirus plus faible chez les patients qui présentent un épisode de rejet de greffe

→ Plus la CV TTV est haute, plus le patient serait ID → risque majoré d'infections opportunistes
→ Plus la CV TTV est basse, plus le patient serait IC → risque majoré de rejet du greffon

Bactériophages

- Virus infectant les bactéries: bactériophages/ phages

- Taille de 25 à 200 nm

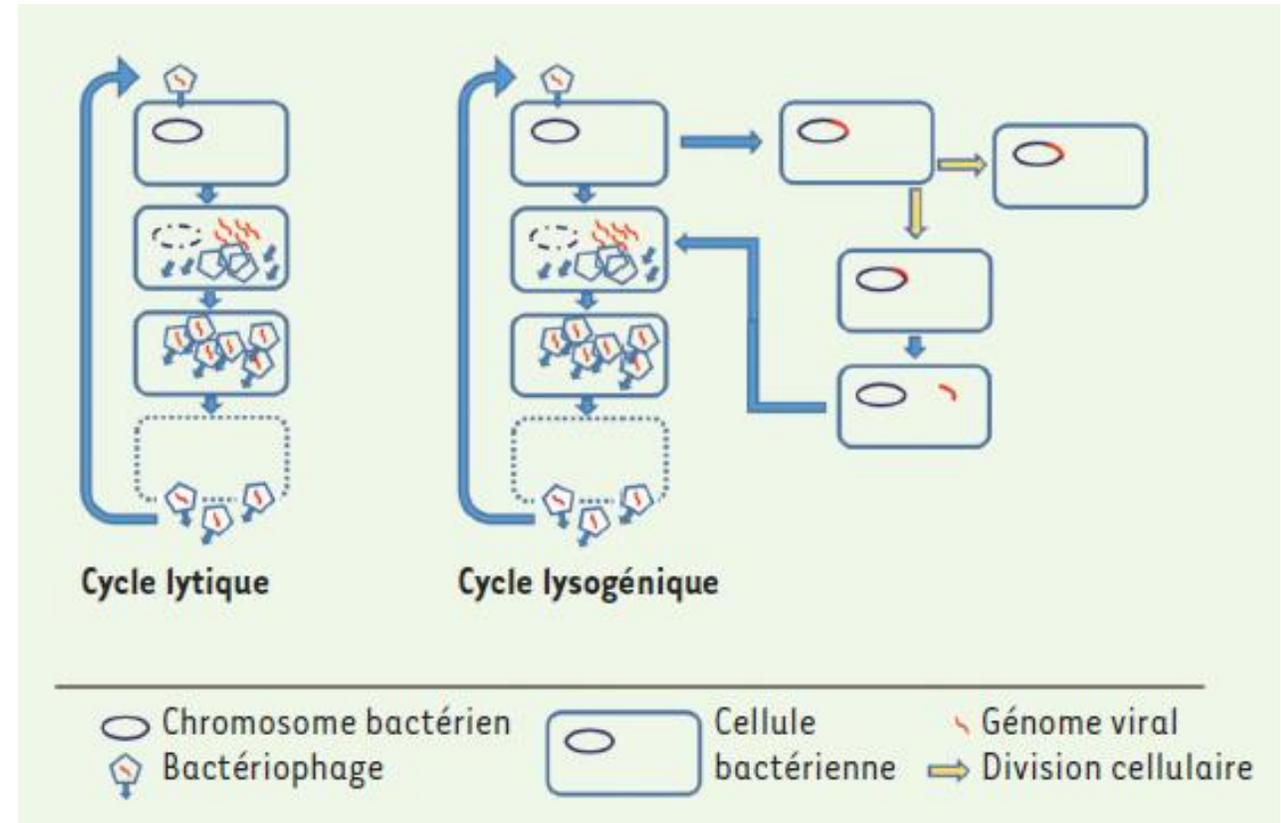
- Deux types de cycle :

- **cycle lytique** – phages « virulents »:

Multiplication du phage → lyse de la bactérie hôte et libération de particules virales

- **cycle lysogénique** – phages « tempérés »:

Le génome du phage s'intègre dans le génome de la bactérie sans la tuer → Persiste sous forme de prophage et se réplique ainsi en même temps que le génome bactérien



Bactériophages

- Enorme diversité
 - Les bactériophages sont détectés dans tous les études de métagénomique
 - Seulement 0,001% de la diversité des bactériophages est présente dans les bases de données de séquences
 - Présents dans tous les écosystèmes mais aussi au niveau de la peau, muqueuses, TD, alimentation...
 - Puissants régulateurs naturels des populations bactériennes
 - Ordre des *Caudovirales* est le plus représenté
- (famille des *Siphoviridae* ++): oral, intestinal et respiratoire

Diversité accentuée par évènements fréquents de recombinaison

Diversité des phages

b dsDNA

Tailed

Myoviridae (T4) and Herelleviridae

Podoviridae (T7)

Ackermannviridae (AG3)

Siphoviridae (lambda)

Non-tailed

Corticoviridae (PM2)

Plasmaviridae (MVL2)

Tectiviridae (PRD1)

a ssDNA

Microviridae (phiX174)

Inoviridae

c dsRNA

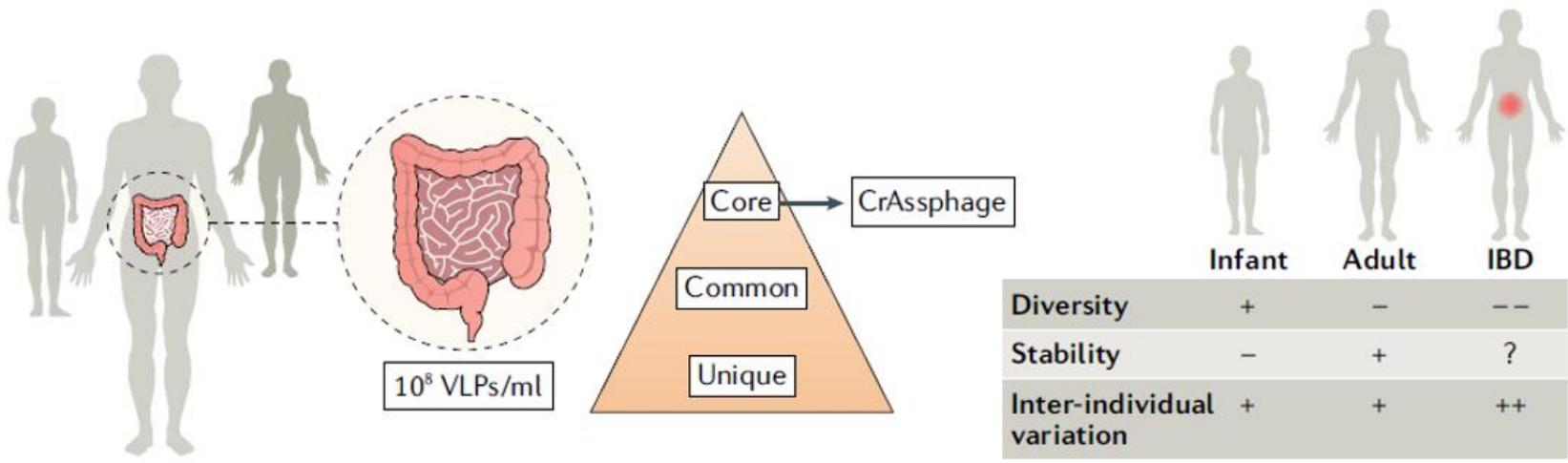
Cystoviridae (phi6)

d ssRNA

Leviviridae (MS2)

Bactériophages

- Tube digestif
- ✓ majorité de Caudovirales
- ✓ Stabilité dans le temps

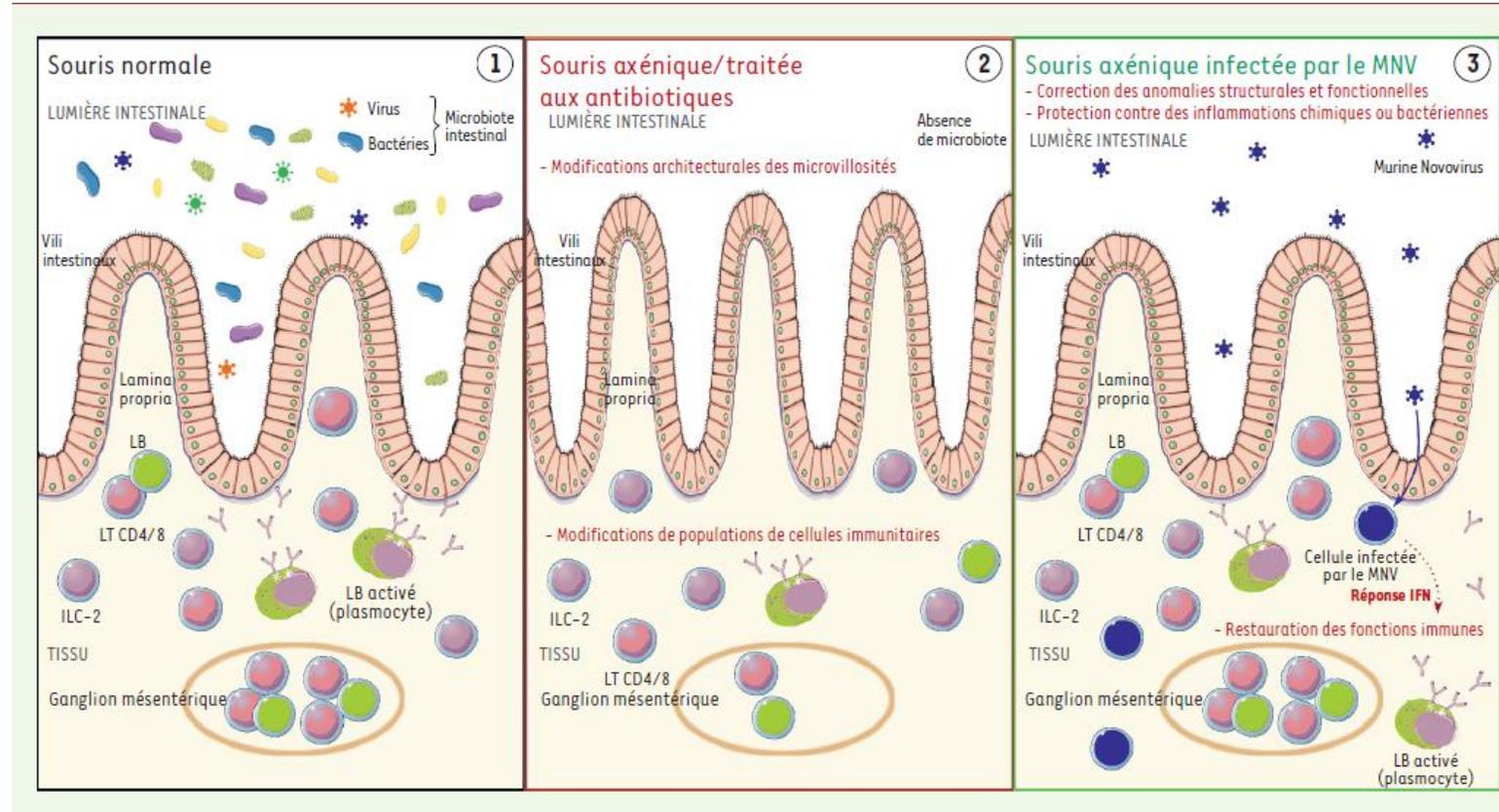


Virome – maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

- Augmentation de l'abondance des phages entériques extracellulaires
- Diminution de la diversité bactérienne

Chez la souris:

- L'infection par le MNV (norovirus murin) restaure la structure intestinale et l'activité immuno-physiologique des souris privées de microbiote bactérien
- L'infection par le MNV protégerait des inflammations intestinales

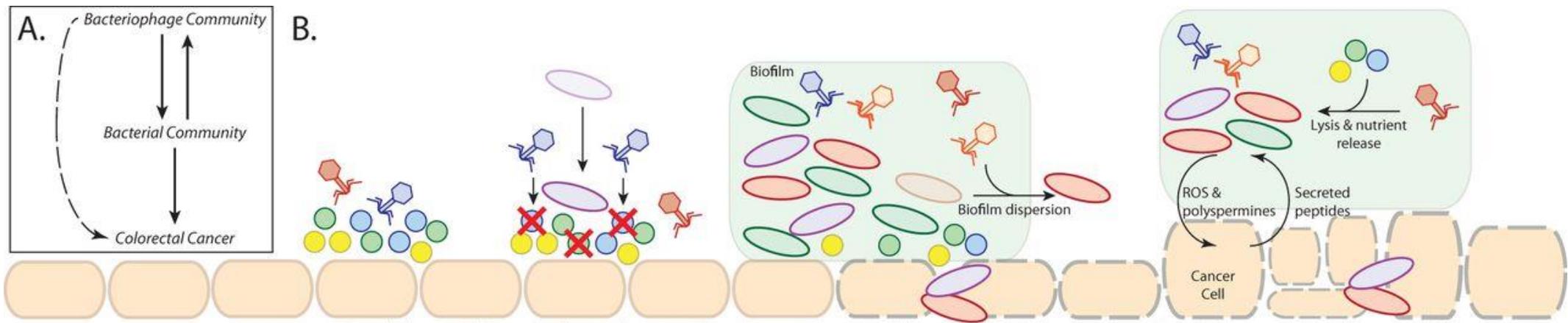


Kernbauer et al Nature 2014

Bactériophages: Pathogènes humains?

- *Liens entre virome et cancer ?*

- Diversité du virome au niveau du colon altérée dans le cancer colorectal
- Hypothèse : certains phages « large spectre » peuvent favoriser la carcinogénèse en lysant les bactéries, permettant ainsi aux bactéries opportunistes tumorigènes de proliférer dans l'intestin.
- Rôle potentiel des phages dans le développement du biofilm → Invasion de l'épithélium par des bactéries oncogènes qui favorisent la transformation des cellules tumorales.



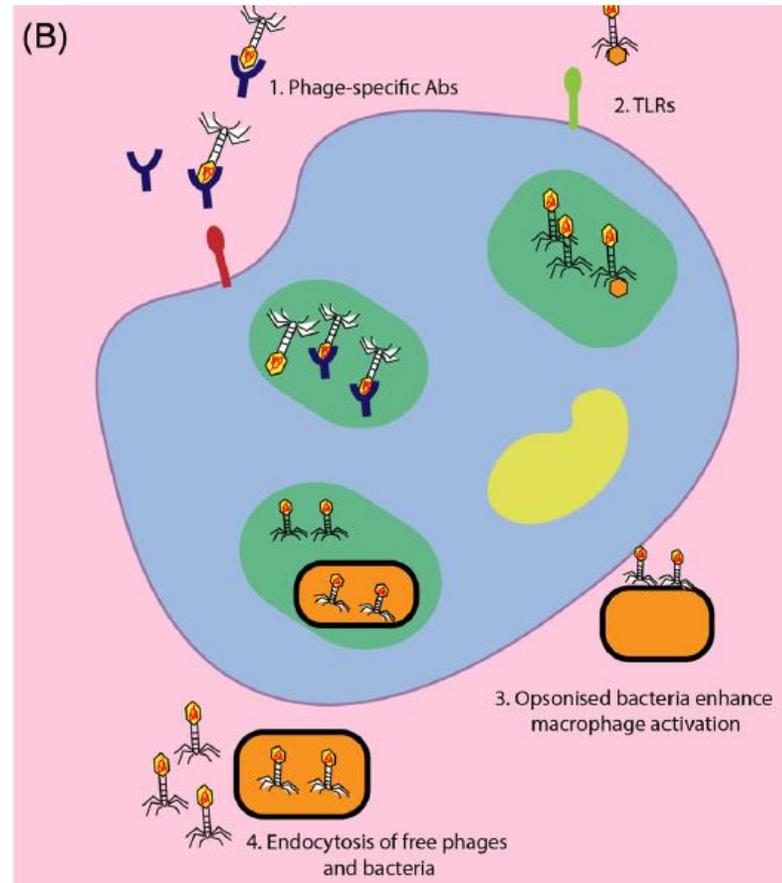
A. Soc. Microbiol- *Hannigan et al* – 2018

Curr Oncol Rep – *Sheflin et al* – 2014

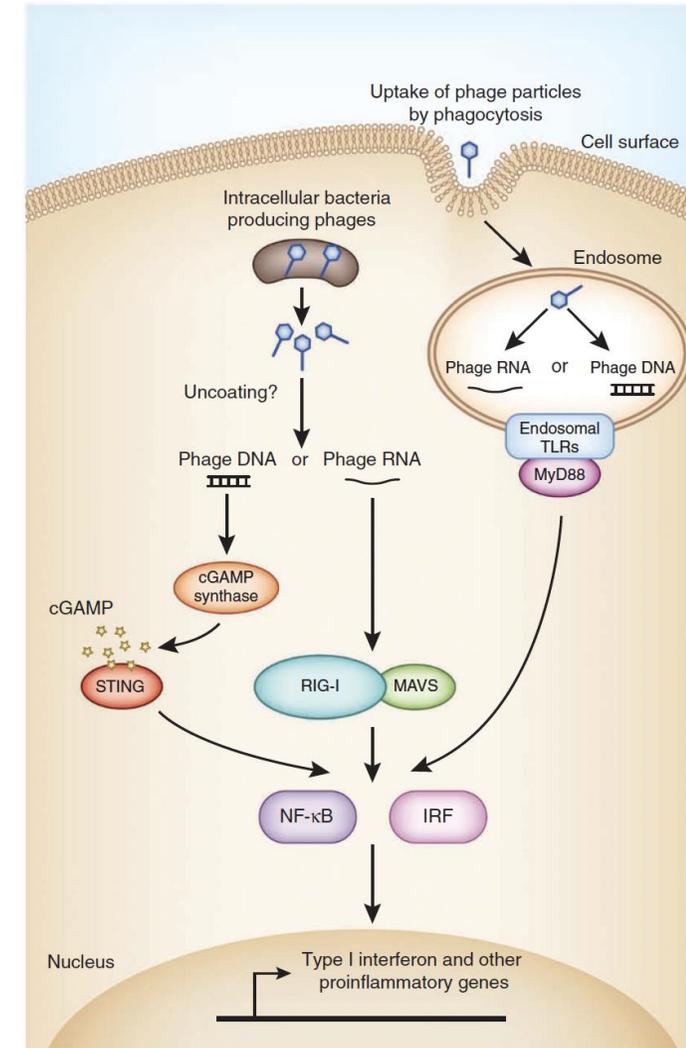
Current Opinion in Virology – *Stern et al* – 2019

Bactériophages: interaction avec le système immunitaire

- Immunité innée
 - Phagocytose / macrophages
 - « Opsonisation » des bactéries par les phages > stimulation de la phagocytose des bactéries
 - Activation des TLR/PPR
- Immunité adaptative
 - Anticorps anti-phages (dont Ac neutralisants) peuvent être détectés



Viruses – Van Belleghem et al – 2018
Red Med Virol – Jariah et al – 2019



Duerkop and Hooper Nat Immunol 2013

Phagothérapie

- Objectif: lyse de bactéries ciblées
- Intérêt dans le biofilm: capacité à hydrolyser les polysaccharides bactériens qui composent les biofilms grâce aux enzymes « dépolymérase » → avantage spécifique comparé aux antibiotiques
- Eligibles uniquement pour traiter des infections à bactéries extracellulaires car ne peuvent pas pénétrer les cellules eucaryotes
- Outil thérapeutique prometteur car polymorphisme des bactériophages
- Attention à l'innocuité → nécessité d'utiliser des préparations purifiées



Virome intracellulaire

- moins bien caractérisé que le virome extracellulaire
- 1. Prophages** = bactériophages intégrés dans le génome de la bactérie (70%)
 - 2. Virus eucaryotes latents**
 - Épisome (molécule d'ADN circulaire, extrachromosomique, qui peut se répliquer de manière autonome)
 - Virus intégrés dans le génome humain (rétrovirus endogènes ++)

Rétrovirus endogènes humains

Human endogenous retrovirus – HERV

Séquences génétiques d'origine virale mobiles

Traces de rét
de 100 millio

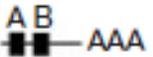
= Séquences,
probablemer

→ Inactifs de

→ La plupart

→ 8 % de l'er

Classes of interspersed repeat in the human genome

			Length	Copy number	Fraction of genome
LINES	Autonomous		6–8 kb	850,000	21%
SINEs	Non-autonomous		100–300 bp	1,500,000	13%
Retrovirus-like elements	Autonomous		6–11 kb	450,000	8%
	Non-autonomous		1.5–3 kb		
DNA transposon fossils	Autonomous		2–3 kb	300,000	3%
	Non-autonomous		80–3,000 bp		

Rétrovirus endogènes humains : processus d'endogénéisation

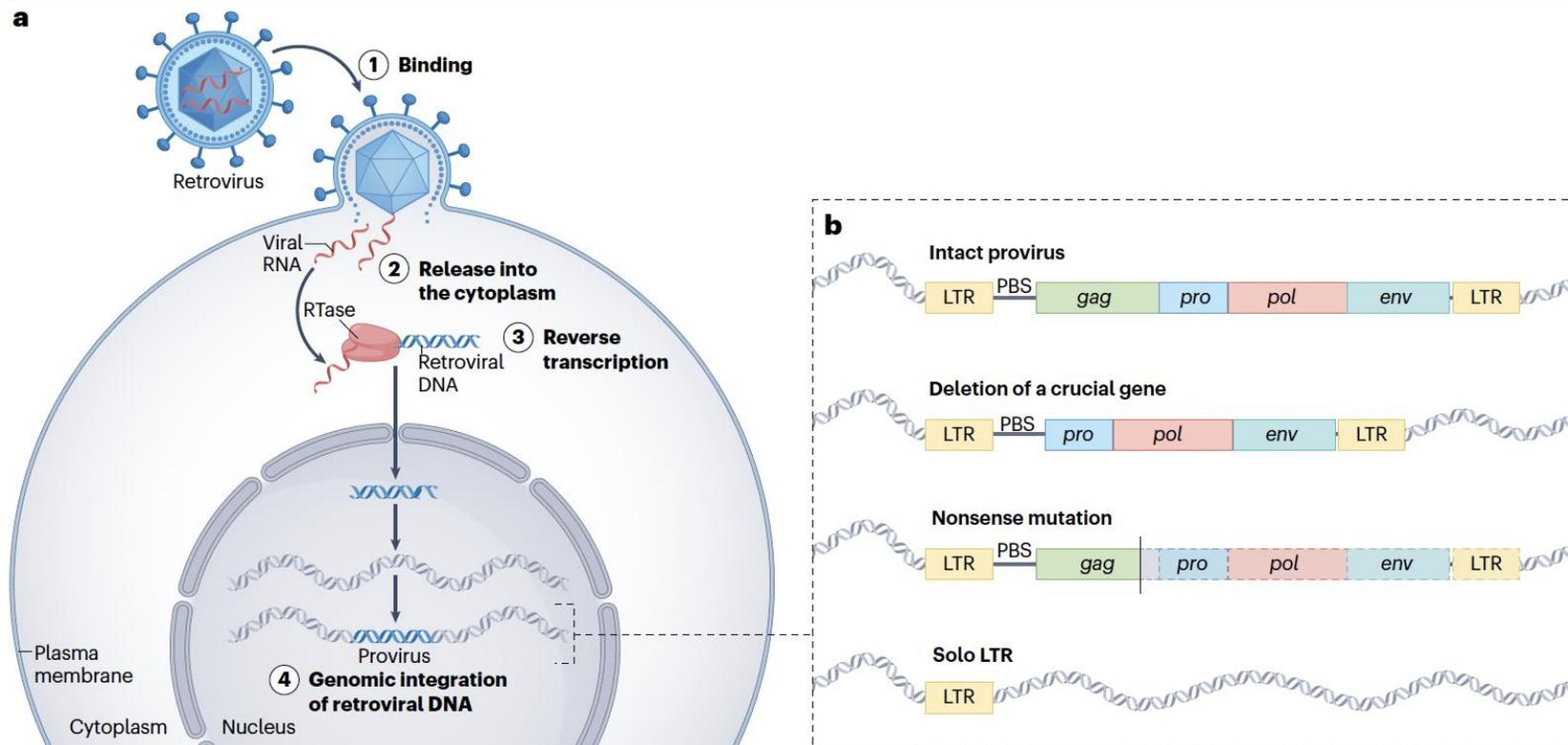
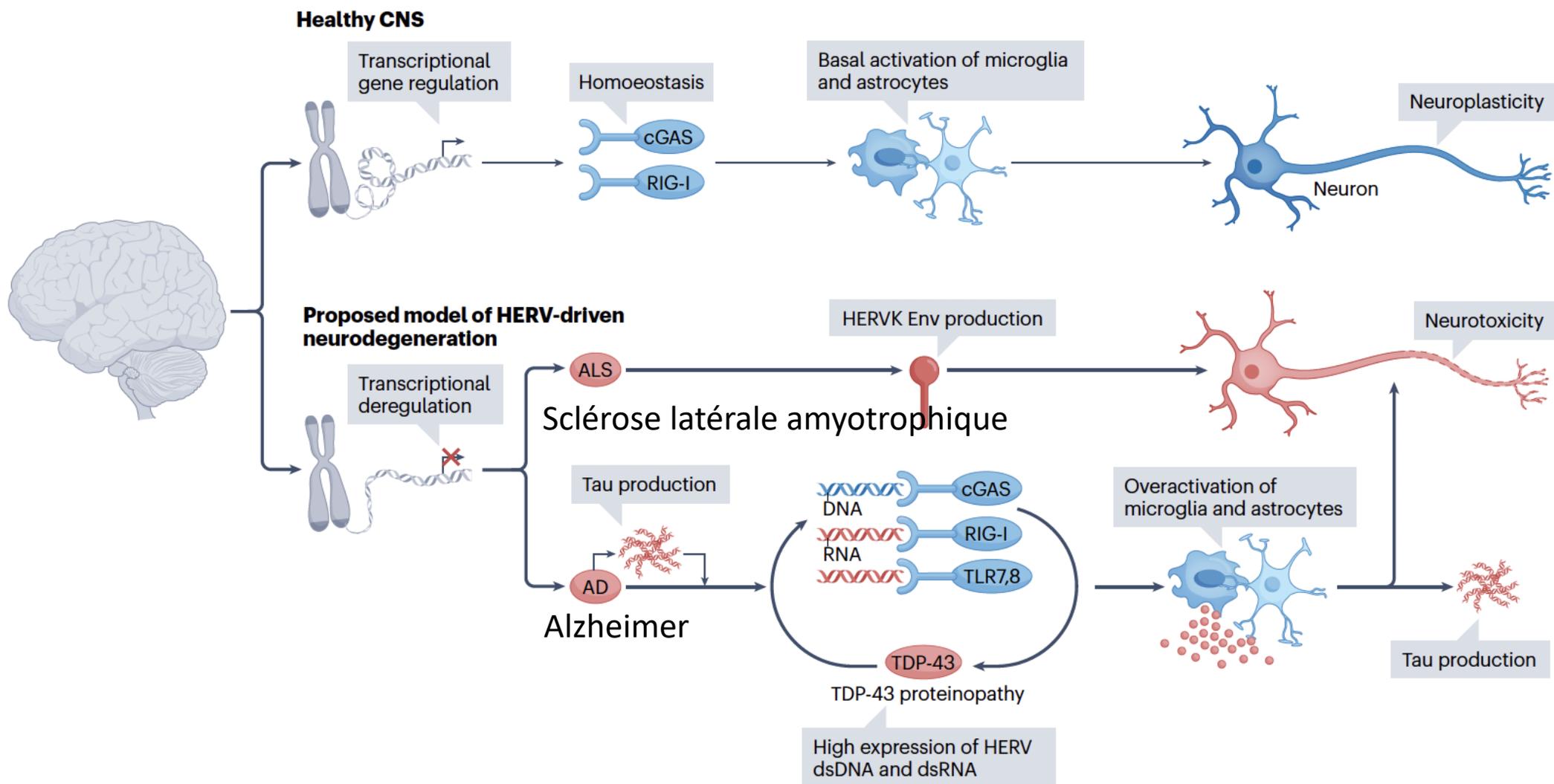


Fig. 1 | The endogenization of a retrovirus. **a**, Retroviruses bind to and fuse with a target cell (1) to release a capsid complex (2) that contains RNA copies of the retroviral genome, packaged with the factors (not shown) required for integration into the host genome. In the cytosol, viral reverse transcriptases (RTases) produce a DNA molecule of the retroviral RNA genome (3), which is trafficked into the nucleus for genomic integration (4), thereby forming a provirus. **b**, Proviruses

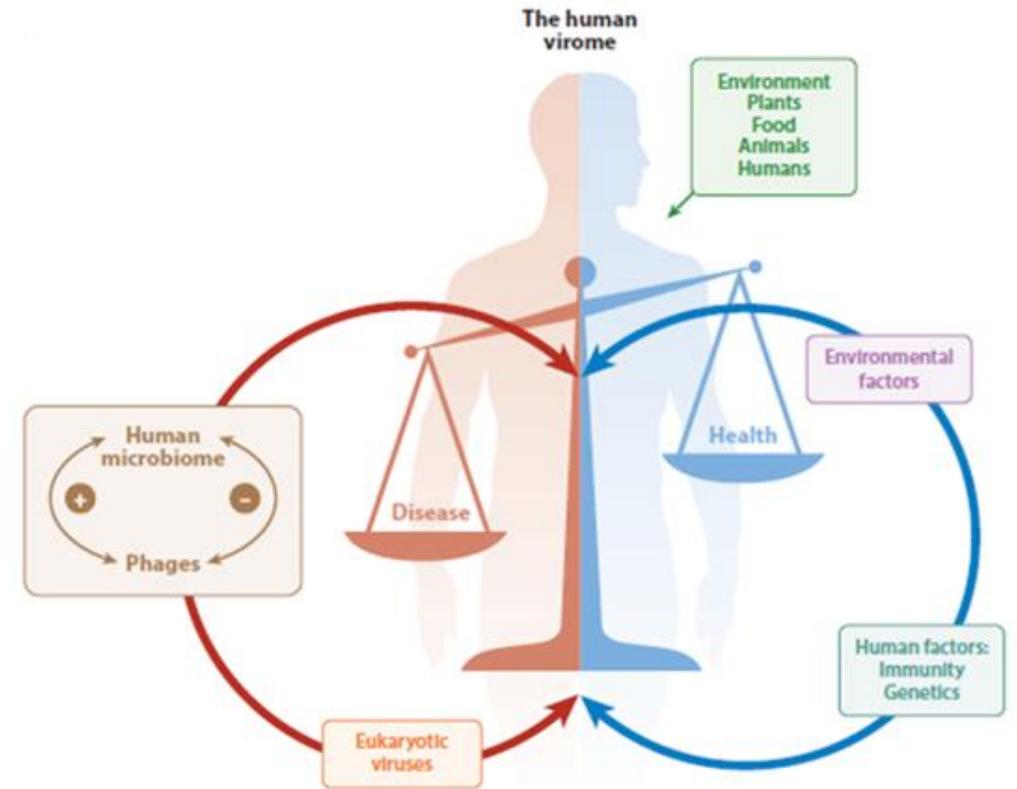
can undergo deletions, point mutations, and/or recombination (not shown) that yield endogenized retroviral genes incapable of producing infectious particles. Internal recombination between flanking long terminal repeats (LTRs) of a full-length provirus can yield a solo LTR without coding regions. The nonsense mutation is depicted as a vertical line. *env*, envelope gene; *gag*, group-specific antigen gene; PBS, primer-binding site; *pol*, polymerase gene; *pro*, protease gene.

HERV et maladies neurodégénératives

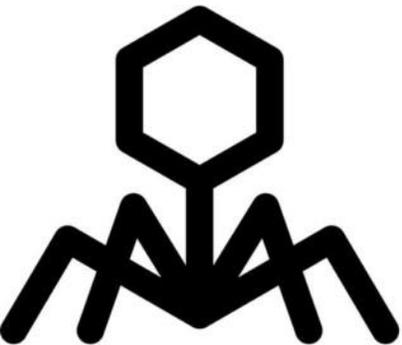


Virome – immunodépression

- De plus en plus étudié
- Prolifération au niveau entérique des phages, Adenovirus et des Anellovirus lors des entéropathies survenues chez le patient VIH au stade SIDA
- Augmentation du virome eucaryote entérique après greffe de CSH (Présence de *Picobirnaviridae* qui serait prédictive de la survenue d'une GvHD)
- Augmentation des *Anelloviridae* en cas d'IS
- Augmentation des phages sanguins chez l'ID



Fonctions du virome



Régulent :

Composition du microbiote bactérien

- Par lyse de la bactérie hôte
- Lyse de la bactérie prédominante dans l'intestin du nourrisson (« *kill the winner* »)

Fonctions du microbiote bactérien

- Par lysogénie : intégration du génome phagique dans le génome bactérien
- Transfert de gène horizontal

Immunité

- Bactériophages adhérant au mucus : protection contre les pathogènes bactériens
- Interaction avec le système immunitaire humain

Rôle pour l'être humain :

Défavorable

- Virus pathogènes, infections asymptomatiques +/- fréquentes
- Ex : *Picornaviridae*, *Adenoviridae* ...

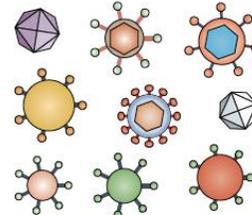
Neutre

- Commensalisme simple
- Ex : *Anelloviridae*, *Circoviridae*, la plupart des *Papillomaviridae*

Favorable

- Mutualisme
- Protection anti-infectieuse : GBV-C, MCMV
- HERV-W : syncytine pour former le placenta

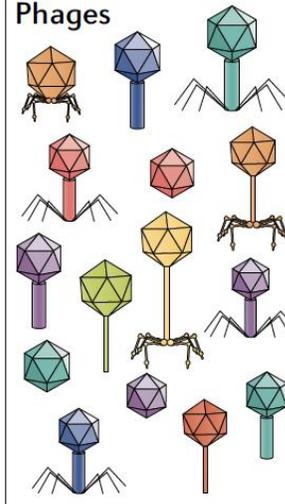
Eukaryotic viruses



Cause acute and chronic infections

Protect the host from viral infections and trigger the development of innate immunity

Phages

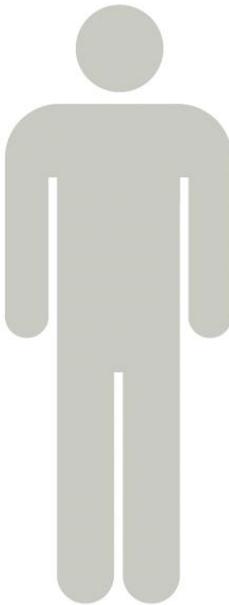
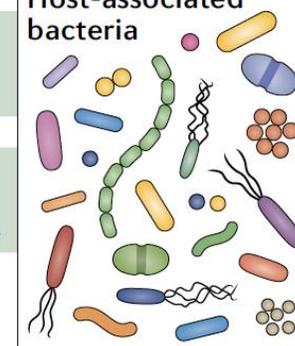


Activate immune responses via TLR signalling

Modulate bacterial abundance

Transfer DNA and modify bacterial fitness and virulence

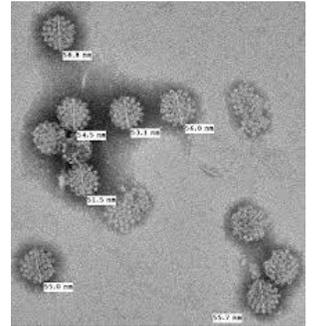
Host-associated bacteria



Applications diagnostiques de la métagénomique

- Etudes de métagénomique virale dans des situations pathologiques chez l'homme:
 - Diarrhées
 - Pneumopathies
 - Fièvre inexpliquée
 - Pathologies tumorales...

Feng *et al* Science 2008



- Découverte en 2008 par l'équipe de Chang et Moore d'un nouveau virus à partir du séquençage haut débit sur des lésions de carcinome à cellules de Merkel (tumeur cutanée neuroendocrine): Polyomavirus des cellules de Merkel
- Découverte de nombreux virus (Anellovirus, Picornavirus, Polyomavirus...) mais pas d'implication en pathologie humaine prouvée

Conclusion

- Virome: champ de recherche en pleine expansion
- Manque de données chez l'individu sain → problème d'interprétation du virome en situation pathologique
- Bases de données virales incomplètes (bactériophages ++) et une grande partie du virome n'est pas caractérisée (« matière noire virale »)
- Développement de technologies de séquençage permettant une meilleure caractérisation du virome