



# Microbiome, Virome et Mycobiome

Geneviève Héry-Arnaud

Bactériologie

CHRU Brest

Université de Bretagne Occidentale



## Déclaration de liens d'intérêt avec les industries de santé en rapport avec le thème de la présentation (loi du 04/03/2002) :

**Intervenant :** HERY-ARNAUD Geneviève

**Titre :** Microbiome, virome et mycobiome

L'orateur ne souhaite pas répondre

Consultant ou membre d'un conseil scientifique

OUI  NON

Conférencier ou auteur/rédacteur rémunéré d'articles ou documents

OUI  NON

Prise en charge de frais de voyage, d'hébergement ou d'inscription à des congrès ou autres manifestations

OUI  NON

Investigateur principal d'une recherche ou d'une étude clinique

OUI  NON

# « *L'autre moi-même ...* »

- Etre humain = « méta-organisme » :
  - Bactéries
  - Archées
  - Virus
  - Eucaryotes :
    - Levures, champignons
    - Protozoaires
    - ... Cellules humaines



*Homo sapiens, une espèce hybride (P. Sansonetti)*

# *Mostly microbes?*

« L'autre  
moi  
-même »

Ratio  
Cellules eucaryotes / cellules procaryotes

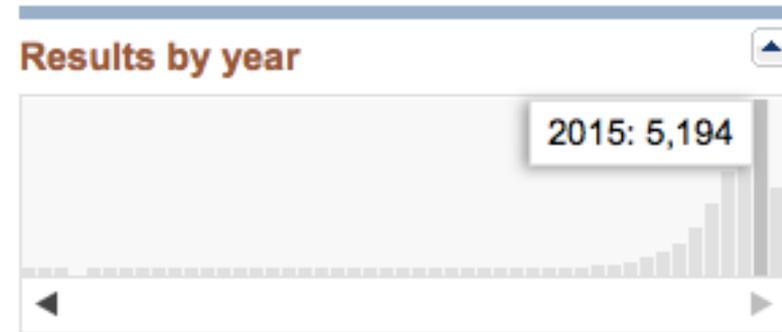
≈ 1

# Un bond technologique pour un boom scientifique

- Accès à l'incultivable (incultivé)
  - 1000 espèces bactériennes / individu
  - En majorité : non cultivées
  - Description : grâce aux techniques « culture-indépendantes »
  - Gros projets européens et USA



« Human Microbiome »



# Un bond technologique pour un boom scientifique



Illumina GA IIx



ABI SOLiD

## SEQUENÇAGE MASSIF



454 GS FLX +  
0.6Gb/23hr run



Illumina HiSeq 2000 (2500<sup>+</sup>)  
600 Gb/11day run



Ion Torrent  
1Gb/2hr run



Ion Proton  
100Gb/4 hr Run



minION

- Nb important de séquences (**profondeur de séquençage**)
- Traitement de plusieurs échantillons simultanément (**multiplexage**)
- Facteur limitant : capacité d'analyse des données (T)



# Cent mille milliards de bactéries

Organ / Part of the digesting system	Typical concentration of bacteria <sup>(1)</sup> (number/ml content)	Volume (ml)	Order of magnitude bound for bacteria number
Colon (large intestine)	$10^{11}$	420±90 <sup>(2)</sup>	$10^{14}$
Dental plaque	$10^{11}$	<10	$10^{12}$
Saliva	$10^9$	<100	$10^{11}$
Skin	< $10^7$ per cm <sup>2</sup> <sup>(3)</sup>	1.9 m <sup>2</sup> <sup>(4)</sup>	$10^{11}$
Duodenum and Jejunum (upper small intestine)	$10^3$ - $10^4$	400 <sup>(5)</sup>	$10^{11}$
Ileum (lower small intestine)	$10^8$		
Stomach	$10^3$ - $10^4$	250 <sup>(5)</sup> - 900 <sup>(6)</sup>	$10^7$
Lung			$10^5$
Urinary Tract			$10^5$ - $10^6$

Sender et al., BioRxiv 2016

Charlson et al., PLoS ONE 2010

Lewis et al., Front Cell Infect Microbiol 2013

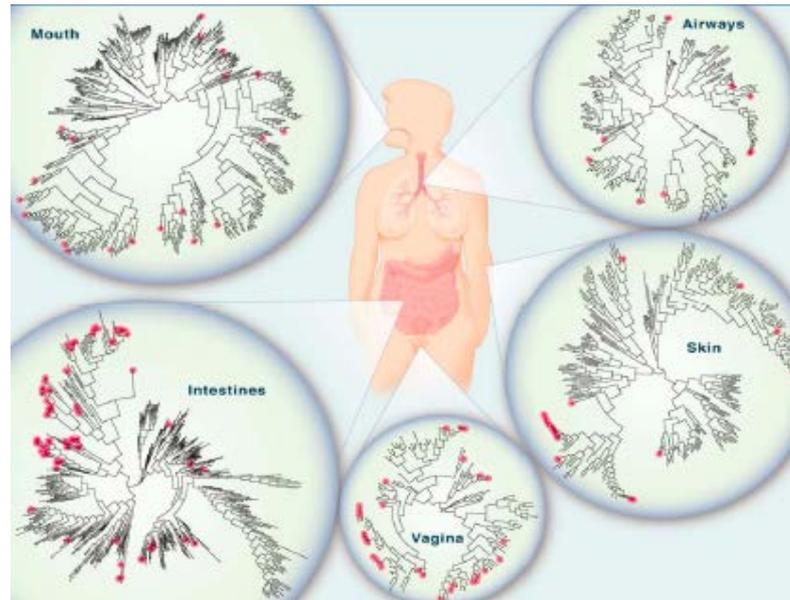
# Cent mille milliards de bactéries

Si le microbiote = organe

Anatomie (structure)

+

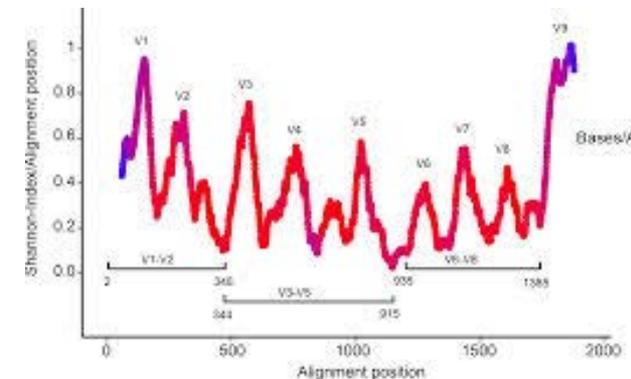
Fonction



Méthodes ?  
Biais ?

# Structure du microbiote

- Outil le plus utilisé : « 16S »
  - **Gène universel**: chez toutes les bactéries (NB : 18S ou ITS chez les fungi)
  - Suffisamment **conservé** pour permettre :
    - Une amplification
    - Un alignement fiable
  - Suffisamment **variable** pour permettre l'affiliation taxonomique (« who's who? ») et l'analyse phylogénétique



→ *Choix des amorces pour amplifier le gène ARNr 16S : crucial*

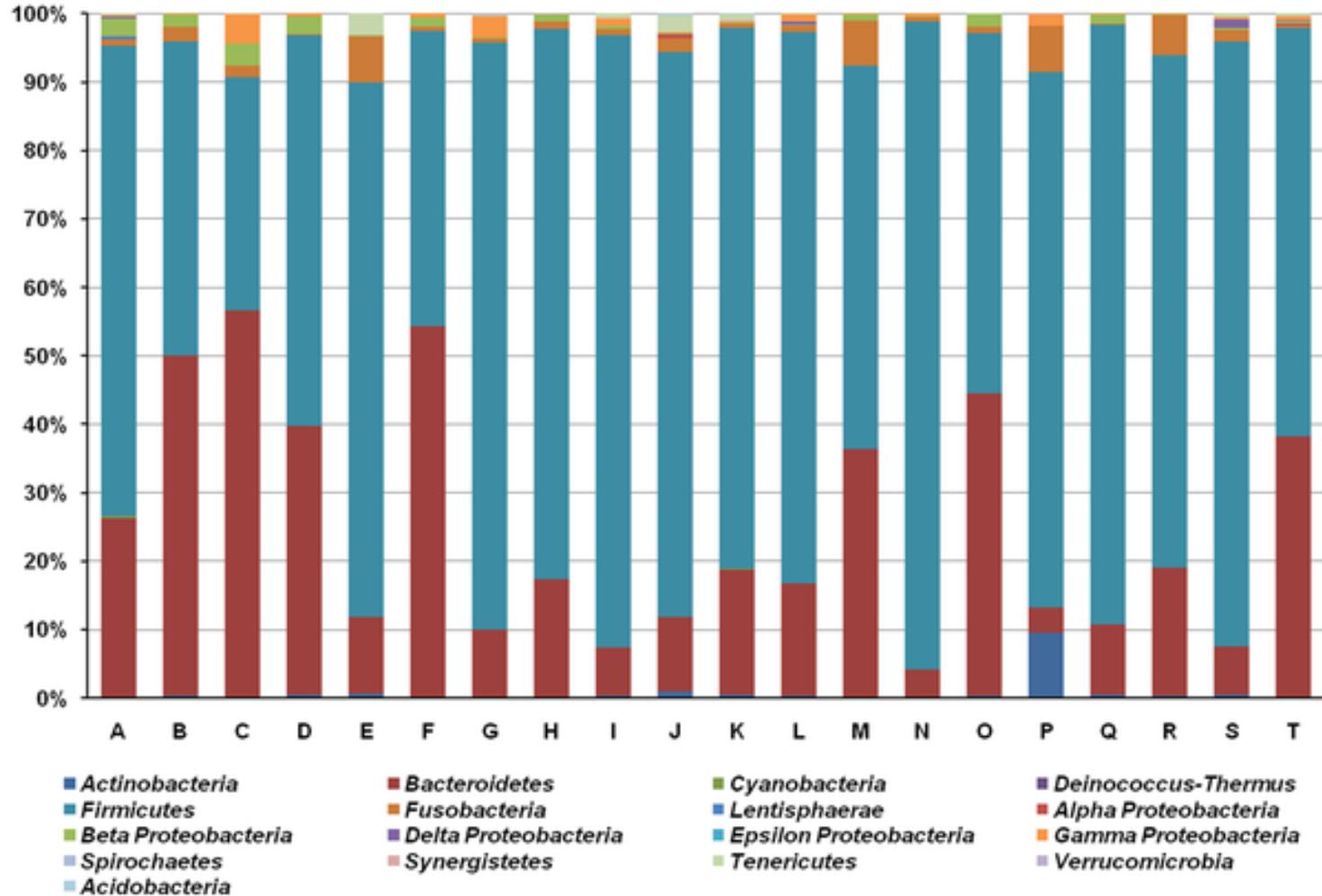
# Structure du microbiote

- Composition : *le « who's who » du microbiote*
  - Description aux différents rangs taxonomiques



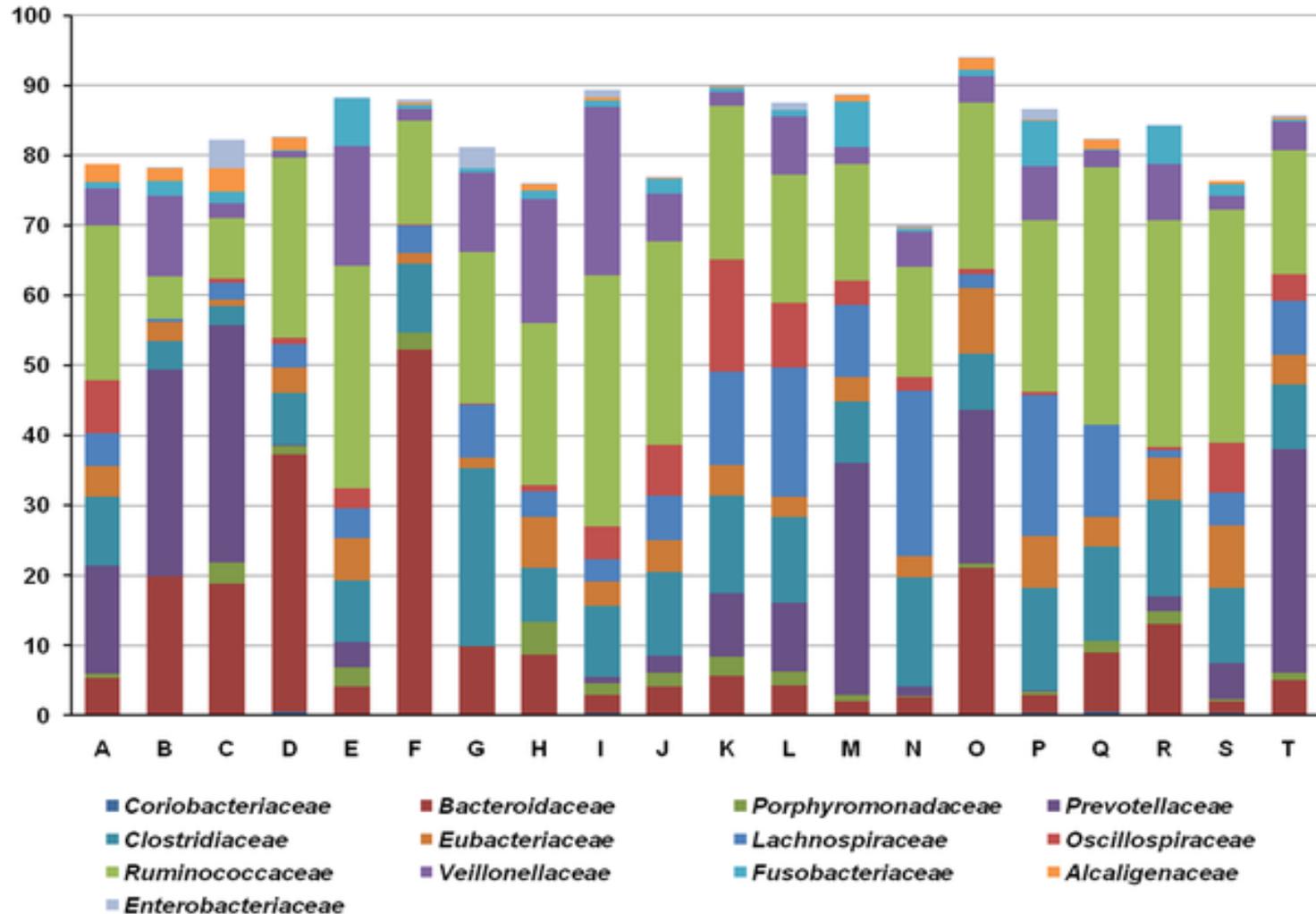
→ *L'appréciation d'un microbiote peut changer en fonction du niveau d'analyse taxonomique.*

# Microbiote intestinal : variabilité interindividuelle modérée au niveau des phyla



Nam YD, Jung MJ, Roh SW, Kim MS, Bae JW (2011) Comparative Analysis of Korean Human Gut Microbiota by Barcoded Pyrosequencing. PLoS ONE 6(7): e22109.

# Microbiote intestinal : variabilité interindividuelle importante au niveau des familles

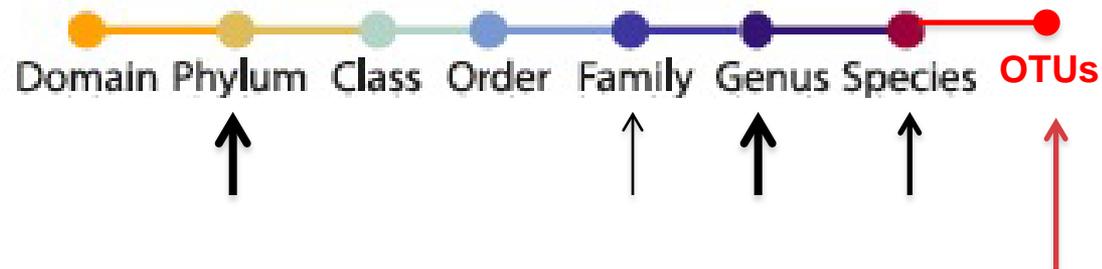


Nam YD, Jung MJ, Roh SW, Kim MS, Bae JW (2011) Comparative Analysis of Korean Human Gut Microbiota by Barcoded Pyrosequencing. PLoS ONE 6(7): e22109.

# Structure du microbiote

- Composition : *le « who's who » du microbiote*

- Description aux différents rangs taxonomiques



- Niveau supplémentaire : **Operational Taxonomic Unit**
  - = Groupe d'individus dont les séquences 16S (« reads ») sont similaires à au moins 97%
  - ≈ Espèce moléculaire

# Structure du microbiote

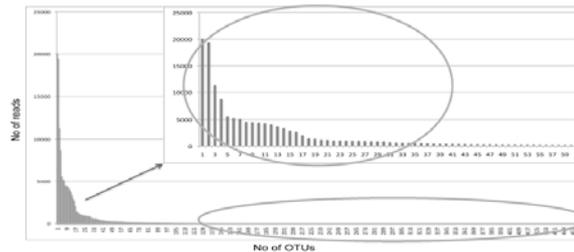
- Composition : *le « who's who » du microbiote*
  - 2 articles sur le microbiote intestinal (modèle murin)
    - Article 1 : 74 OTUs représentent 90% des séquences
    - Article 2 : 30 OTUs ...

→ Problème = surestimation des OTUs

→ surestimation de la biodiversité

- Intrinsèque au séquençage qui introduit des erreurs

→ *Nécessité : maîtrise du « pipeline » bioinformatique*



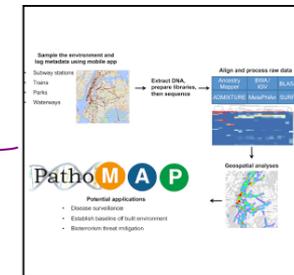
# Structure du microbiote

- Composition : cies-level identification were known pathogens, including fragments that matched to the genomes of *Yersinia pestis* (Bubonic plague) and *Bacillus anthracis* (anthrax).
  - De la peste dans le métro new-yorkais !
  - Problème = affiliation taxonomique hasardeuse
    - *Yersinia* spp. → *Y. pestis* ...
  - Connaître les limites du 16S en fonction des groupes taxonomiques.

## Cell Systems

### Geospatial Resolution of Human and Bacterial Diversity with City-Scale Metagenomics

#### Graphical Abstract

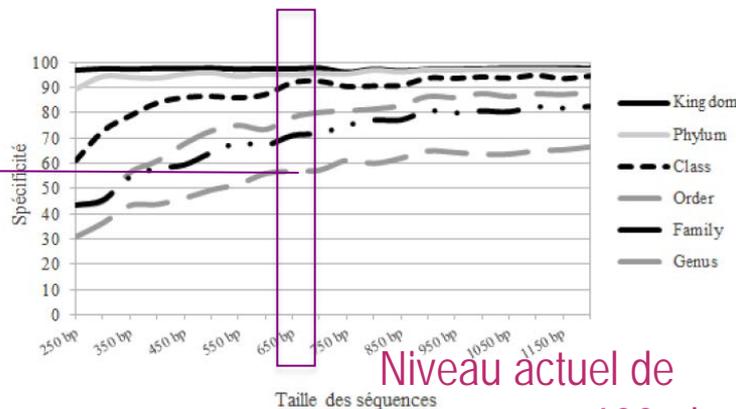


Authors  
Ebrahim Afshinnekoo, Cem Meydan, Shanthi Chowdhury, Jane M. Carlton, Shawn Levy, Christopher E. Mason

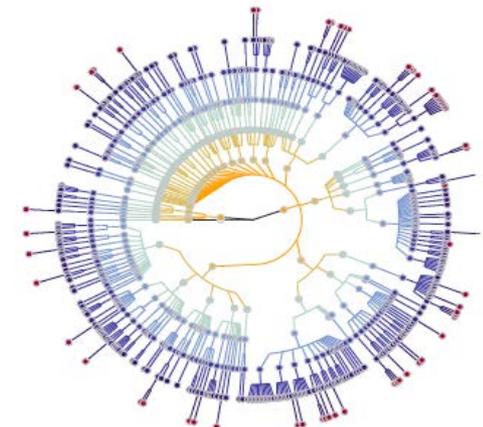
Correspondence  
chm2042@med.cornell.edu

In Brief  
Afshinnekoo et al. describe a city-scale molecular profile of DNA collected from a city's subway system, public surfaces, and one waterway. These data enable a baseline analysis of bacterial, eukaryotic, and archaeal organisms in the built environment of mass transit and urban life.

60%  
de  
spécificité  
à l'espèce



Niveau actuel de  
séquençage : 600 pb

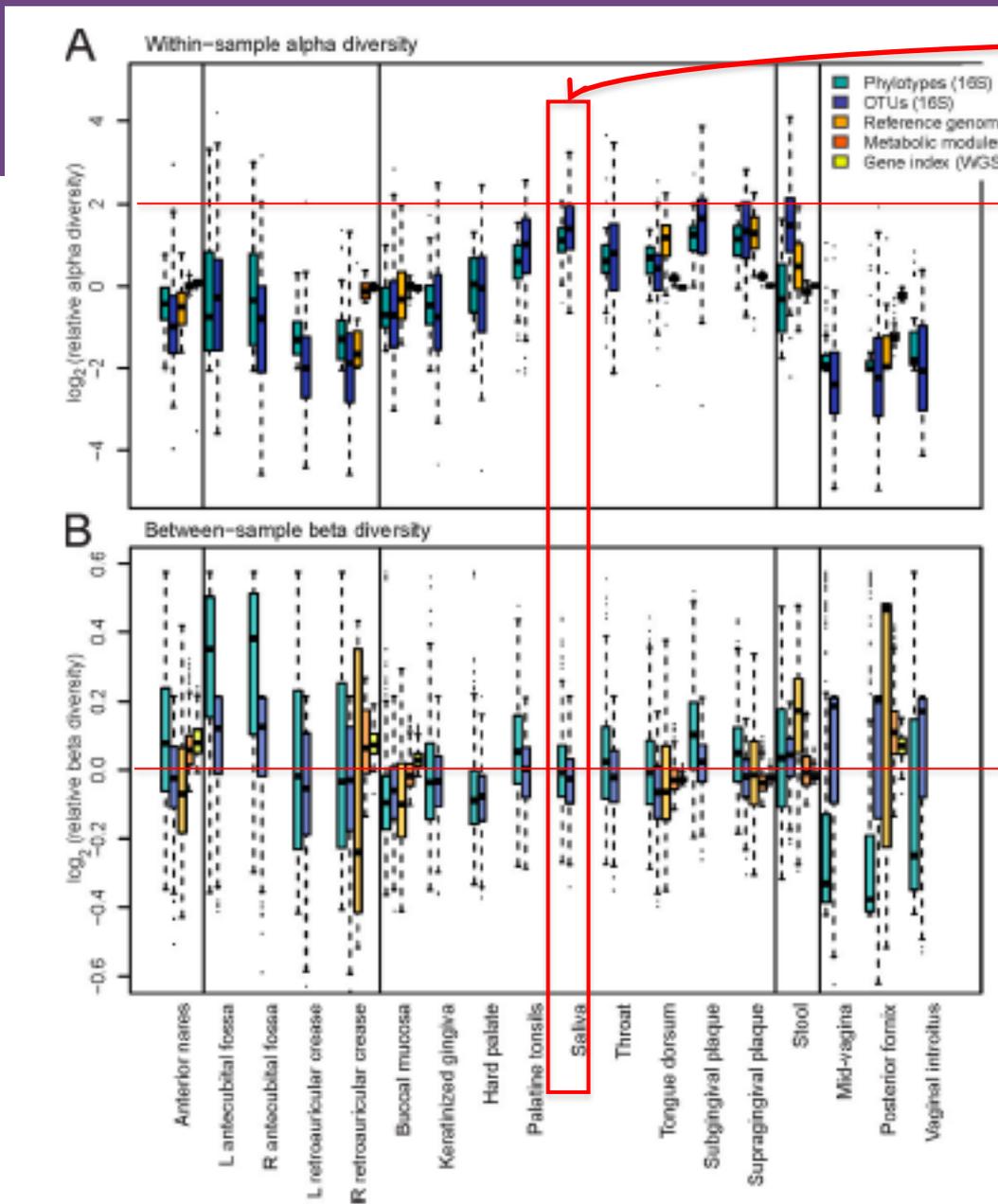


# Structure du microbiote

- Richesse et biodiversité : *des indices !*
  - **Richesse** : nombre d'OTUs par échantillon
  - **Biodiversité** : nombre d'OTUs et leur abondance relative
  - Estimateurs de la richesse : *courbes de raréfaction, Chao-1*
  - Estimateurs de la biodiversité : **Shannon, Simpson**  
+ indices augmentent, + la diversité est forte  
= indices d' $\alpha$ -diversité : intrinsèque à chaque échantillon
  - **$\beta$ -diversité** = comparaison des échantillons entre eux
    - *Indice de Bray-Curtis* (dissimilarité), *Unifrac* (phylogénie), ...

Intra-  
échantillon

Inter-  
échantillon



Salive

Forte  
biodiversité  
alpha



Faible  
biodiversité  
béta



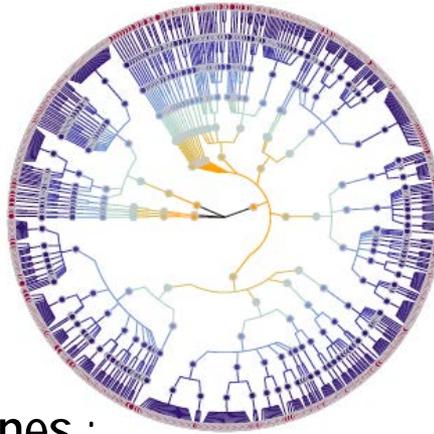
*Ecosystème riche  
(beaucoup d'espèces  
différentes)*

*Stable entre les  
individus*

Sites anatomiques

# Du microbiote structurel au fonctionnel

## WGS



Shotgun  
sequencing  
**METAGENOMIQUE**

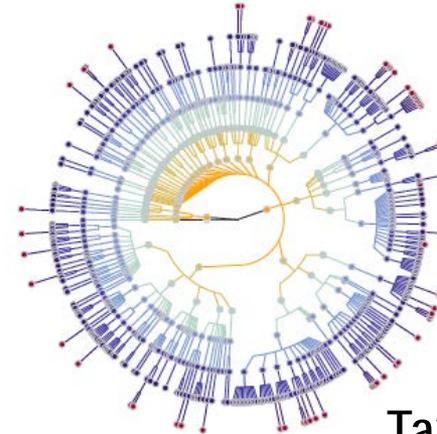
Information complète  
Accès à tous les gènes :  
ex. 16S, résistance (résistome) ...

**Taxonomie + Fonction**

Accès à tous les ADN/ARN :  
**Bactéries et fungi et virus** ... et eucaryotes

**Effort de séquençage +++**

## 16S (ITS)



PCR-  
séquençage  
**METAGENETIQUE**

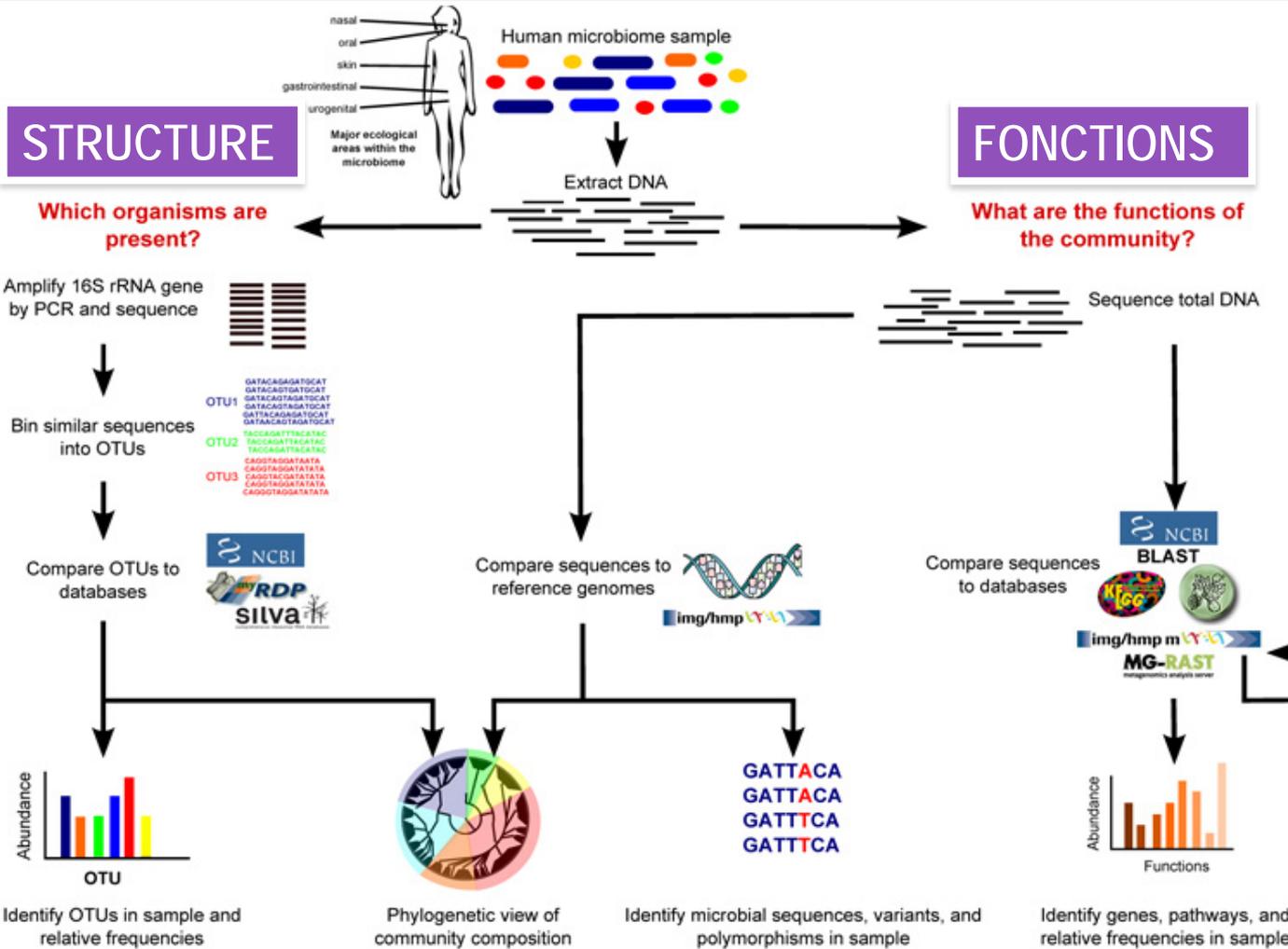
Information parcellaire  
Taxonomie uniquement  
**Bactéries ou fungi**



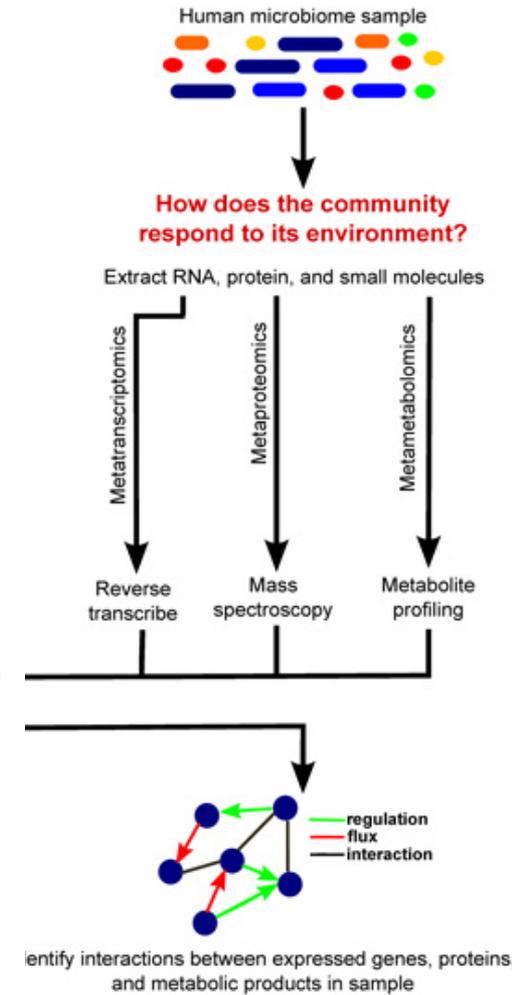
# Modus operandi

## Multi-OMICS

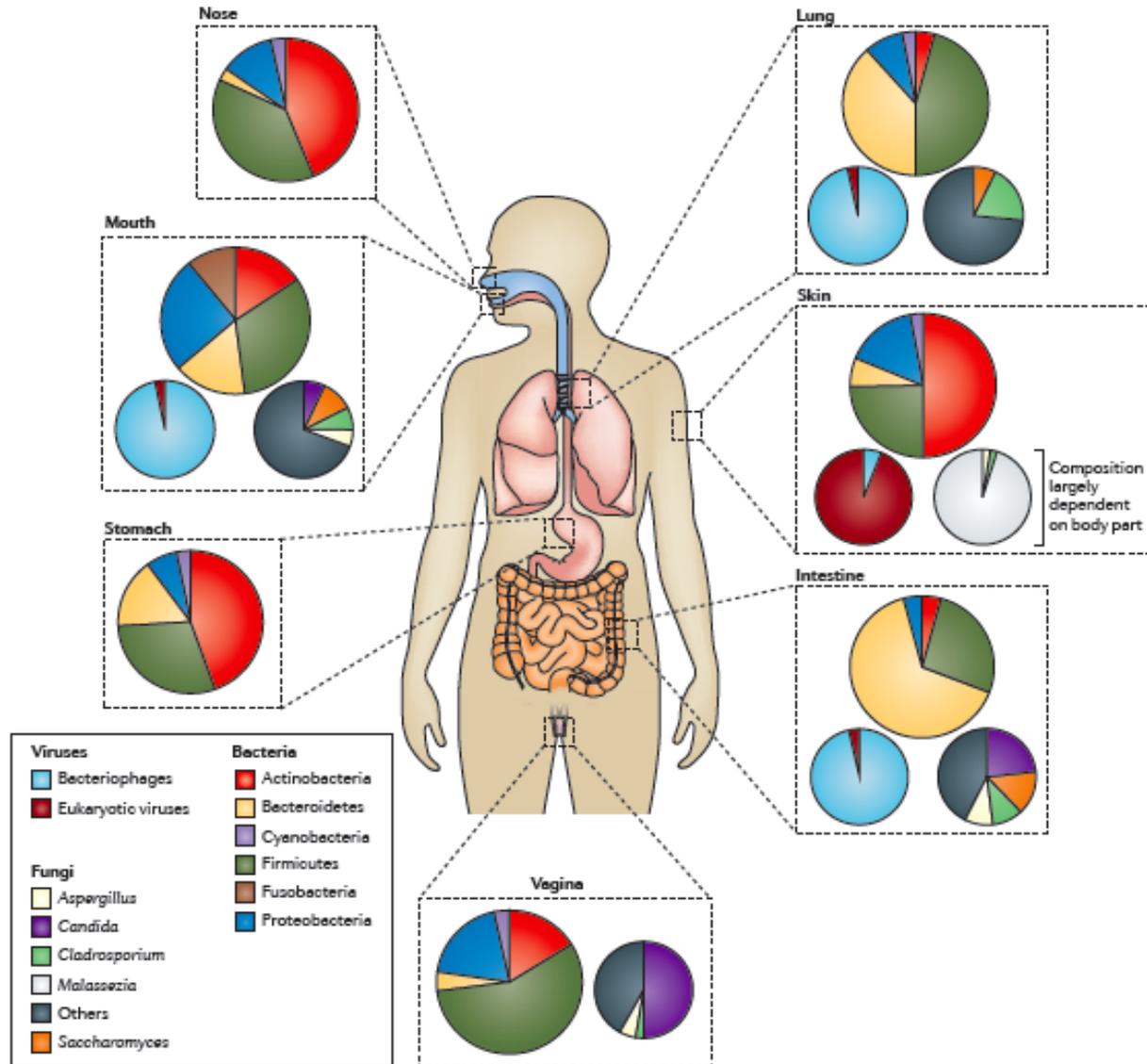
### Current techniques for human microbiome profiling



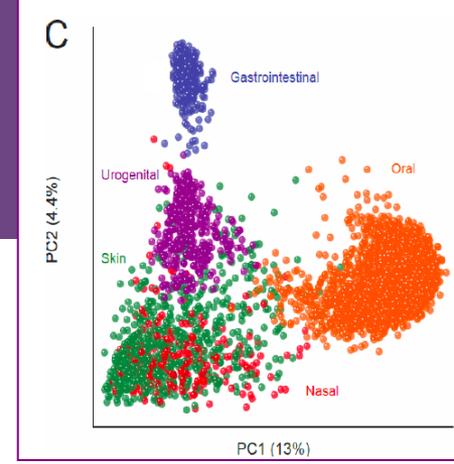
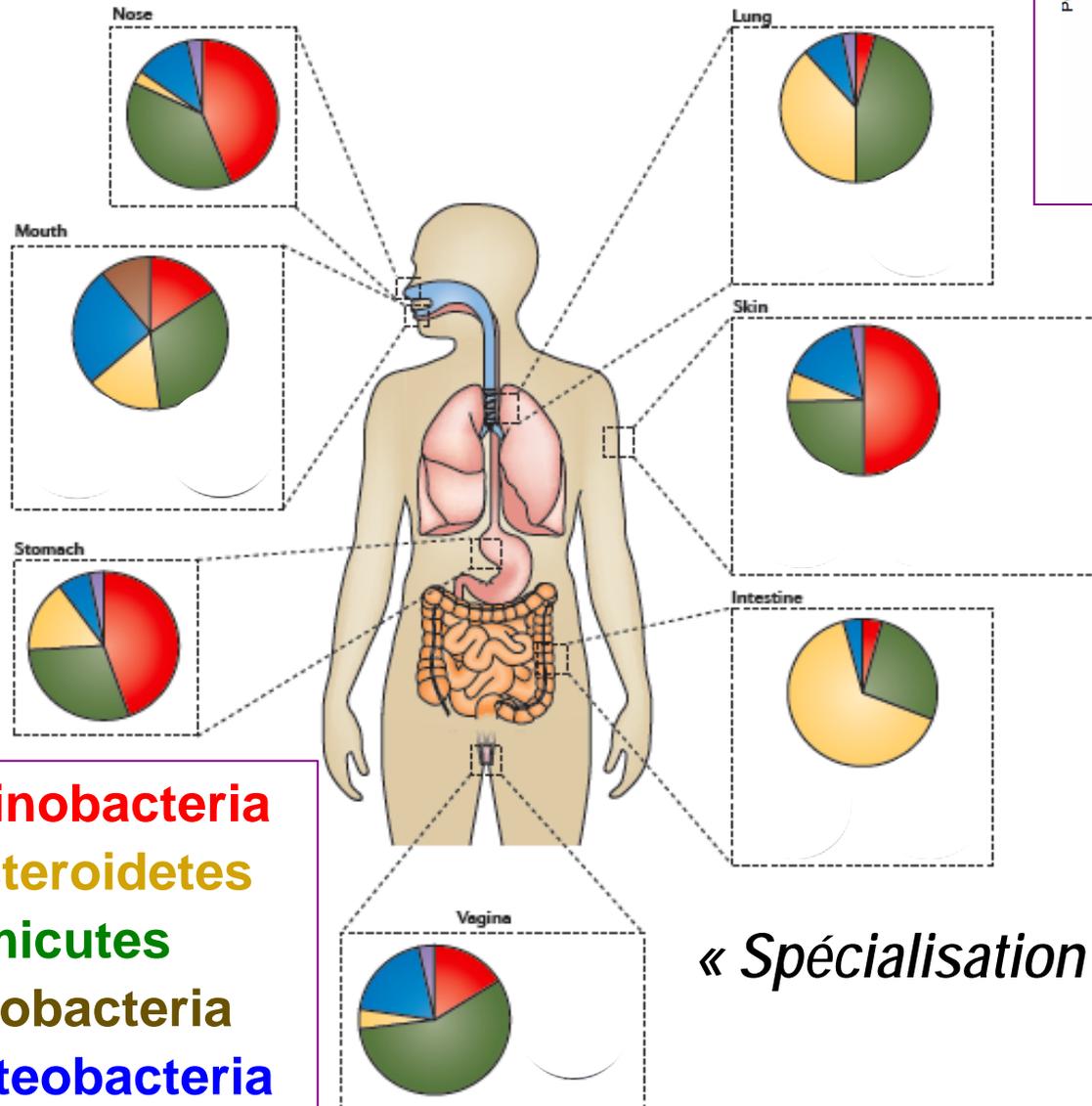
### Emerging methods



# Microbiome, Virome & Mycobiome : écologie



# Microbiome : écologie

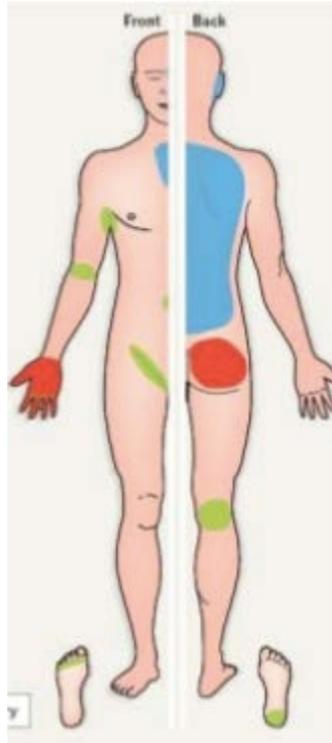


**Actinobacteria**  
**Bacteroidetes**  
**Firmicutes**  
**Fusobacteria**  
**Proteobacteria**

« Spécialisation de niches »



# Microbiote cutané : l'art de la variation



## 1. Variations spatiales

■ Zones humides (glandes sudoripares)

- *Staphylococcus*
- *Corynebacterium*

■ Zones séborrhéiques (glandes sébacées)

- *Propionibacterium*

■ Zones sèches

- Bactéries à Gram négatif
- Différents phyla bactériens

Grice et al. Science 2009; 324:1190

2 facteurs :  
Hôte  
+

Environnement

## 2. Variations temporelles

## 3. Variations inter-individuelles

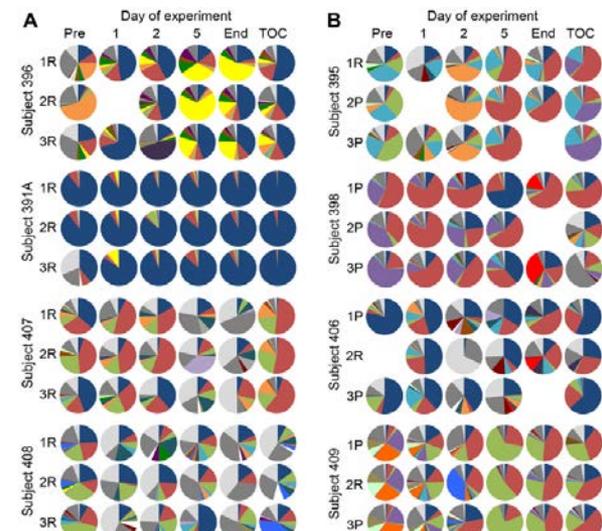
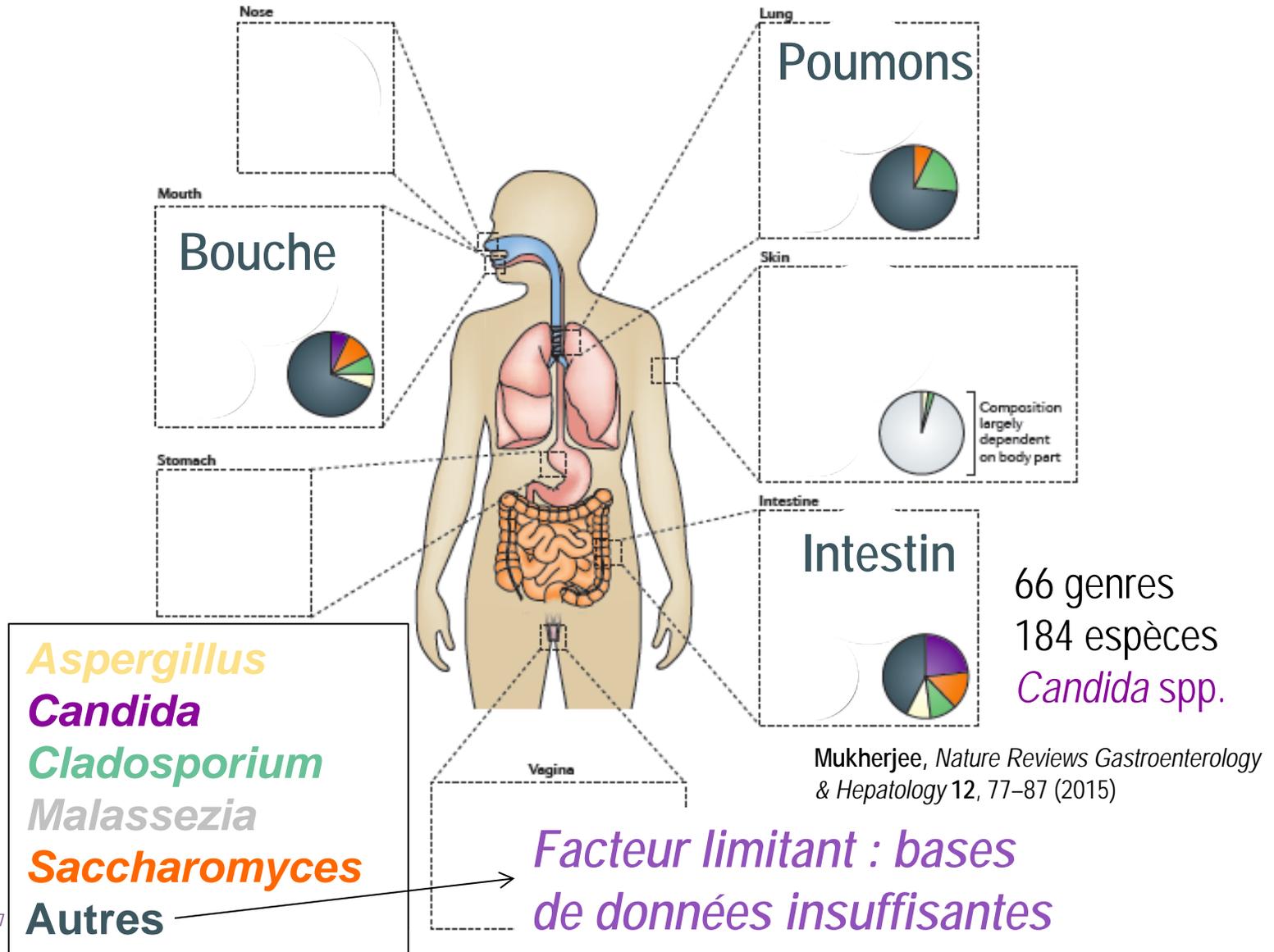
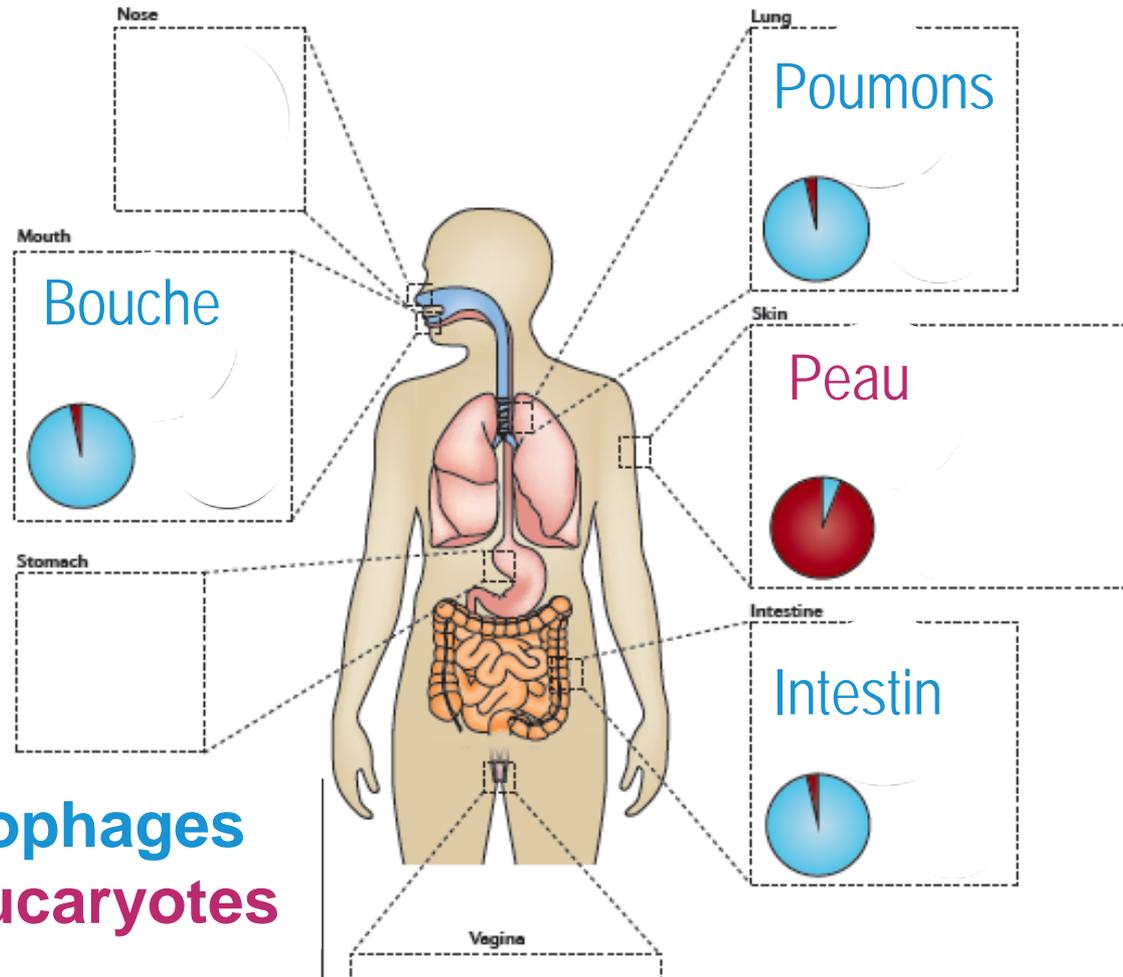


FIG 3 Distribution of the 20 most abundant genera, other classified genera, and unclassified genera in resolvers (A) and pustule (B) which sequence data were obtained are shown; no sequences were obtained for the missing samples.

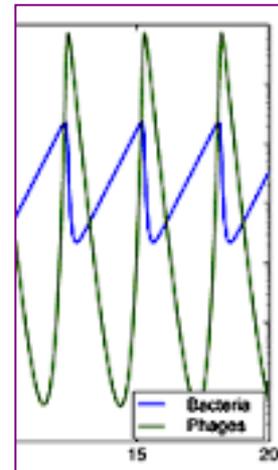
# Ecologie du mycobiome



# Ecologie du virome



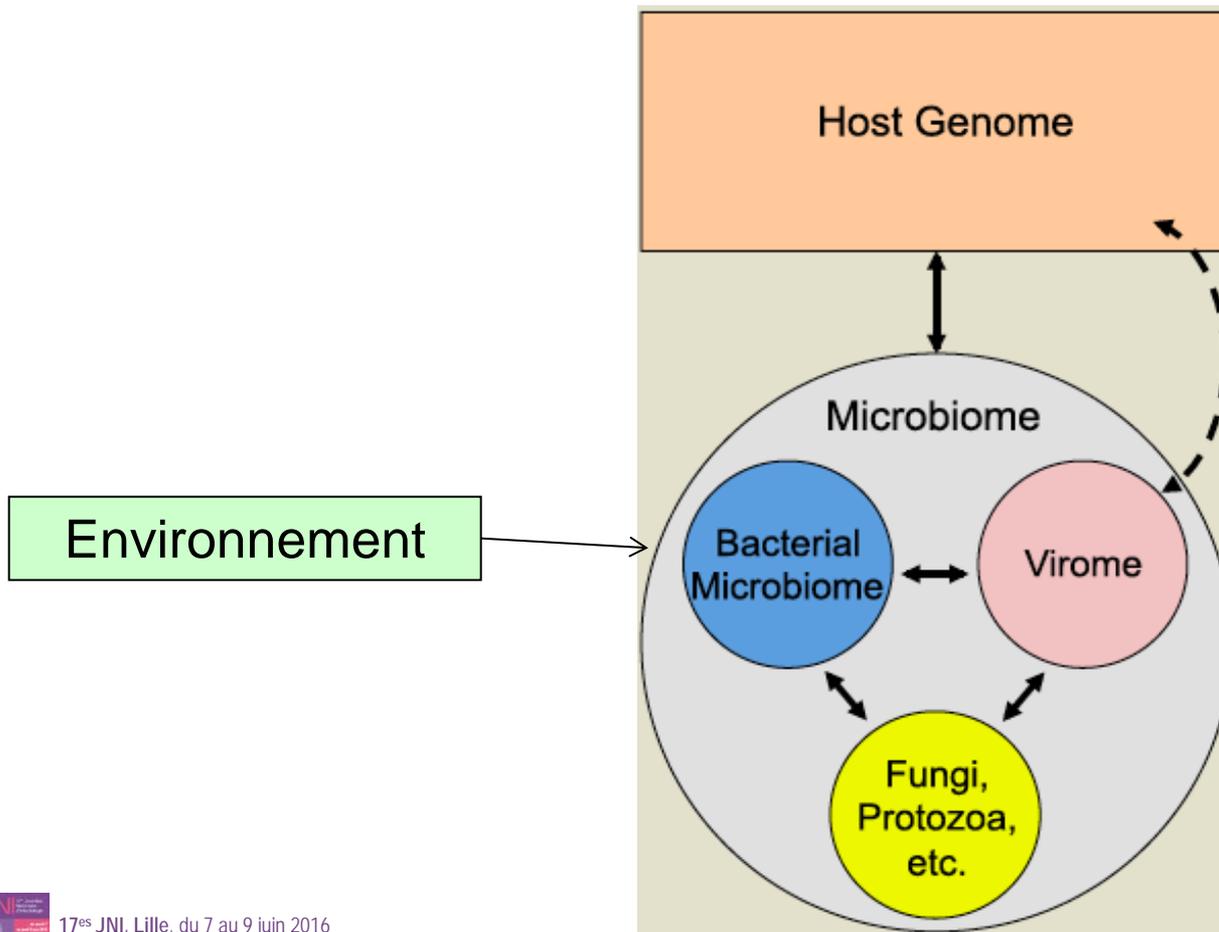
**Bactériophages**  
**Virus eucaryotes**



*Rôle dans la dynamique des colonisations bactériennes/fongiques*  
*Lien avec le génome de l'hôte*

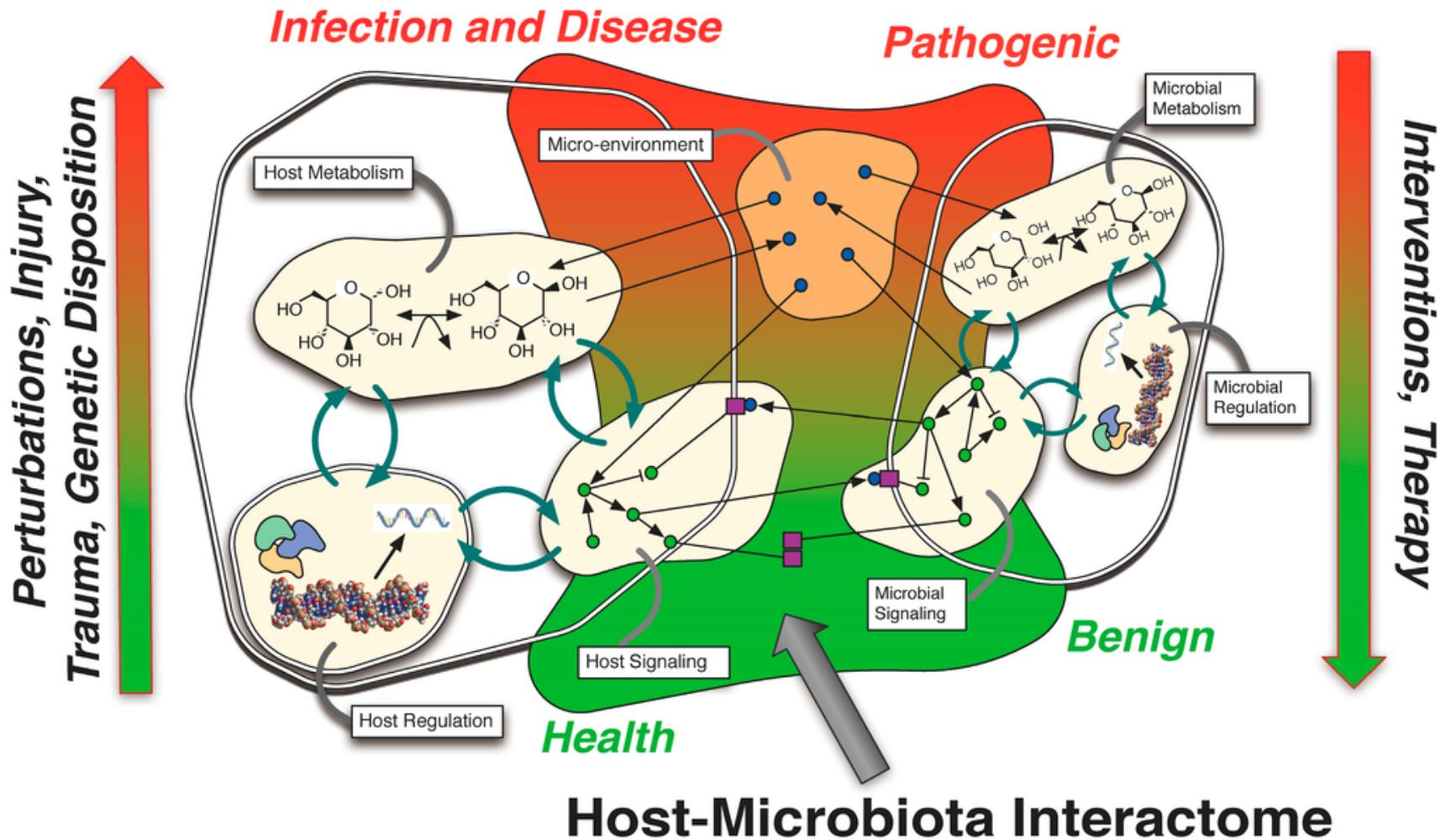
# Microbiome, Virome & Mycobiome : un tout

- Interactions multiples



<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2015.05.003>

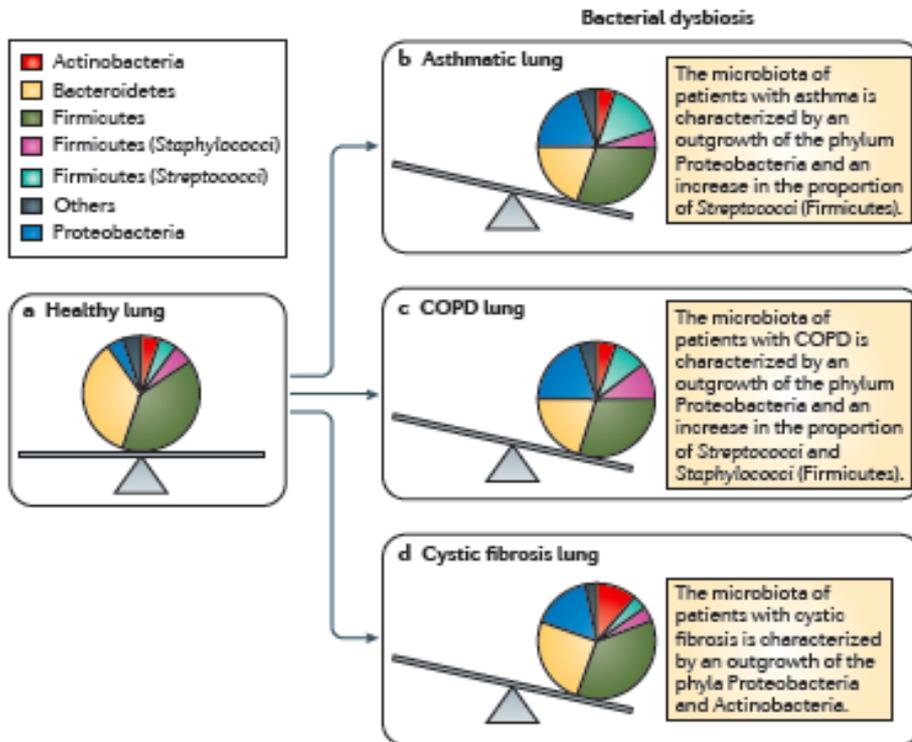
# Le microbiote, une affaire d'équilibre



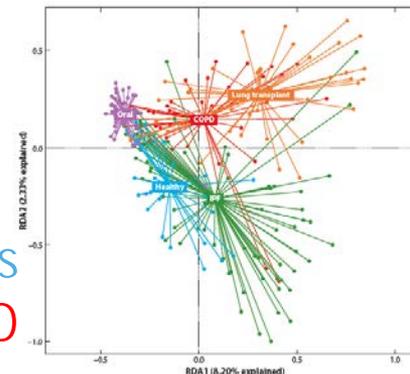
PATHOLOGIE = DYSBIOSE

# Ex. Dysbiose du microbiote pulmonaire

- **Modification de la structure + diminution de l' $\alpha$ -diversité**



Maladies chroniques  
pulmonaires (hyper-inflammation)



Une signature  
microbienne  
caractéristique  
de chaque  
pathologie

Sains  
BPCO

# En conclusion

- **Le microbiote en maladies infectieuses**
  - **Un œil neuf :**
    - Contamination → colonisation par un microbiote endogène (ex. ITU)
    - De nouveaux pathogènes parmi les non-cultivées ?
    - Des espèces dont il faut prendre soin (infectiologue et écologue !)
  - **Outil diagnostique, pronostique, de suivi** (médecine personnalisée)
  - **Outil pour les essais cliniques** (stratification des patients)
  - **Outil d'évaluation des traitements antibiotiques** (impact écologique = critère de choix)

# En conclusion

« Microbiome science needs a healthy dose of scepticism »



# Merci pour votre attention



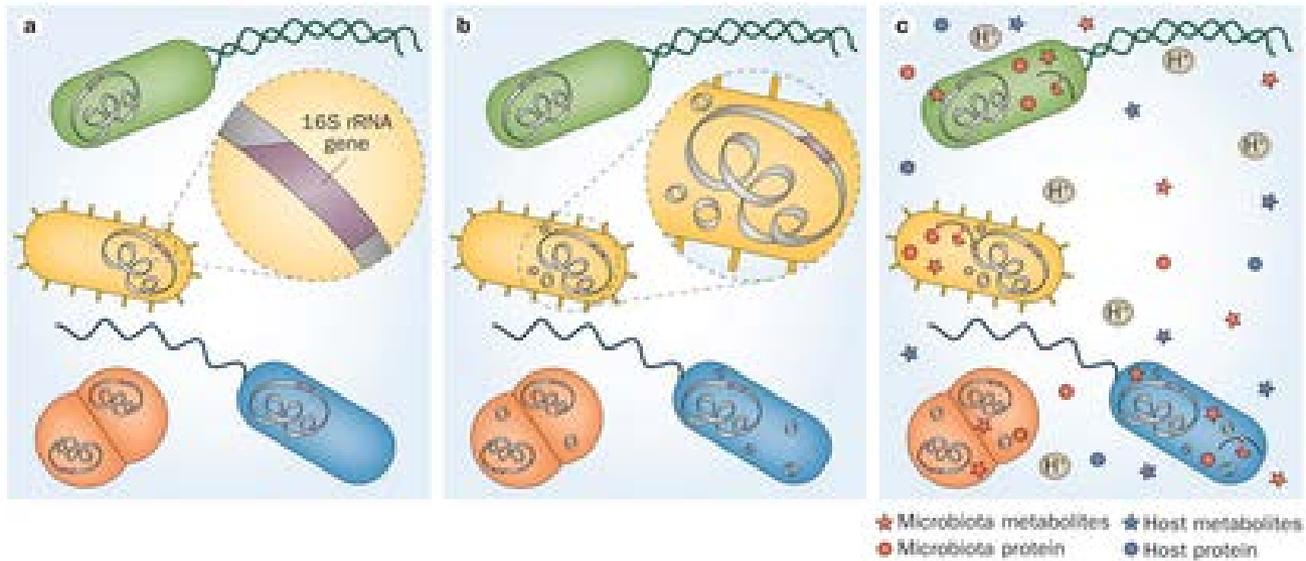
*Tullis, Nature June 2016*

# Définitions

Microbiote

Métagénome

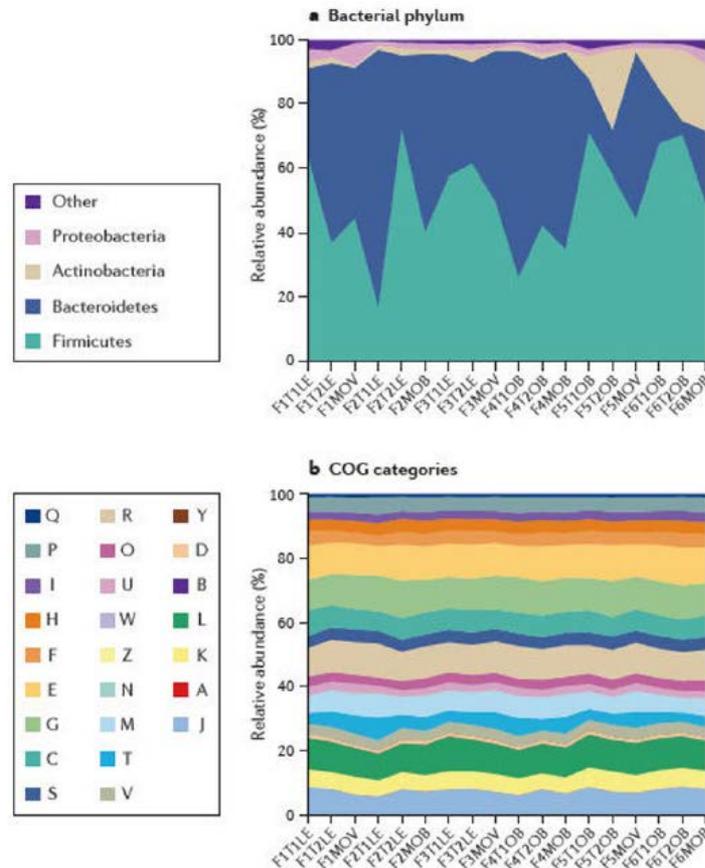
Microbiome



Whiteside et al., 2015 Nature Reviews | Urology

# Le microbiote fonctionnel

- Comparaison du microbiote digestif entre individus



Approche taxonomique  
(16S)

Approche fonctionnelle  
(voies métaboliques)

Figure 2. Conservation of bacterial genes despite taxonomic variation

# Microbiotes et VIH

- **Microbiote intestinal VIH+ :**

- **Etudes observationnelles contradictoires**

- Diminution de l' $\alpha$ -diversité ?
- Remplacement des *Bacteroides* par *Prevotella* ?
- Dysbiose moins importante chez les patients sous ARV
- *Bacteroidaceae* & *Lactobacillales* : effet protecteur contre baisse CD4

- **Microbiote oral VIH+**

- Diminution des *Streptococcus*
- Augmentation des *Prevotella* (marqueur inflammation ?)

- **Microbiote pulmonaire VIH+**

- Diminution de l' $\alpha$ -diversité et augmentation de la  $\beta$ -diversité
- Augmentation de *Tropheryma whipplei* ?

# Structure du microbiote

- Composition : *tout est relatif*
  - Un nombre fixe de « reads » générés par séquenceur
    - Ex. MiSeq (Illumina®) : 1 run = 20 millions de reads
  - En NGS : pas de quantification absolue possible → **abondance relative** (fréquence du nb de séquences de tel taxon)
    - Pour de la quantification absolue : qPCR
  - Le « **core-microbiote** » : notion de prévalence sous-jacente
    - Définition la plus appliquée : présence d'un taxon dans au moins 50% des échantillons.

# Microbiotes et VIH

- **Microbiote intestinal VIH+ :**

- **Etudes observationnelles contradictoires**

- Diminution de l' $\alpha$ -diversité ?
- Remplacement des *Bacteroides* par *Prevotella* ?
- Dysbiose moins importante chez les patients sous ARV
- *Bacteroidaceae* & *Lactobacillales* : effet protecteur contre baisse CD4

- **Microbiote oral VIH+**

- Diminution des *Streptococcus*
- Augmentation des *Prevotella* (marqueur inflammation ?)

- **Microbiote pulmonaire VIH+**

- Diminution de l' $\alpha$ -diversité et augmentation de la  $\beta$ -diversité
- Augmentation de *Tropheryma whipplei* ?