

Il n'y a pas que des bactéries dans le
microbiote intestinal:
zoom sur les **phages**

Camille d'Humières

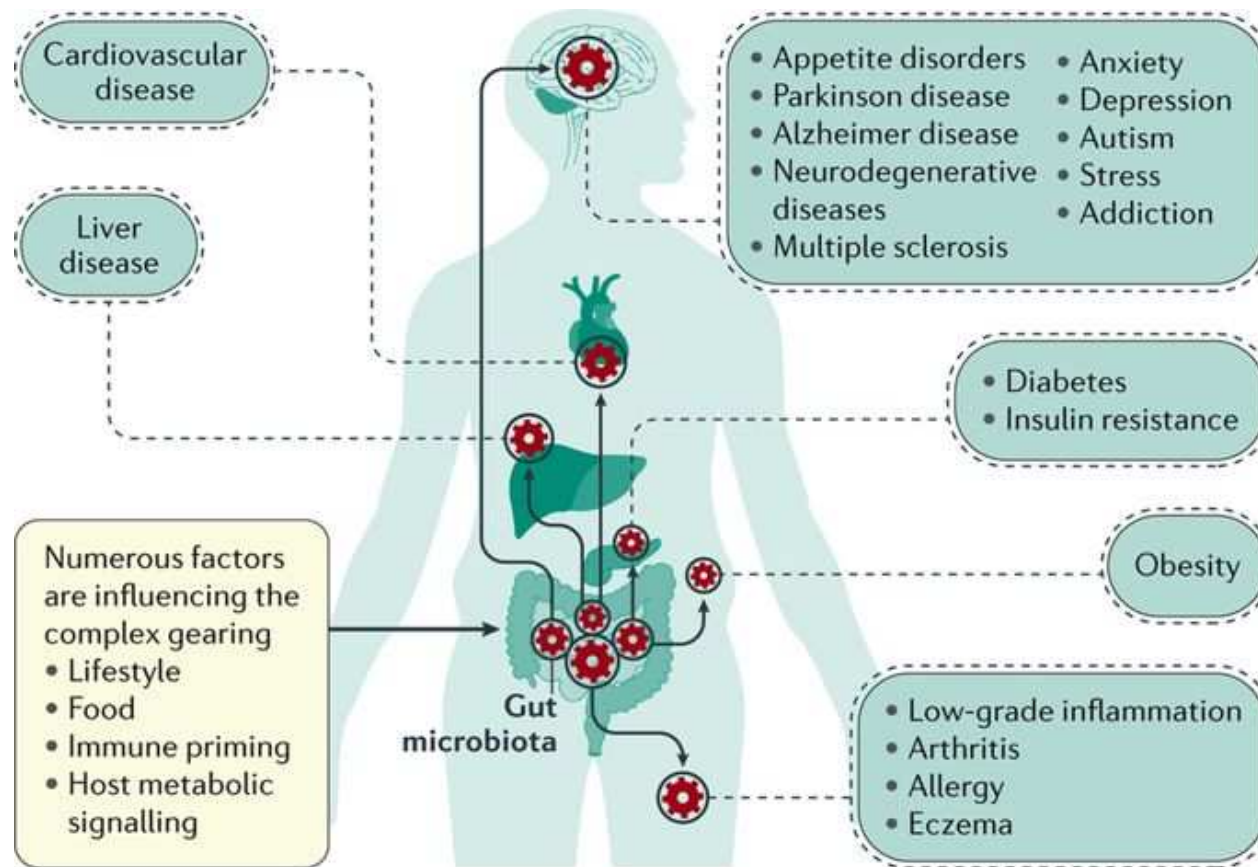
PHU – Bactériologie, Hôpital Bichat, Paris (L. Armand)

Etudiante en thèse (E. Denamur, E. Rocha)

Plan

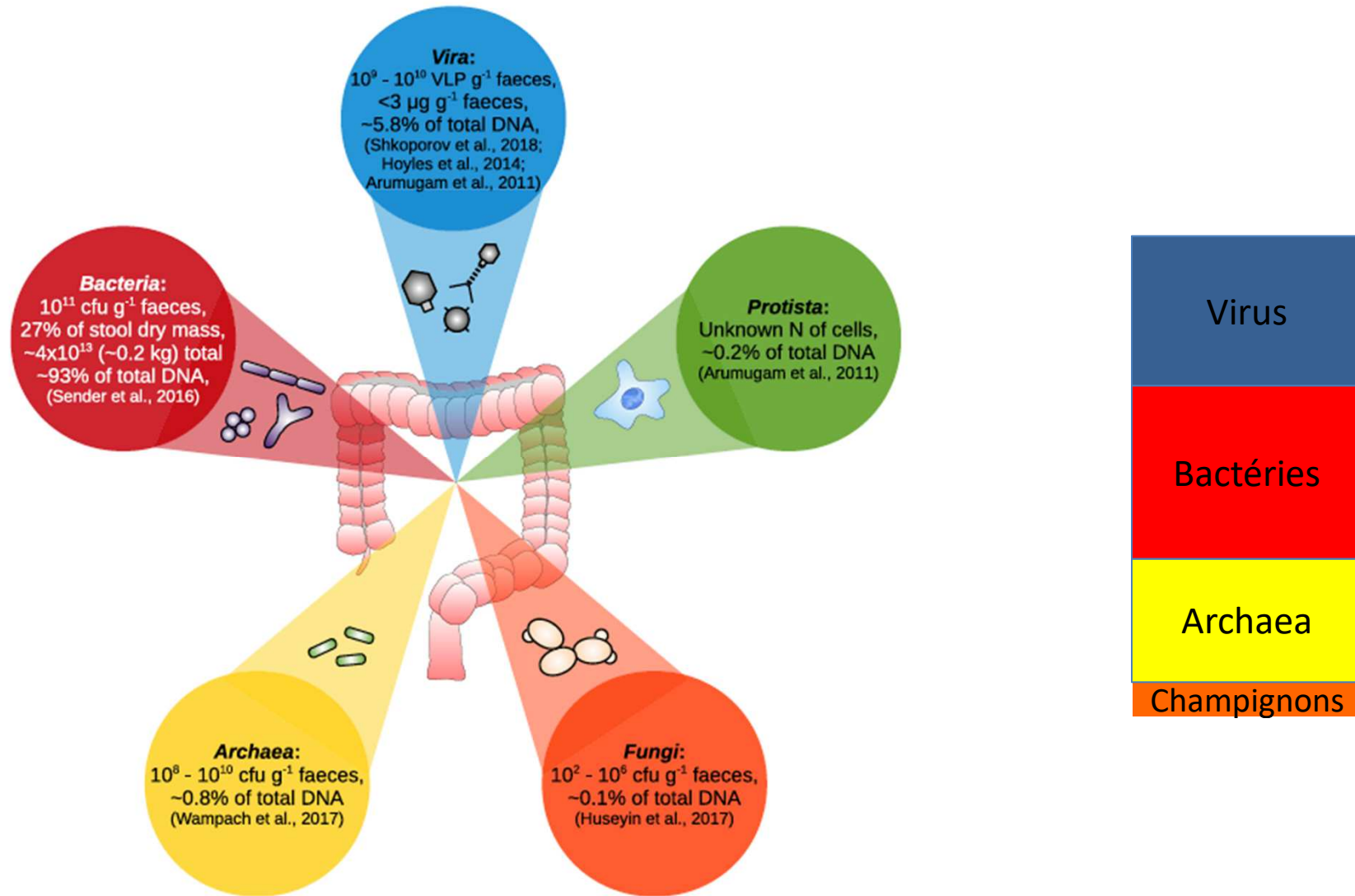
- Présentation:
 - Du microbiote intestinal
 - Des phages
- Phageome intestinal
- Microbiote intestinal et thérapeutique
- Etude clinique

microbiote intestinale

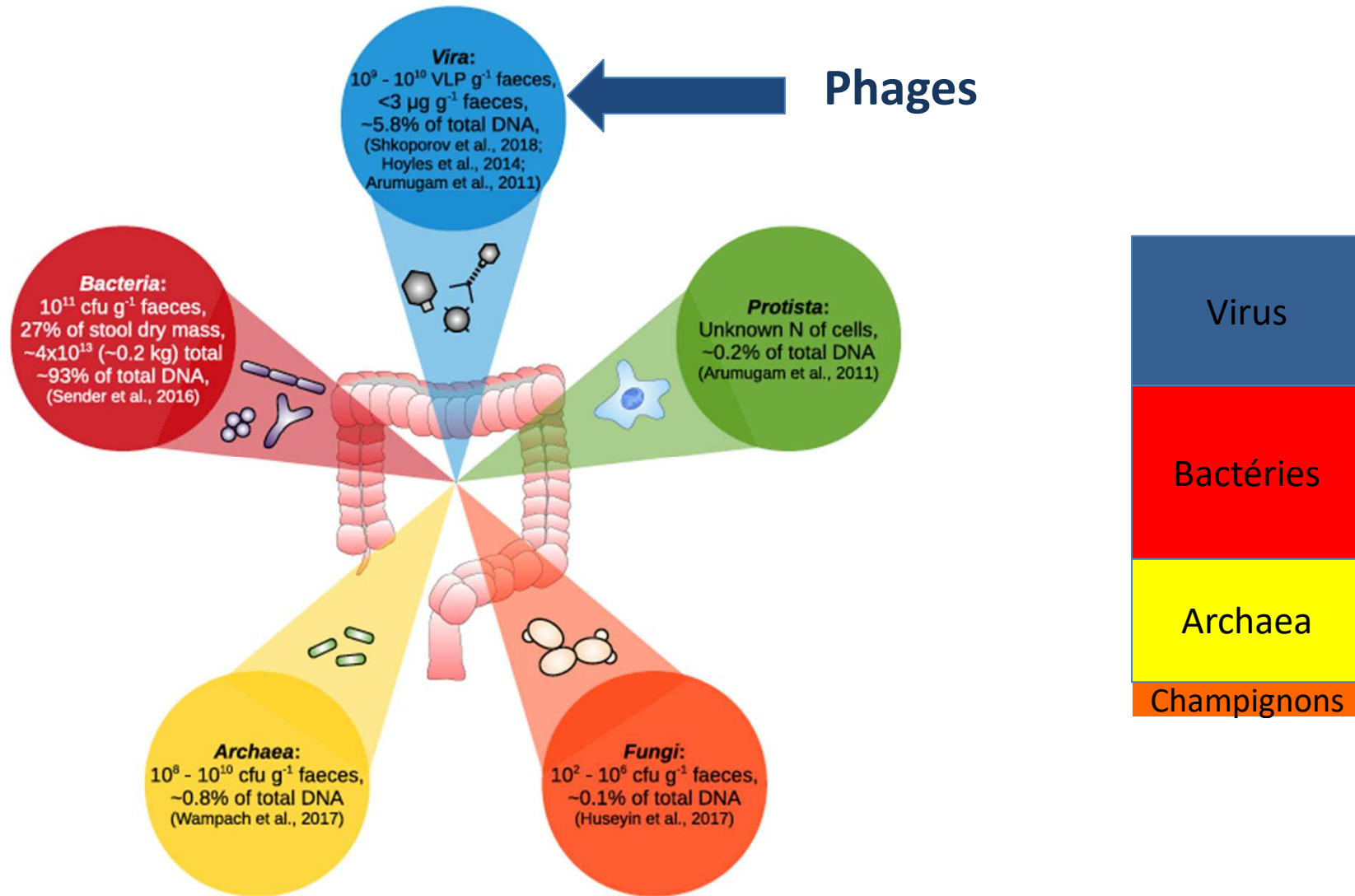


Nature Reviews | Gastroenterology & Hepatology

Microbiote intestinale composition



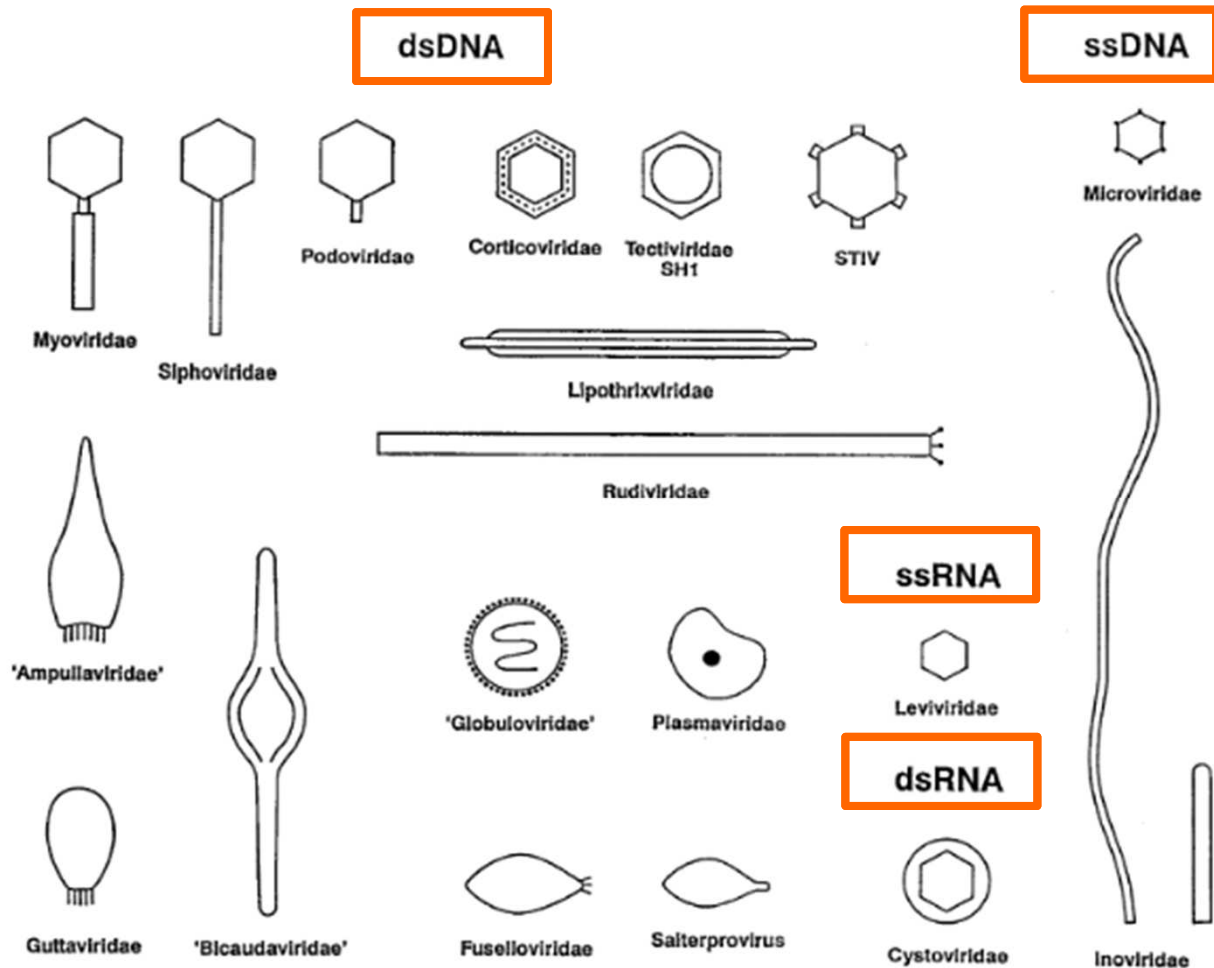
Microbiote intestinale composition



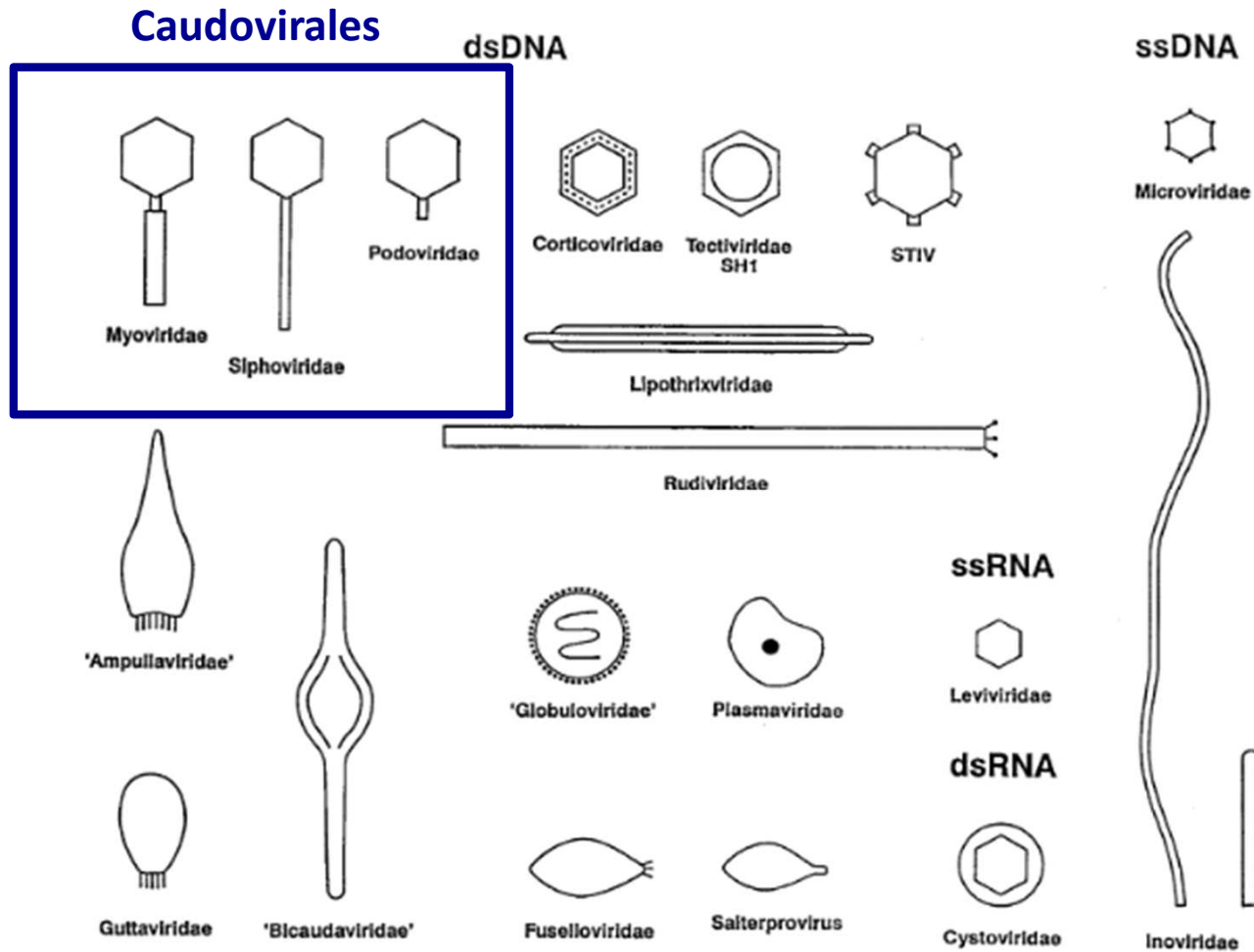
Les phages ?

- La plus abondante entité biologique sur terre sur la planète (10^{31})
- Phages spécifiques d'une espèce/souche
- Très efficaces pour tuer l'hôte
- Jouent un rôle important dans la dynamique des populations bactériennes
- Renaissance de l'intérêt des phages dans des environnements riches en bactéries
 - ✓ océans
 - ✓ sol
 - ✓ sédiments
 - ✓ chez l'homme: dans l'intestin (10^9 - 10^{10} bactéries/g de selles)

Les phages : classification

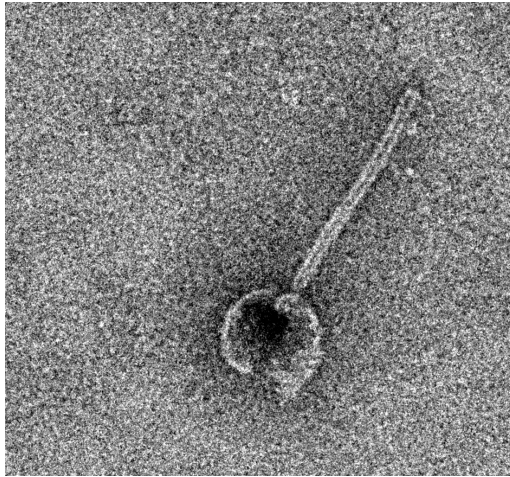


Les phages : classification

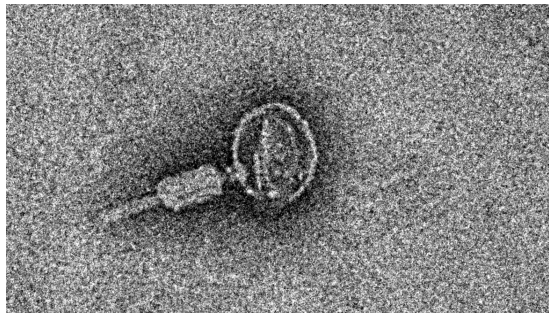


Les phages : exemple

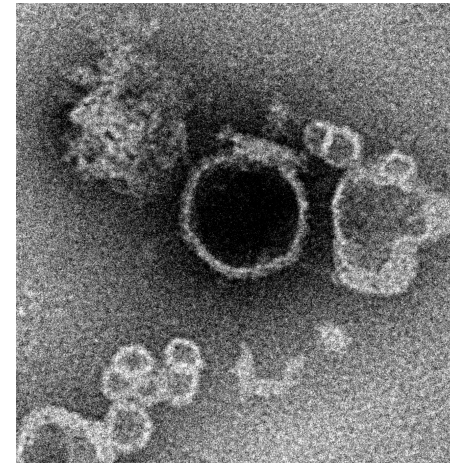
Caudovirales



Syphoviridae

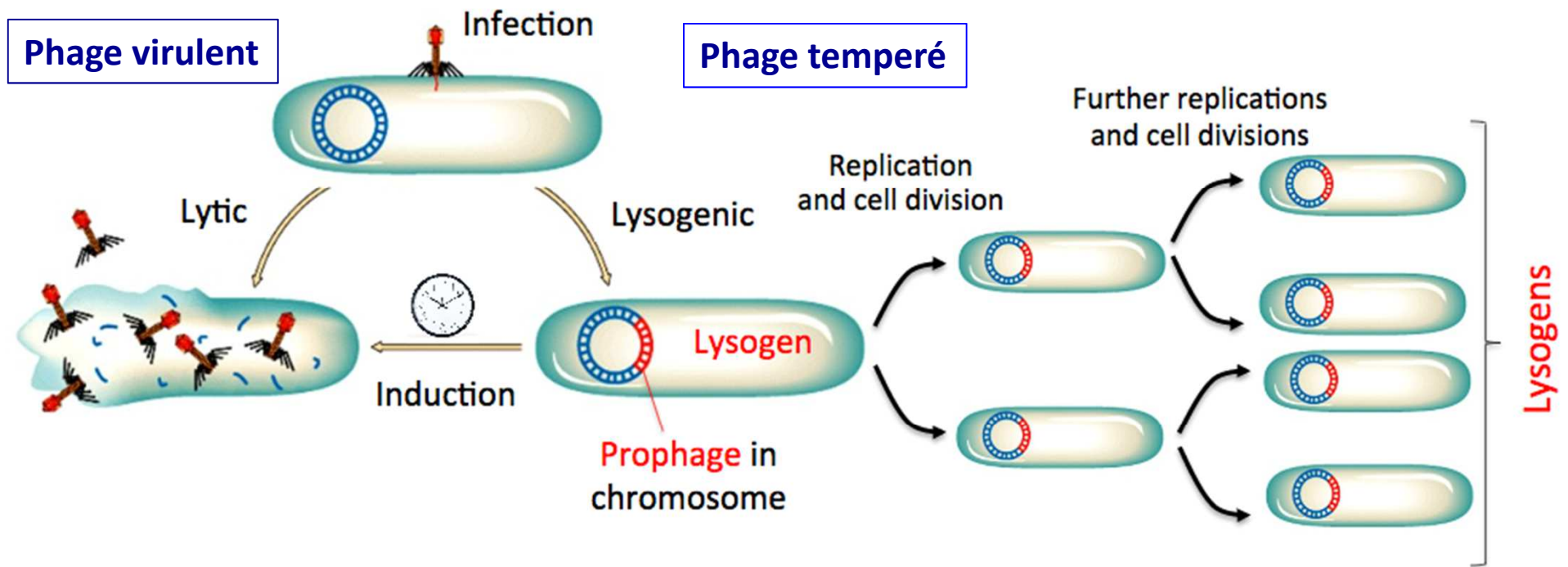


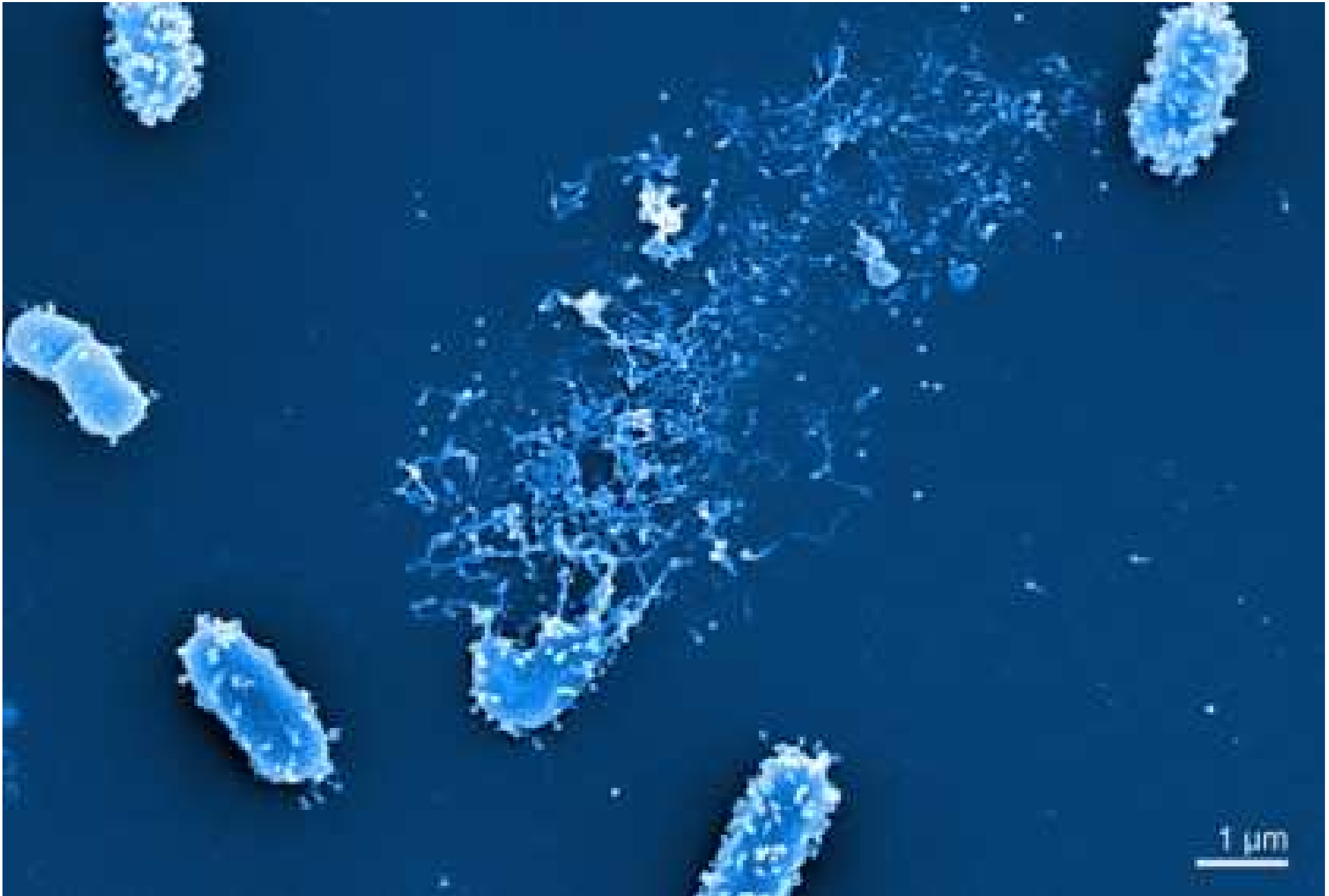
Myoviridae



Podoviridae

Les phages : cycle de réplication





Analyse du microbiote intestinal

méthodologie

- **PCR ciblée:** ADN codant pour **ARN 16s bactérien**
→ analyse uniquement le monde bactérien.
- **Métagénomique shotgun:** extraction et séquençage de l'ADN présent dans l'échantillon
→ 95 % d'ADN bactérien
- Métagénomique shotgun vs métagenome de phage (phageome)
→ 4-17% en commun (fonction de la profondeur de séquençage)
→ **Intérêt de l'étude spécifique du phageome**

Analyse du phageome intestinal

méthodologie

- Concentration des phages

- Gold Standard: **ultracentrifugation au chlorure de césium**
- Mauvaise reproductibilité et diversité des phages moindres

- Utilisation d'une polymerase

- Perte de diversité: amplification préférentielle de l'ADN simple brin
- Perte de reproductibilité

- Analyse bio-informatique

- Bases de données publiques pauvres en phage et encore plus en phage du microbiote intestinal

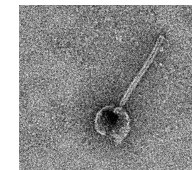
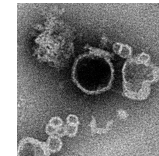
Phageome intestinal

Composition

- Observation **microscopique**

Prédominance des phages à ADN double brin de la famille des Caudovirales

→ Myoviridae, Siphoviridae, Podoviridae

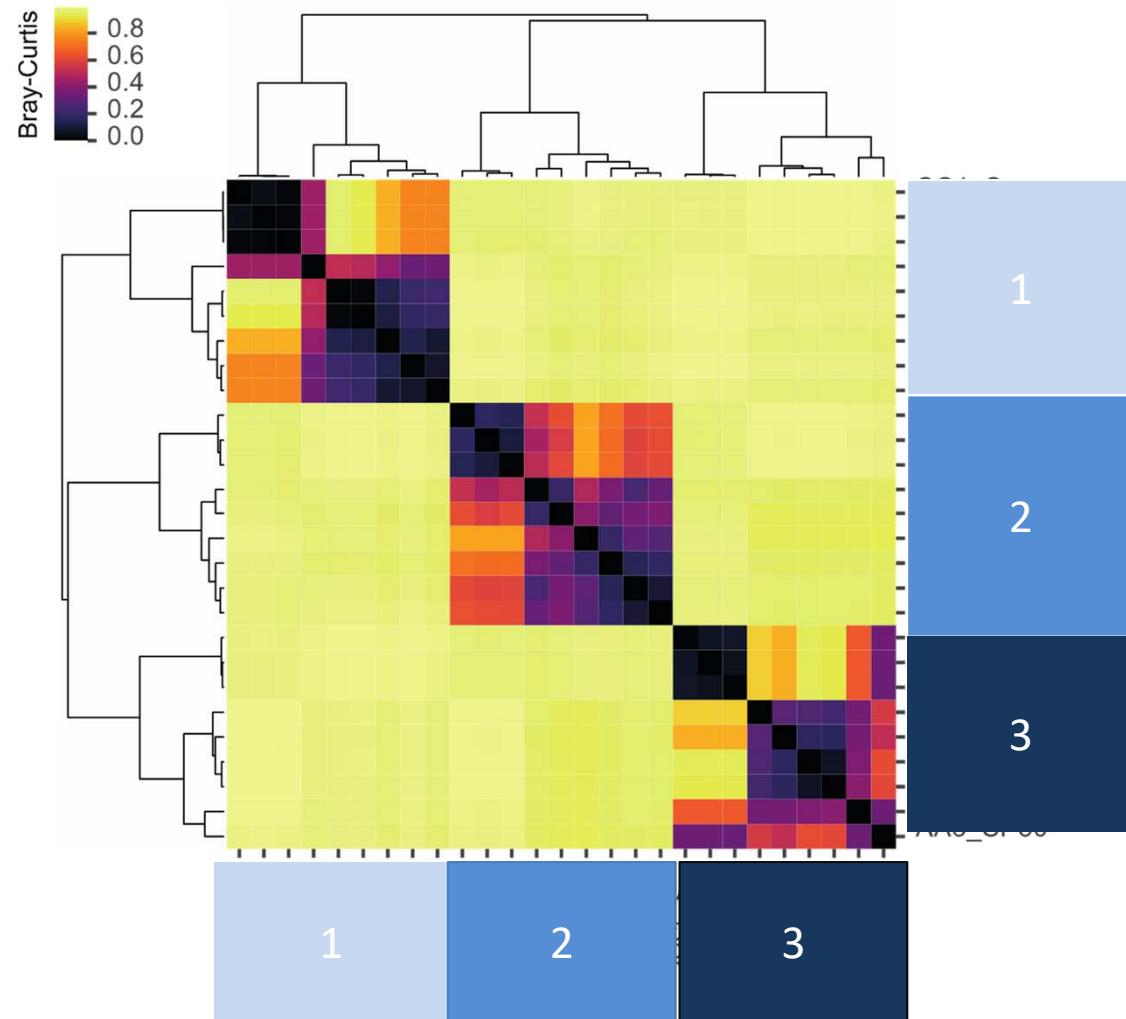


- Prédominance des **phages tempérés**

Phageome intestinal

Composition

- Phageome individu spécifique
Grande variabilité inter-individuelle

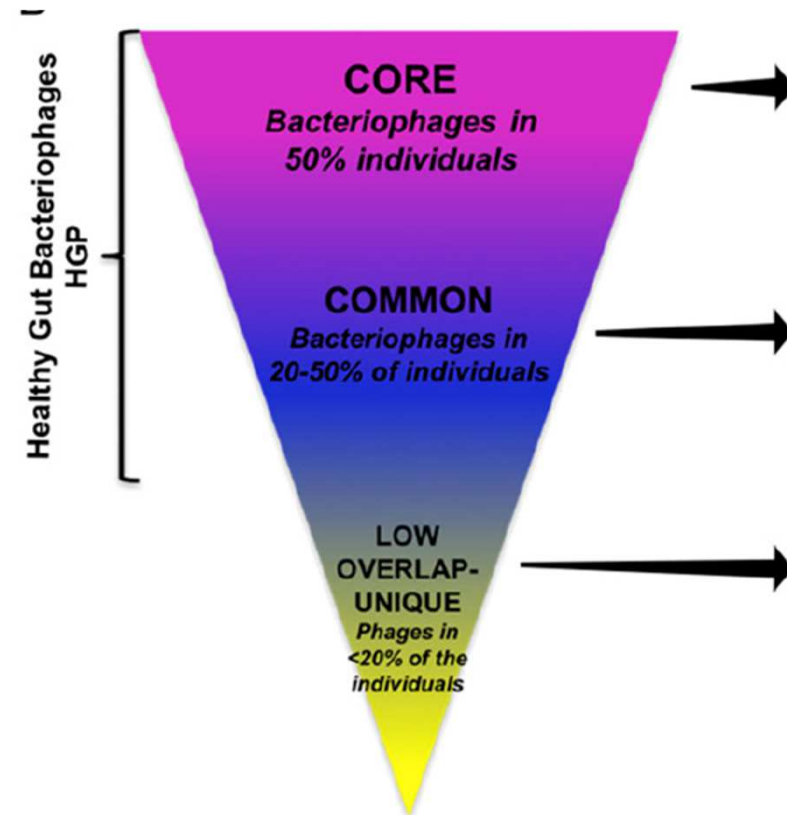


Minot *et al.*, genome research (2011)
d'Humieres *et al.*, Scientific Reports (2019)
Reyes *et al.*, Nature (2010)

Phageome intestinal

Composition

- Phageome commun
 - « **Healthy gut phageome** »
 - « Core »: 9 groupes de phages présents chez 50% des individus sains
 - « Commun »: 13 groupes de phages présents chez 20-50% des individus sains
 - **CrAssphage** (90% des métagénomés viraux du microbiote intestinal).
 - 97 Kbp,
 - hôte probable *Bacteroides intestinalis*



Phageome intestinal

Composition



- A travers les âges
 - Analyse du méconium par microscopie à fluorescence n'a montré aucune particule virale
 - Colonisation très rapide
 - Renouvellement rapide au cours de la 2ème semaine de vie
 - Vrai jumeaux: phageome plus divers que le bactériome
 - Adulte: phageome stable
 - Influence du régime alimentaire

Breitbart *et al.*, Research in Microbiology (2008)
Minot *et al.*, Proceedings of the national Academy of sciences(2013)
Lim *et al.*, Nature Medicine (2015)

Phageome intestinal

Marqueur de santé

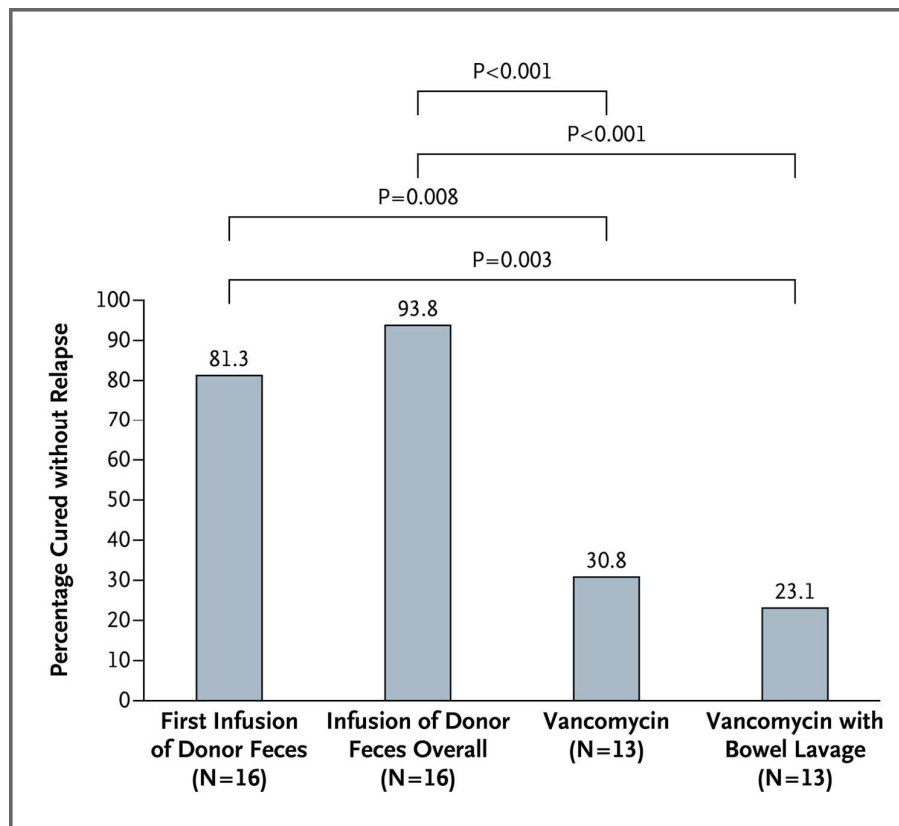
- Changements dans la composition du phageome intestinal
 - **MICI** (Maladie de Crohn et RCH)
 - Enrichissement des Caudovirales
 - **Diabète de type II**
 - Augmentation du nombre de phages (richesse)
 - Mise en évidence de 7 phages spécifiques

Phages, marqueur de santé?

Acteur sur la modulation du microbiote intestinal?

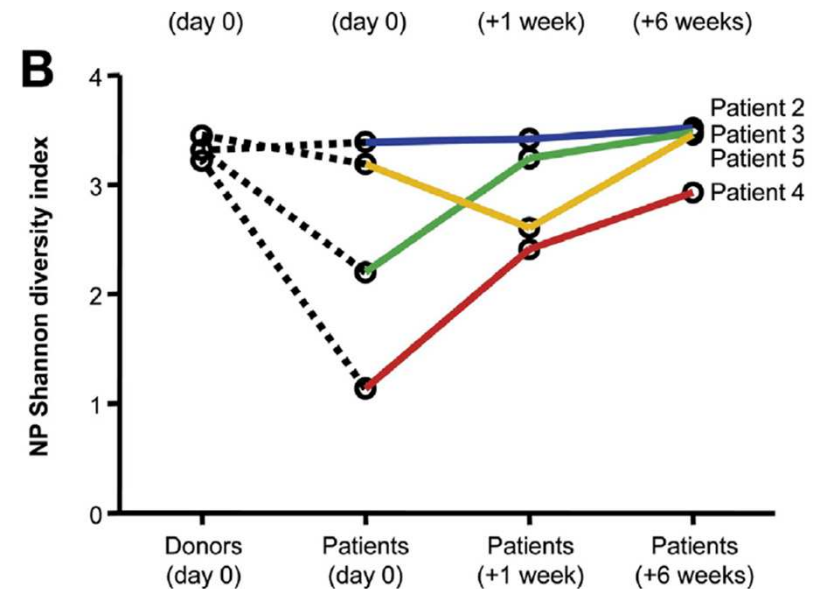
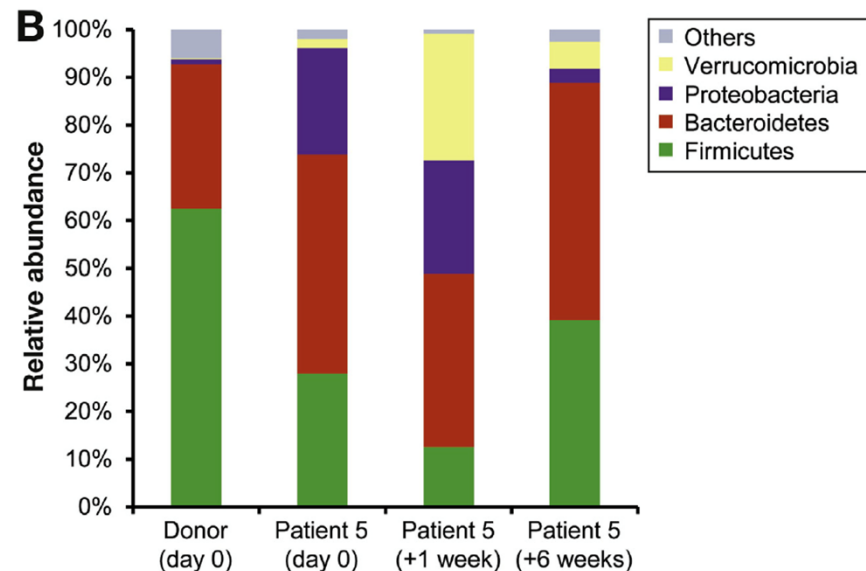
Microbiote intestinal et thérapeutique

- Succès de la transplantation fécale chez les patients souffrant d'une infection à *Clostridium difficile*



Phageome intestinal et thérapeutique?

- Transplantation de **filtrat fécal** chez les patients souffrant d'une infection à *Clostridium difficile*
 - 5 Patients
 - contrôle: pas de bactérie en culture (aérobie et anaérobie)
 - phages, métabolites, sels biliaries, enzyme humaine (élastase, amylase, phosphatase)
 - Succès chez les 5 patients de la greffe de filtrat fécal



Phageome intestinal et thérapeutique?

- Rôle des phages dans l'équilibre du microbiote intestinal?
- Composition du phageome fécale peut-il être un facteur pronostic?
- Composition du phageome doit-elle intervenir dans la sélection des donneurs?
- Absence de transferts bactériens:
 - Moins de risque de bactériémie avec une bactérie du donneur post transplantation

Analyse du microbiote intestinal

ANR : PrediRes / CEREMI

PREdicting the emergence of bacterial RESistance in the human gut
microbiota during antibiotic therapy
(Pr France Mentré)

Comparaison du cefotaxime et de la ceftriaxone (CIIG, même spectre mais mode d'élimination différents) sur leur impact sur le microbiote intestinal

Collection de selles

Antibiotique

J-14

J-7

J-1

J1

J2

J3

J4

J7

J10

J15

J30

J90

J180

11 volontaires sains
Ceftriaxone (IV)
1g/j en 1 fois
Elimination digestive (40%)

11 volontaires sains
Cefotaxime (IV)
3g/j en 3 fois
Elimination digestive (10%)

Analyse du microbiote intestinal

Granularités différentes

Ciblées

Analyse du 16S

Analyse des sels biliaires

Analyse de la
métapopulation de *E. coli*



Les « omes »

Analyse du métagénome globale

Analyse du phageome

Analyse du métabolome

Analyse du mycobiome

→ Intégration de l'ensemble des résultats

Analyse du microbiote intestinal

Granularités différentes

Ciblées

Analyse du 16S

Analyse des sels biliaires

Analyse de la
métapopulation de *E.*
coli



Les « omes »

Analyse du métagénome globale

Analyse du phageome

Analyse du métabolome

Analyse du mycobiome

→ Intégration de l'ensemble des résultats

Phageome intestinal

Gènes de résistance aux antibiotiques

→ Etude princeps

Phageome intestinal de la souris: le traitement antibiotique tend à **augmenter les gènes de résistance** retrouvés chez les phages du microbiote intestinal.

→ Controverse

Réanalyse des données de phageome de Modi *et al.* avec une **méthode bioinformatique plus stringente**

→ **Absence de gènes de résistance** aux antibiotiques retrouvés

Au total...

- Les phages sont aussi **nombreux** que les bactéries dans le microbiote intestinal
- La **méthodologie** pour l'étude du phageome intestinal est encore un challenge
- Le phageome intestinal est **individu spécifique**
- Le phageome intestinal comme **marqueur de santé** ou comme outils thérapeutique?
- Les phages du microbiote ne semblent pas participer à la **diffusion de gènes de résistance aux antibiotiques**

Remerciements

- **Comité organisateur des Journées Claude Bernard**
- Laboratoire d'**Eduardo Rocha**, Institut Pasteur, équipe GEM (génomique évolutive des microbes)
- Laboratoire d'**Erick Denamur**, IAME, Faculté de médecine Xavier Bichat.
- **PREDIRES** project
Scientific board:
France Mentré¹, Dusko Ehrlich², Eduardo Rocha³, Erick Denamur¹, Xavier Duval¹, Charles Burdet¹.

1: IAME, 2: INRA, 3: Institut Pasteur