



**Stratégies pour la  
recherche de nouveaux  
virus**

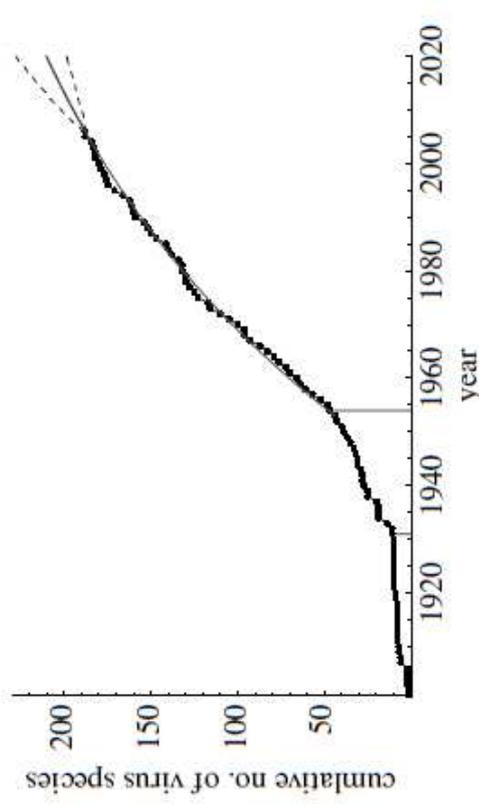
Exemple des nouveaux HPyVs  
(polyomavirus humains)

Table 1. (Continued.)

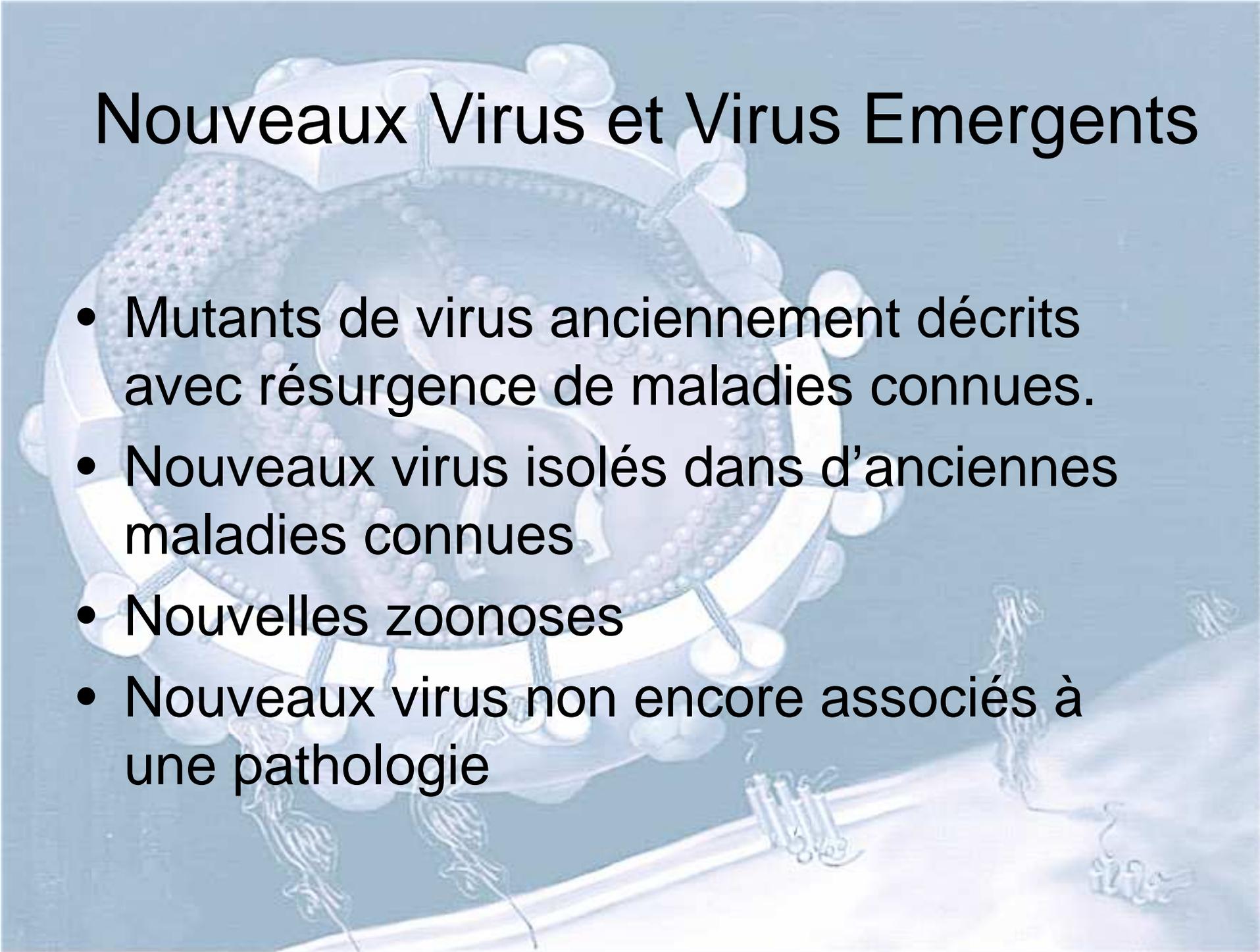
year	species	family
1959	Powassan virus	flavi
1960	Human parainfluenza virus 4	paramyxo
1960	Human rhinovirus B	picorna
1961	Caraparu virus	bunya
1961	Caru virus	bunya
1961	O'nyong-nyong virus	toga
1961	Onpouche virus	bunya
1962	Rio Bravo virus	flavi
1962	Sindbis virus	toga
1963	Equine rhinitis virus A	picorna
1963	Great Island virus	reo
1963	Pseudocowpox virus	pox
1963	Yaba monkey tumour virus	pox
1964	Human herpesvirus 4	herpes
1964	Madhupo virus	arena
1964	Zika virus	flavi
1965	Chagres virus	bunya
1965	Foot and mouth disease virus	picorna
1965	Tanapox virus	pox
1965	Wyecomyia virus	bunya
1966	Changuinola virus	reo
1966	Human coronavirus 229E	corona
1966	Quarantfil virus	unassigned
1966	Saimirine herpesvirus 1	herpes
1967	Chandipura virus	rhabdo
1967	Crimean-Congo haemorrhagic fever virus	bunya
1967	Human coronavirus OC43	corona
1967	Human enterovirus D	picorna
1967	Piry virus	rhabdo
1967	Tacatama virus	bunya
1968	Human herpesvirus 2	herpes
1968	Marburg virus	filo
1968	Taiguine virus	bunya
1970	Everglades virus	toga
1970	Hepatitis B virus	hepadna
1970	Lassa virus	arena
1970	Punta Toro virus	bunya
1971	Aroa virus	flavi
1971	BK virus	polyoma
1971	Duvenhage virus	rhabdo
1971	JC virus	polyoma
1971	Vaccinia virus	pox
1972	Bovine papular stomatitis virus	pox
1972	Mokola virus	rhabdo
1972	Monkeypox virus	pox
1972	Norwalk virus	calici
1972	Ross River virus	toga
1973	Bangui virus	bunya
1973	Dugbe virus	bunya
1973	Hepatitis A virus	picorna
1973	Kotonkan virus	rhabdo
1973	Rotavirus A	reo
1973	Tandy virus	bunya
1974	Genah virus	toga
1975	B19 virus	parvo
1975	Bhanja virus	bunya
1975	Human astrovirus	astro
1975	Leboombo virus	reo
1975	Shuni virus	bunya
1976	Thogoto virus	orthomyxo
1976	Orungo virus	reo
1976	Wanawic virus	bunya

Table 1. (Continued.)

year	species	family
1977	Hepatitis delta virus	unassigned
1977	Sudan Ebola virus	filo
1977	Zaire Ebola virus	filo
1978	Hantaan virus	bunya
1978	Ishik-Kui virus	bunya
1980	Human T-lymphotropic virus 1	retro
1980	Puumala virus	bunya
1982	Human T-lymphotropic virus 2	retro
1982	Seoul virus	bunya
1983	Candiru virus	bunya
1983	Hepatitis E virus	unassigned
1983	Human adenovirus F	adeno
1983	Human immunodeficiency virus 1	retro
1984	Human norovirus	corona
1984	Rotavirus B	reo
1985	Borna disease virus	borna
1986	European bat lyssavirus 2	rhabdo
1986	Human herpesvirus 6	herpes
1986	Human immunodeficiency virus 2	retro
1986	Kasokero virus	bunya
1986	Kokobera virus	flavi
1986	Rotavirus C	reo
1987	Dhori virus	orthomyxo
1987	Sealpox virus	pox
1987	Suid herpesvirus 1	herpes
1988	Barmah Forest virus	toga
1988	Picbirnavirus	birna
1989	European bat lyssavirus 1	rhabdo
1989	Hepatitis C virus	flavi
1990	Banna virus	reo
1990	Gan Gan virus	bunya
1990	Reston Ebola virus	filo
1990	Semliki Forest virus	toga
1990	Trubanaman virus	bunya
1991	Guamarito virus	arena
1992	Dobrava-Belgrade virus	bunya
1993	Sin Nombre virus	bunya
1994	Hendra virus	paramyxo
1994	Human herpesvirus 7	herpes
1994	Human herpesvirus 8	herpes
1994	Sabia virus	arena
1995	Bayou virus	bunya
1995	Black Creek Canal virus	bunya
1995	Cote d'Ivoire Ebola virus	filo
1995	Hepatitis G virus	flavi
1995	New York virus	bunya
1996	Andes virus	bunya
1996	Australian bat lyssavirus	rhabdo
1996	Juquitiba virus	bunya
1996	Usutu virus	flavi
1997	Laguna Negra virus	bunya
1998	Menangle virus	paramyxo
1999	Nipah virus	paramyxo
1999	Torque teno virus	circo
2000	Whitewater Arroyo virus	arena
2001	Baboon cytomegalovirus	herpes
2001	Human metapneumovirus	paramyxo
2003	SARS coronavirus	corona
2004	Human coronavirus NL63	corona
2005	Human bocavirus	parvo
2005	Human coronavirus HKU1	corona
2005	Human T-lymphotropic virus 3	retro
2005	Human T-lymphotropic virus 4	retro



# Nouveaux Virus et Virus Emergents



- Mutants de virus anciennement décrits avec résurgence de maladies connues.
- Nouveaux virus isolés dans d'anciennes maladies connues
- Nouvelles zoonoses
- Nouveaux virus non encore associés à une pathologie

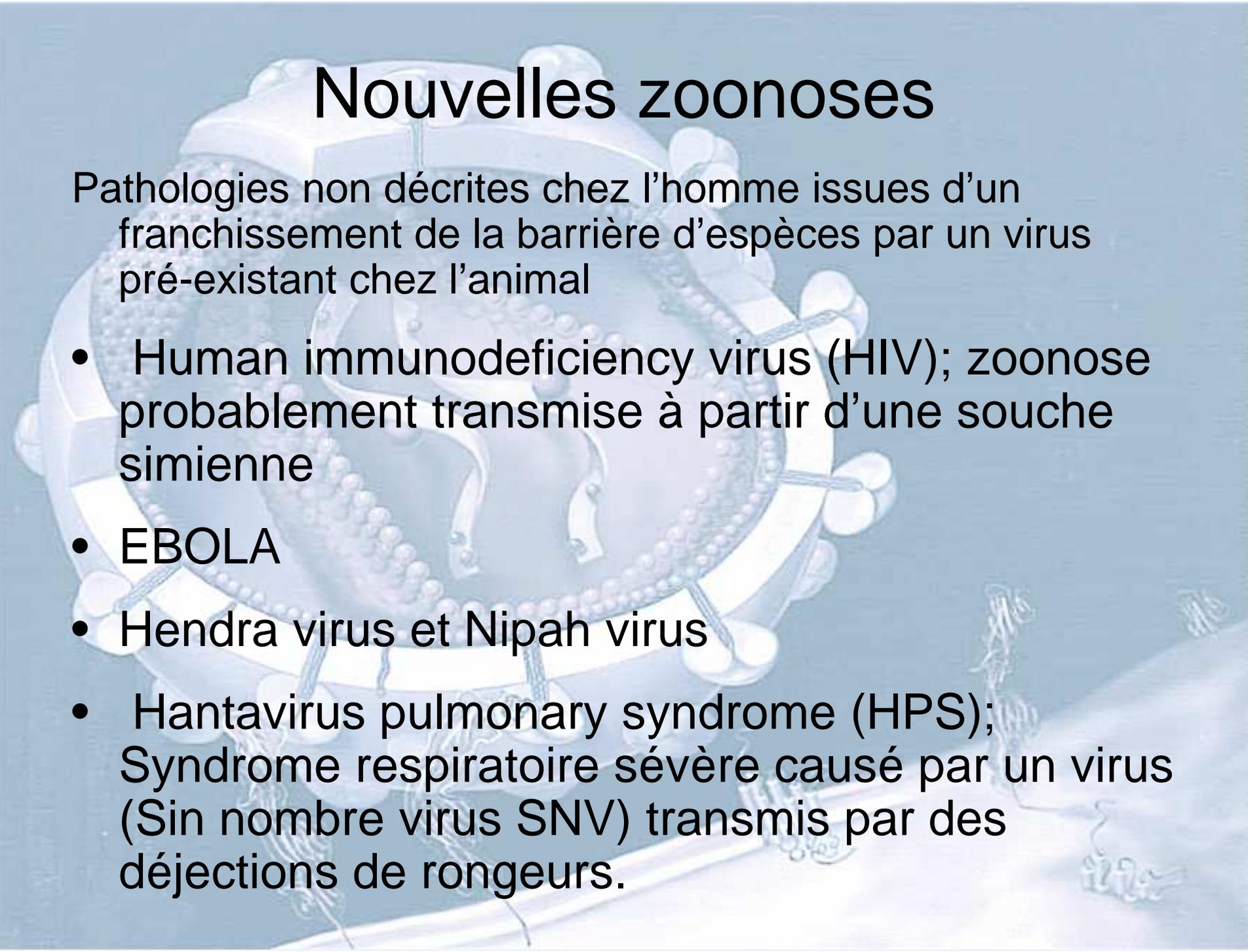
# Mutants ou variants de Virus décrits

- Récurrence de nouveaux variants antigéniques (Ex des virus influenza)
- Nouveaux mutants provoquant des épidémies sur des terrains naïfs d'un point de vue immunitaire
- antigenic *drift* (glissement) Accumulation de mutations ponctuelles
- antigenic *shift* (cassure) Re-assortiment profond par recombinaison
- Arbovirose (West Nile, Chikungunya, Dengue....)
  - Variations sur Virus, vecteurs , mais également écologie.....

# Nx virus isolés dans d'anciennes maladies

- Hepatitis C (HCV): Hépatites non-A, non-B
- Human papillomavirus 16 (HPV16): Carcinome du col
- Human herpesvirus type 8 (HHV8): Sarcome de Kaposi
- Human T-cell leukaemia virus (HTLV-I): Lymphome T
- Nouveaux virus respiratoires
  - SARS-co
  - HKU1 et NL63 coronavirus (HCoV-HKU1 et HCoV-NL63)
  - Metapneumovirus humain (HMPV)
  - Bocavirus humain (HBoV)
  - Nx polyomavirus humains (KIPyV, WUPyV)
- Nouveaux Virus et autres cancers ???
  - Polyomavirus de Merkel et Carcinome de Merkel ????
  - Retrovirus et cancer prostate ???
  - .....???

# Nouvelles zoonoses



Pathologies non décrites chez l'homme issues d'un franchissement de la barrière d'espèces par un virus pré-existant chez l'animal

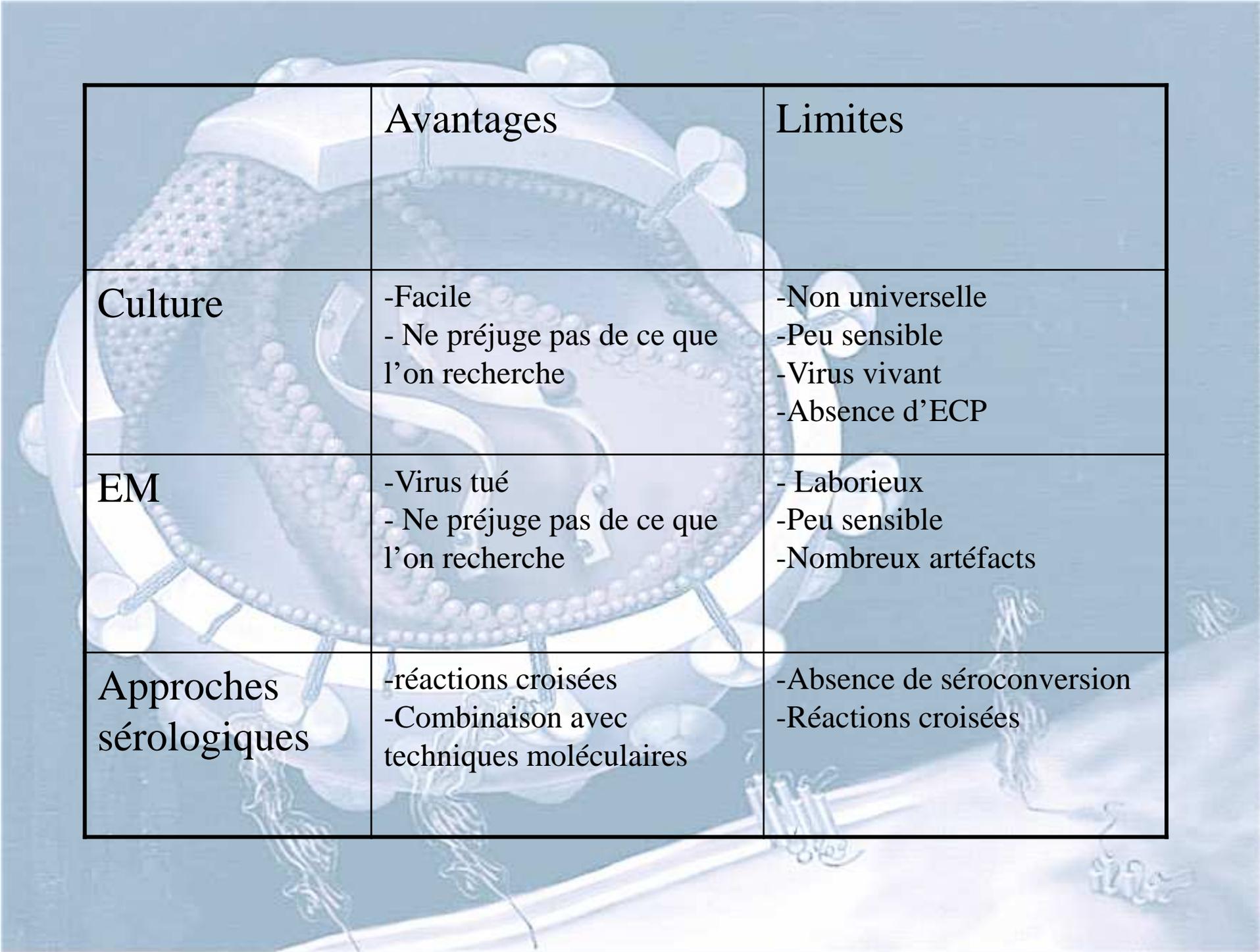
- Human immunodeficiency virus (HIV); zoonose probablement transmise à partir d'une souche simienne
- EBOLA
- Hendra virus et Nipah virus
- Hantavirus pulmonary syndrome (HPS); Syndrome respiratoire sévère causé par un virus (Sin nombre virus SNV) transmis par des déjections de rongeurs.

# Nouveaux virus non encore associés à une pathologie

- Hepatitis G virus (HGV) / GBV-C; Association à des hépatites non confirmée
- TT virus (TTV); Virus à ADN désormais considéré comme ubiquitaire et non pathogène
- Human retrovirus 5 (HRV-5); Association aux RA non confirmée
- Nouveaux parvovirus humains (V9, A6, PAV4 et 5)
- Nouveaux polyomavirus humains (HPyVs)
- XMRV (Xenotropic Murine leukemia Related Virus)
  - K prostate, syndrome fatigue chronique ??????????

# Les stratégies d'identification de nouveaux virus

- Evidence épidémiologique: recoupement de cas dans le temps et l'espace, mécanisme de transmission (ex fièvre jaune)
- Isolement viral sur modèles animaux ou cellulaires
- Microscopie électronique
- Détection activité enzymatique (RT)
- Approches sérologiques
- Approches moléculaires



	Avantages	Limites
Culture	<ul style="list-style-type: none"><li>-Facile</li><li>- Ne préjuge pas de ce que l'on recherche</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Non universelle</li><li>-Peu sensible</li><li>-Virus vivant</li><li>-Absence d'ECP</li></ul>
EM	<ul style="list-style-type: none"><li>-Virus tué</li><li>- Ne préjuge pas de ce que l'on recherche</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Laborieux</li><li>-Peu sensible</li><li>-Nombreux artéfacts</li></ul>
Approches sérologiques	<ul style="list-style-type: none"><li>-réactions croisées</li><li>-Combinaison avec techniques moléculaires</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Absence de séroconversion</li><li>-Réactions croisées</li></ul>

# Les méthodes moléculaires

- Hybridation à faible stringence
- Immunoscreening de banques de cDNA
- Hybridation soustractive et soustraction « in silico »
- Méthodes basée sur la PCR
  - RDA
  - DD-RT-PCR
  - DOP- PCR dégénérée et random priming
  - VIDISCA (Virus Discovery cDNA AFLP)
  - DNase-SISPA
  - RCA (Rolling Circle Amplification)

## i- Hybridation à faible stringence

- Human papilloma virus 16 (HPV 16) fut découvert par une approche d'hybridation à faible stringence en utilisant une sonde radiomarquée de HPV11 sur un Southern blot d'ADN de carcinome utérin.
- HPV 16 est désormais reconnu comme un agent étiologique majeur dans les cancer du col chez la femme.



FIG. 1. Blot hybridization at low stringency of  $^{32}\text{P}$ -labeled HPV 11 DNA with *Pst* I-cleaved cellular DNA from a cervical carcinoma (WV 2916, lane a) and a laryngeal papilloma containing HPV 11 DNA (lane b).

*Durst et al., PNAS USA 80: 3812-5 (1983)*

## ii- Screening de banque de cDNA

- Exemple de la découverte de HCV
- Extraction RNA de patients ou d'animaux avec hépatite nonA-nonB
- Synthèse cDNA avec « random primers »
- Clonage dans une banque d'expression  $\lambda$ GT11
- Hybridation des clones avec sérums de malades
- Identification également de HEV, et GBV-C

# cDNA screening (HCV, HEV, GBV-C)

RNA

+ oligo dT primers

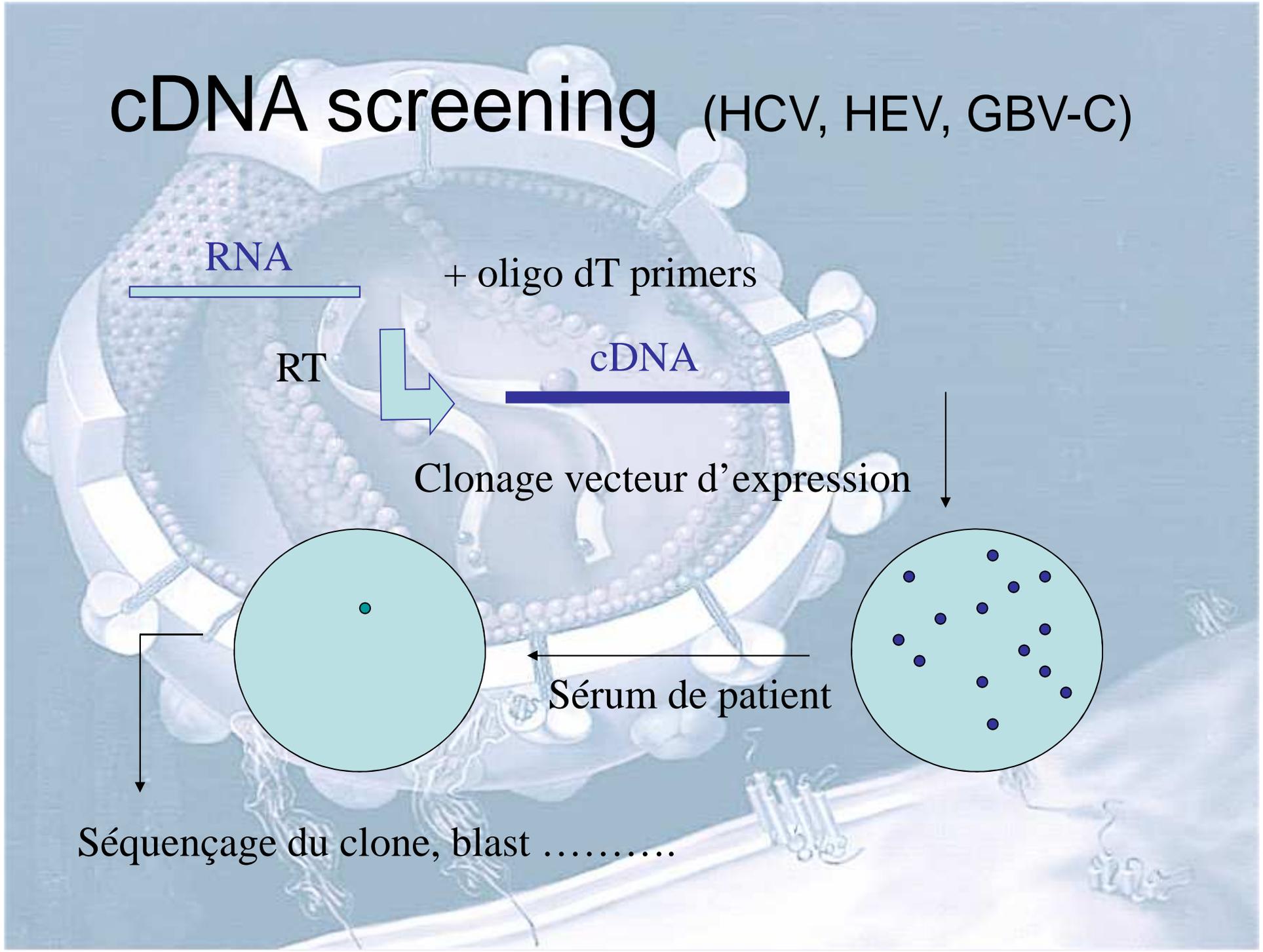
RT

cDNA

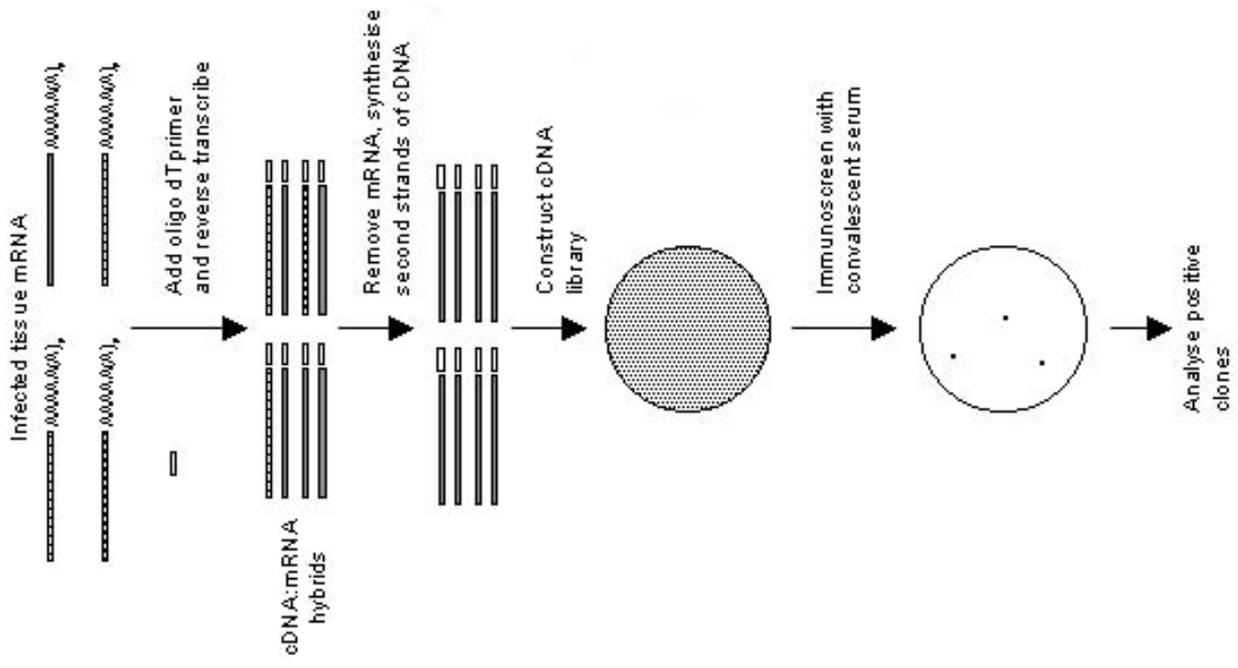
Clonage vecteur d'expression

Sérum de patient

Séquençage du clone, blast .....



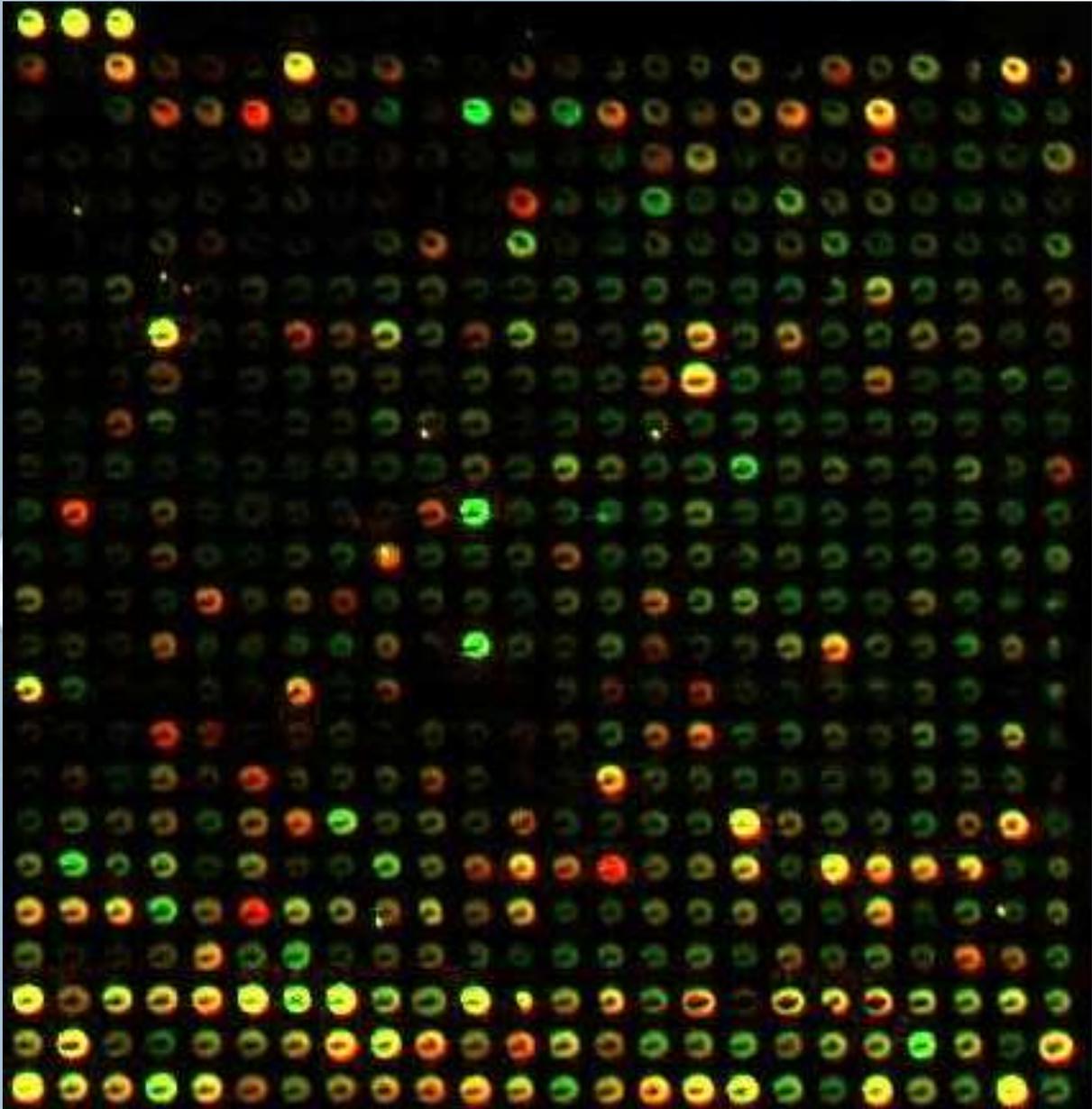
## cDNA Immunoscreening



### iii- DNA chips

- Amplification aléatoire
- Hybridation d'une banque d'oligonucléotides sous formes de DNA arrays
- Analyse des séquences hybridées
- Exemple d'application
  - SARS-Co
  - Typage virus respiratoires
  - Typage papillomavirus



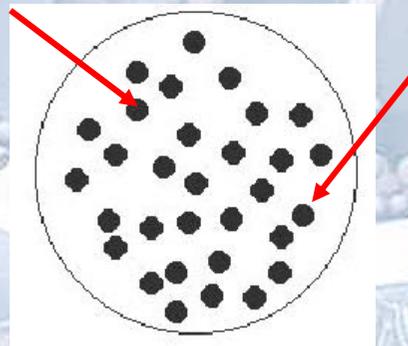


## iv- Hybridation soustractive

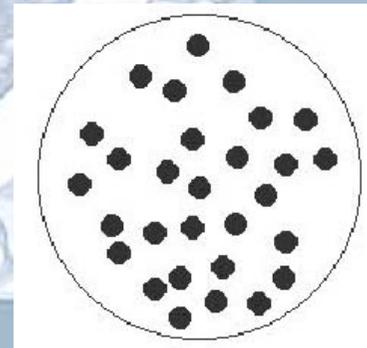
- Méthode permettant d'identifier des différences de séquences entre un tissu infecté et un tissu non infecté
- ADN tissu non infecté = « driver » est hybridé en excès avec ADN tissu infecté = « tester »
- Les hybrides (séquences communes) sont enlevés enrichissant en séquences uniques du « tester »
- Enrichissement physique ou par Amplification

## Exemple de la découverte du bornavirus en 1990

- Hybridation of driver mRNA & tester cDNA → removal of ds hybrids on hydroxyapatite column.
- Remaining subtracted cDNA used to construct a library or if radiolabelled, as an enriched probe for library screening
- This method used in identification of Borna virus in 1990
- Differential colony hybridisation also used in Borna discovery



$^{32}\text{P}$  cDNA Sonde à partir de mRNA de tissu cérébral infecté par Bornavirus (BV)

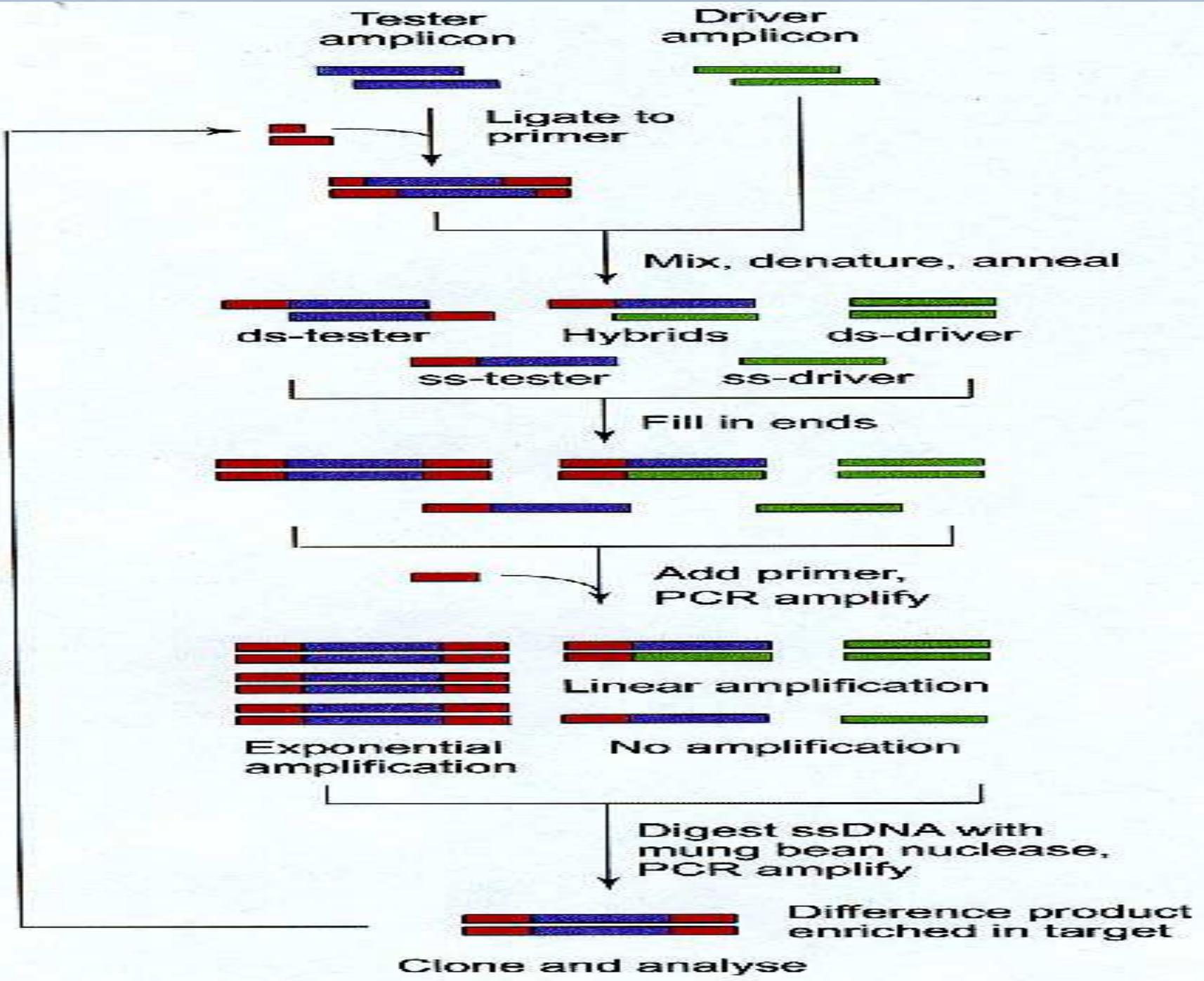


$^{32}\text{P}$  cDNA Sonde à partir de mRNA de tissu cérébral sain

# RDA (Representational Differential analysis)

- Hybridation soustractive et amplification
- Restriction des DNA « driver » et « tester »
- Ligation adaptateurs sur fragment tester
- Dénaturation, et hybridation aléatoire
- 3 combinaisons possibles DD, DT et TT
- Amplification avec adaptateurs
- Enrichissement en séquences uniques T

Digest with restriction endonuclease



## Exemple de la découverte du HHV8

- KS est une tumeur fréquente chez patients avec SIDA et également de formes endémiques méditerranéenne et Africaine
- Evidence épidémiologique d'une étiologie infectieuse
- DNA des tumeurs est le « tester »
- DNA de tissu sain du même malade est le « driver »
- Séquences uniques enrichies d'un gammaherpesvirus proche de EBV
- Nouvel HHV= HHV8 ou KSV



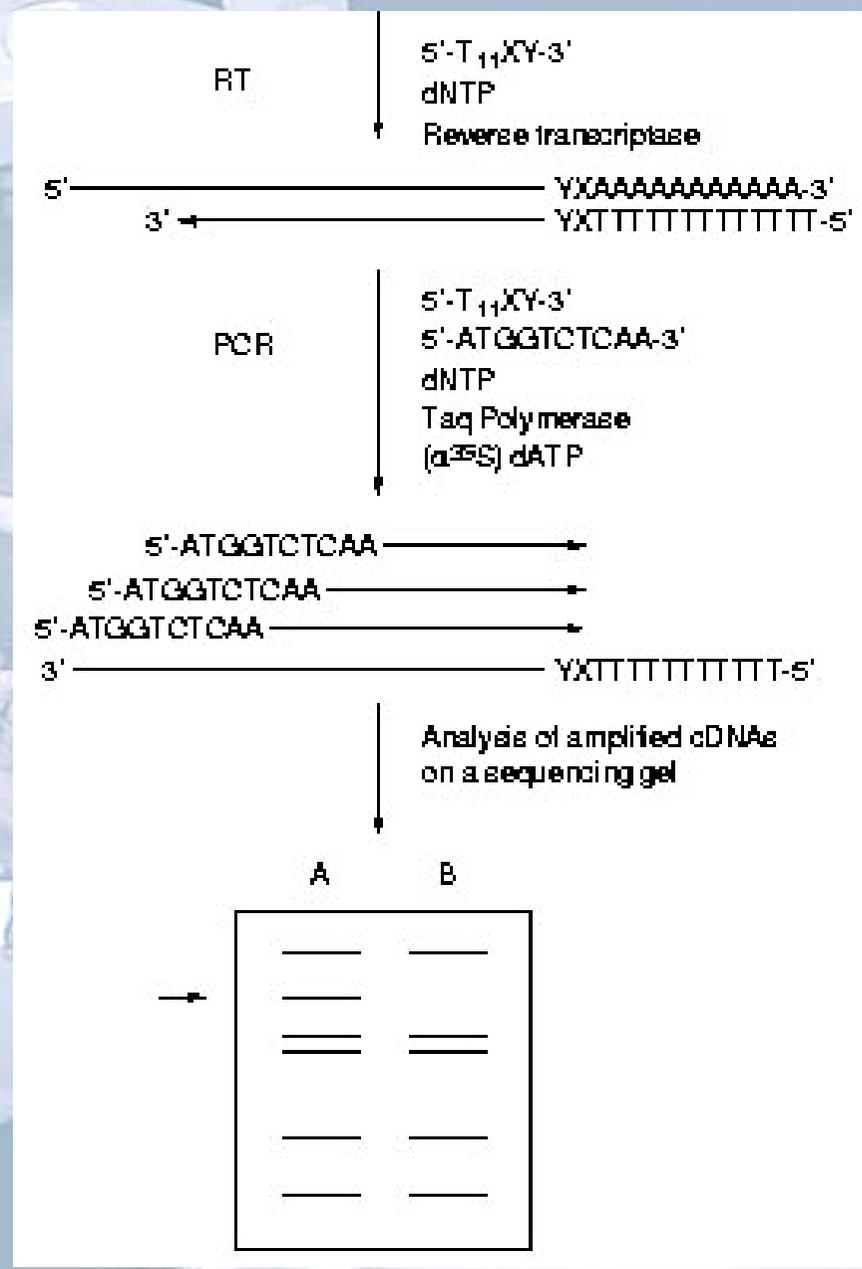
# Soustraction « in silico »

## DTS Digital Transcriptome Substraction (2008)

- Découverte du MCPyV (Polyomavirus des cellules de Merkel)
- Carcinome de Merkel
- Analyse de 400 000 séquences de cDNA
- Pyroséquençage
- Soustraction vs génome humain
- Séquences étrangères = Nx virus

## v- DD-RTPCR

- Differential display RT-PCR
- Amplification random des transcripts (mRNA) de tissu infecté
- Amplification random des transcripts (mRNA) de tissu non infecté
- Comparaison des profils en cDNA
- Clonage séquençage des séquences uniques



# vi- DOP-PCR

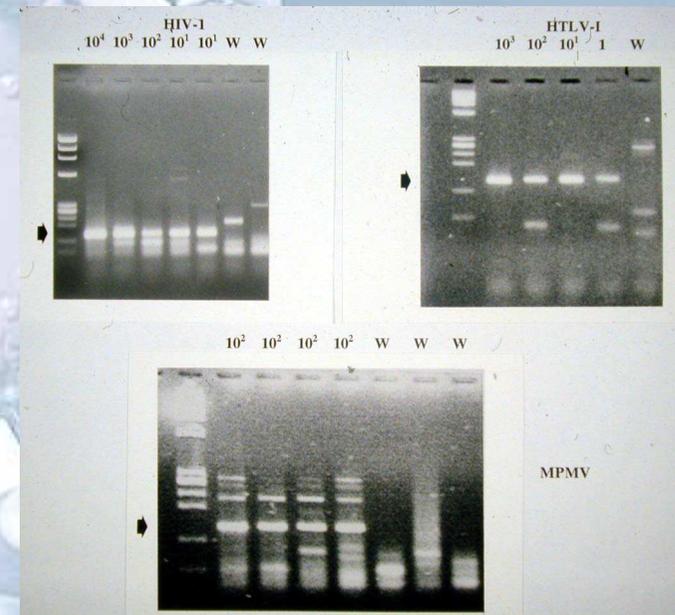
## MSRV-cp01 SEQUENCE FLANKED BY THE CONSERVED VLPQG / YMDD MOTIFS OF pol:

### ALIGNMENT WITH OTHER RETROVIRUSES AMPLIFIED BY 'PAN-RETRO' PCR

PAN-UO	5'- <sup>c g a</sup> ggaaagtgttacc-3'		
PAN-UI	5'- <sup>c g a g</sup> gtgttacc-3'		
PAN-DI			3'- <sup>c g g</sup> atgtacctactgtacac-5'
HTLV-1	tggaagtactaccacaagg	gttataaaatagttccaccctgttogaatgacgtggcccatatcctgcagccatctoggcaagctttccccaatgactattcttccag	tacatggatgacattctc
	<b>W K V L P Q G</b>	<b>F K N S R T L E E M Q L A H I L Q P I R Q A F P Q C T I L Q</b>	<b>Y M D D I L</b>
HIV-1	tacaatgtgcttccacaggg	atggaaggatcaccagcaatattccaaagtgcctgacaaaactctagagcctttataaaaacaaactccagacatagttatctatca	tacatggatgatttgtat
	<b>Y N V L P Q G</b>	<b>W K G S P A I E Q S S M T K I L E P F R K Q N P D I V I Y Q</b>	<b>Y M D D L Y</b>
MoMLV	tggaaccagactccacaggg	tttcaaaacagttccaccctgttttgatgaggcactgacacagacactagacacttccgatccagcaccagacttgatcctgtacag	tacgtggatgacttactg
	<b>W T R L P Q G</b>	<b>F K N S R T L E D E A L H R D L A D F R I Q H P D L I L L Q</b>	<b>Y V D D L L</b>
MPMV	tggaaggtttaccacaagg	tatggccacagttccacccttctgttcaaaaatactgtggccacagcaccatcaggttagacatgcttggaaacaatgtatattatacat	tacatggatgacatccta
	<b>W K V L P Q G</b>	<b>M A N S R T L C Q K Y V A T A I H K V R H A W R Q M Y I I H</b>	<b>Y M D D I L</b>
ERV9	tgatgggtcttgcaccaagg	gtttaggatagaccctctctgtttggtcaggccctagccaaagacttaggacacttctcaagtccaggc——actctgtcttcca	tatgtggatgatttactt
	<b>W N V L P Q G</b>	<b>F R D S P H L F G Q A L A K D L G H F S S P G - - T L V L Q</b>	<b>Y V D D L L</b>
MSRV-cp01		gttcaggatagaccctctctgtttggtcaggcattagccaaagacttaggacacttctcaagtccaggc——actctgtcttcca	
		<b>F R D S P H L F G Q A L A Q D L S Q F S Y L D - - T L V L Q</b>	

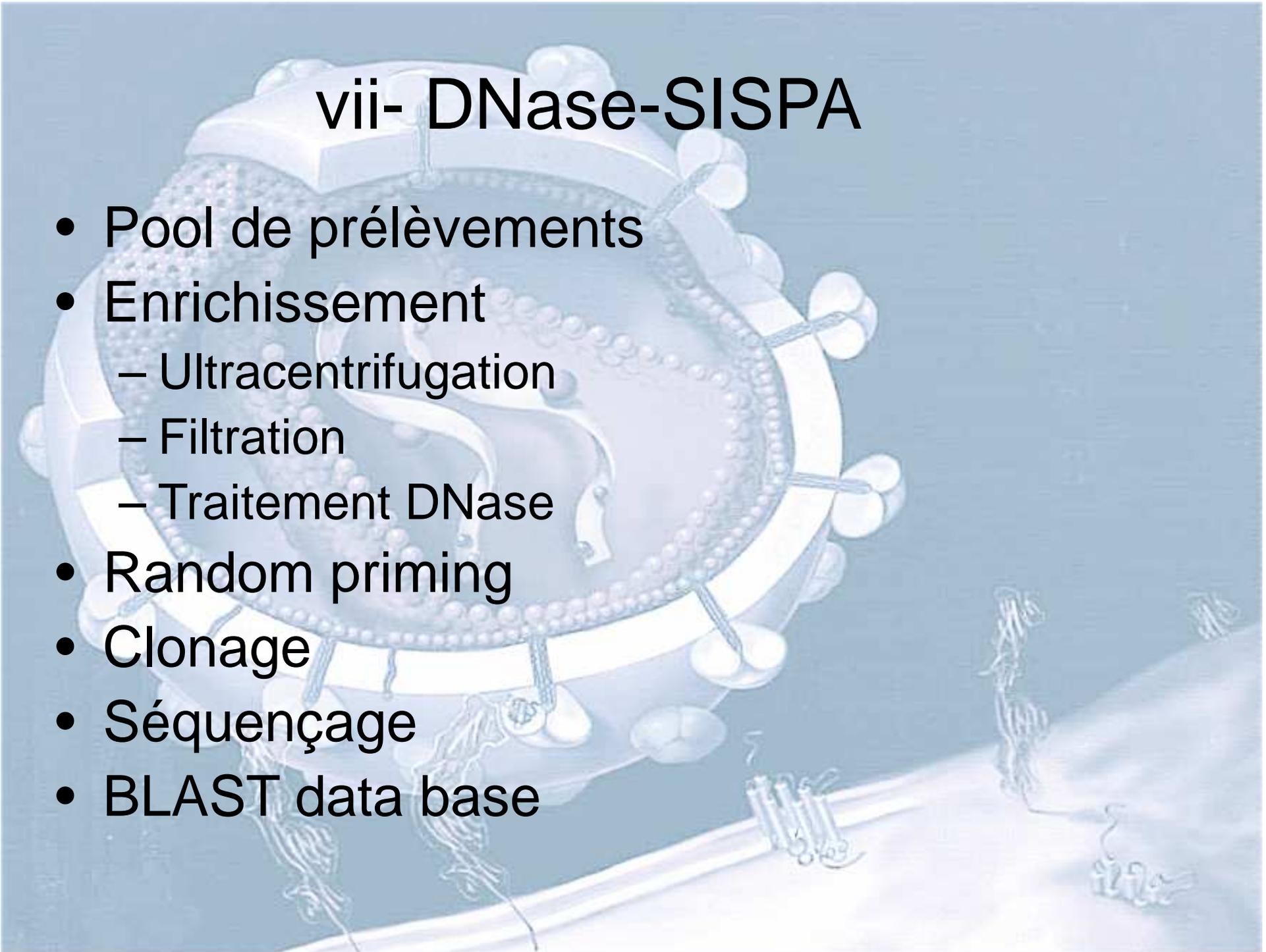
# Pan retroviruse primers

<b>PAN-UO</b>	5'- Ltggaaagt <sup>c g a</sup> gtttacccc-3'	
<b>PAN-UI</b>	5'- Ltgtgttaccccaagg-3'	<sup>c g a g</sup>
<b>HTLV-1</b>	tggaaagtactaccccaagg	gttt
	W K <u>V</u> L P Q G	F
<b>HIV-1</b>	tacaatgtgcttccacaggg	atgg
	Y N <u>V</u> L P Q G	W
<b>MoMLV</b>	tggaccagactcccacaggg	tttc
	W T R L P Q G	F
<b>MPMV</b>	tggaaaggttttaccacaagg	tatg
	W K <u>V</u> L P Q G	M
<b>ERV9</b>	tggatggtcttgccccaagg	gttt
	W M <u>V</u> L P Q G	F

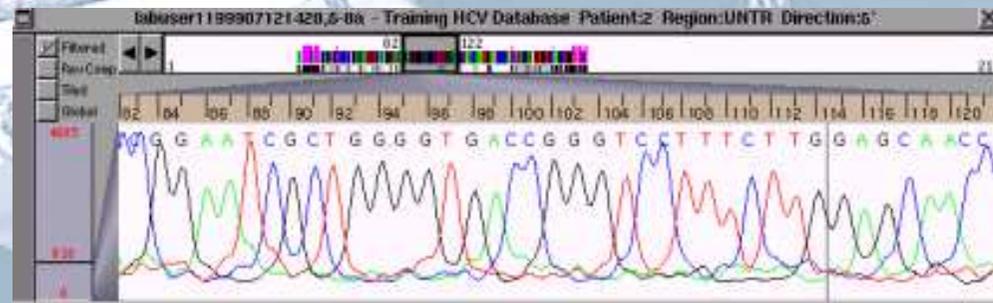
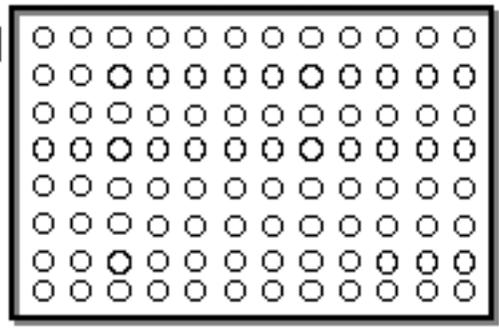
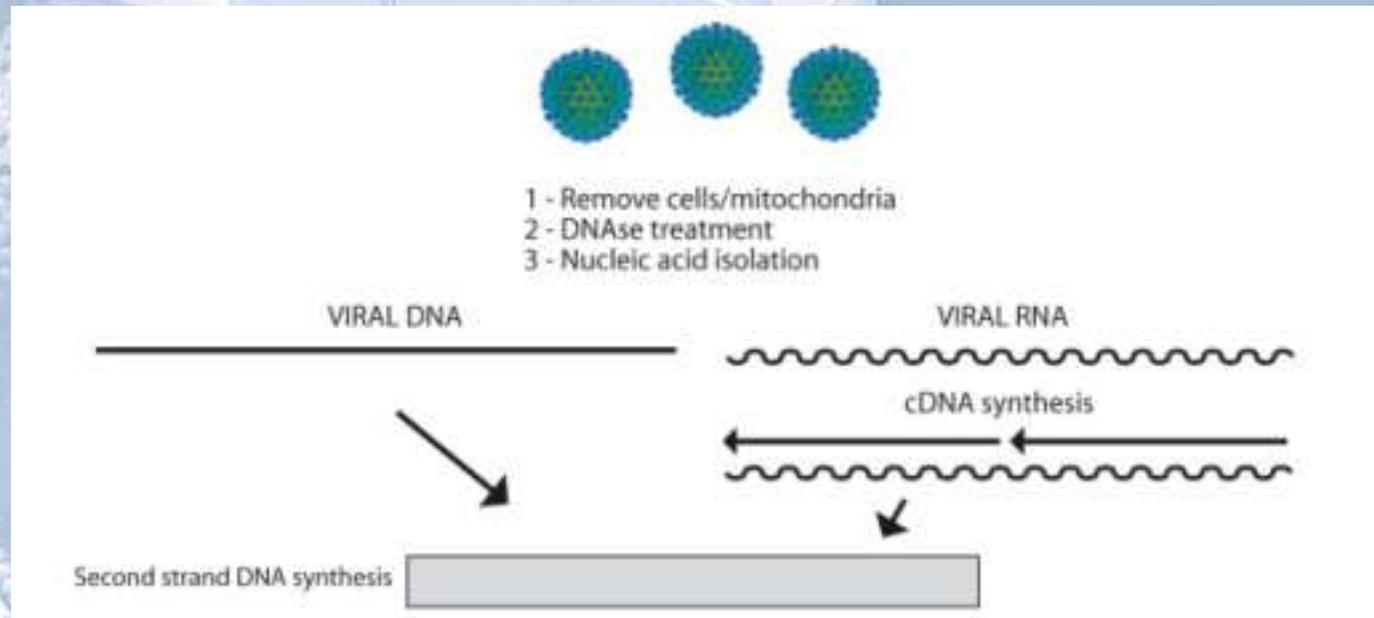


## vii- DNase-SISPA

- Pool de prélèvements
- Enrichissement
  - Ultracentrifugation
  - Filtration
  - Traitement DNase
- Random priming
- Clonage
- Séquençage
- BLAST data base



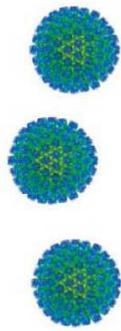
# vii- DNase-SISPA



## viii- VIDISCA

### Virus Discovery cDNA-AFLP

- cDNA amplified fragment length polymorphism
- Random cDNA
- Digestion enzymatique
- Ligation d'adaptateurs sur sites de restriction
- Amplification à partir des primers adaptateurs
- Clonage, séquençage, data base
- Application lors de la découverte du HCoV-NL63.



- 1 - Remove cells/mitochondria
- 2 - DNase treatment
- 3 - Nucleic acid isolation

VIRAL DNA

VIRAL RNA

cDNA synthesis

Second strand DNA synthesis

Digestion

Ligation

Preamplification

Selective fragment amplification  
(16 combinations)

Restriction Enzymes

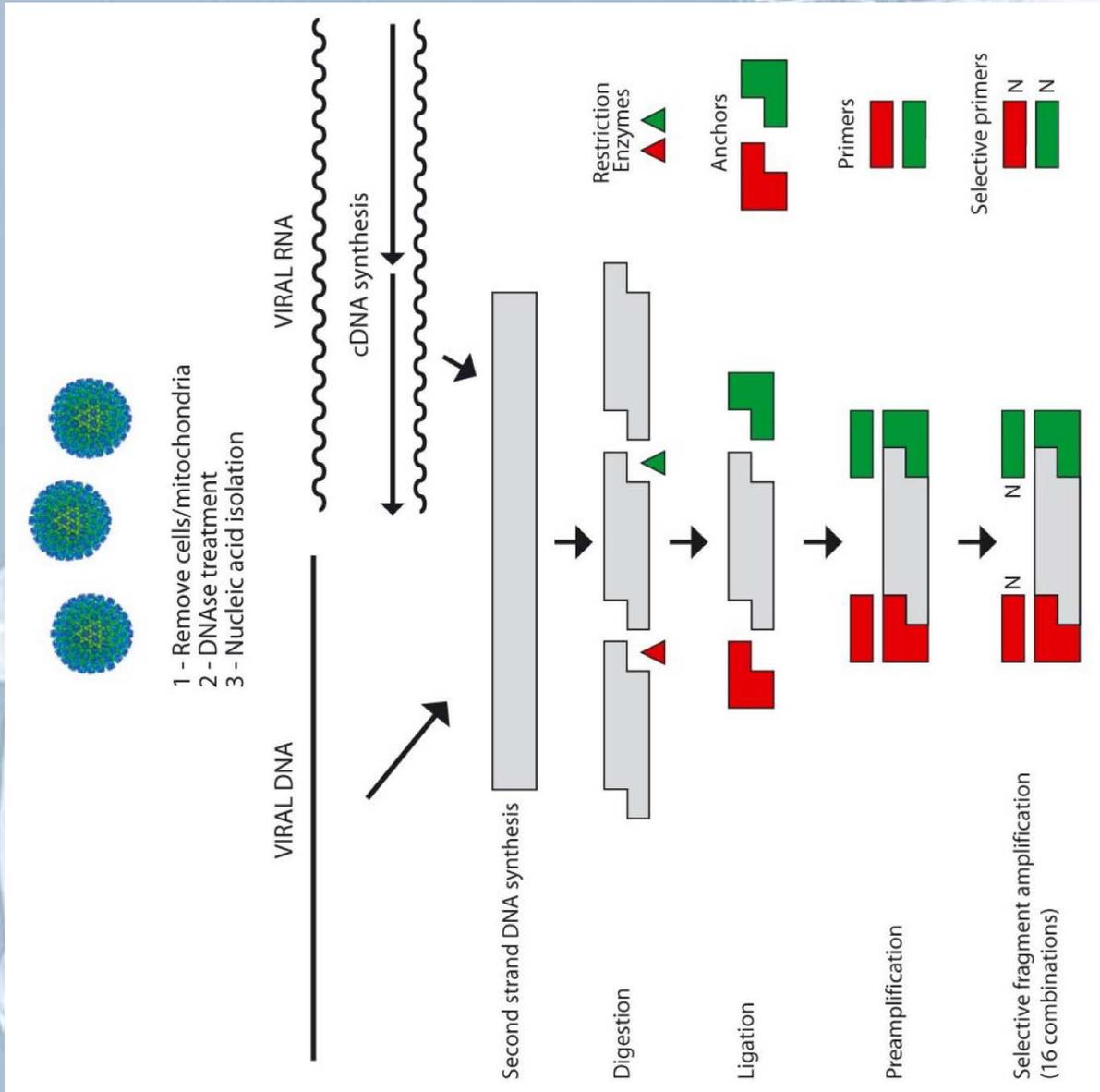
Restriction Enzymes

Anchors

Primers

Selective primers

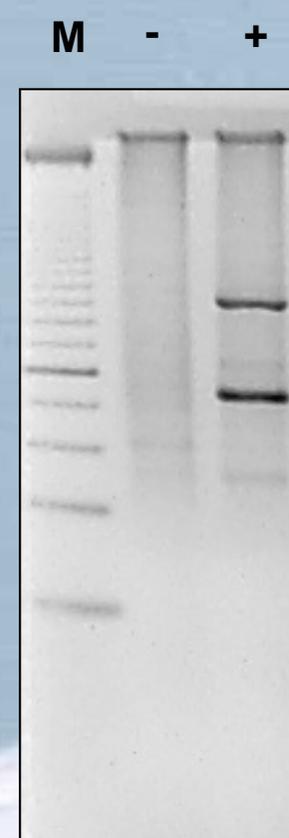
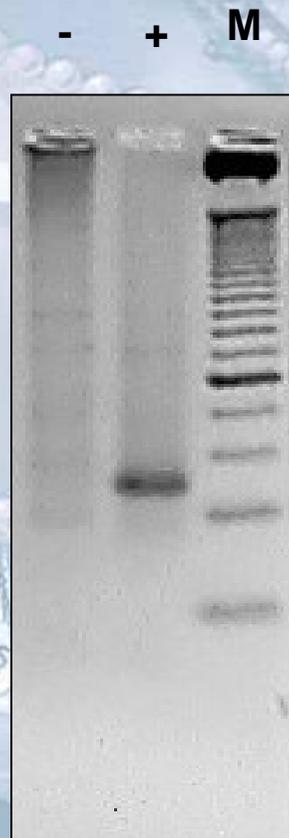
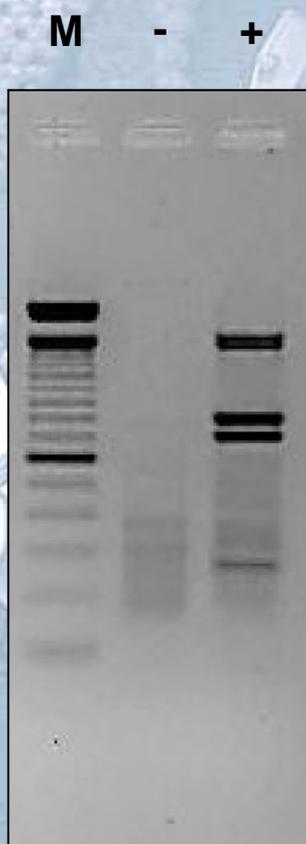
Selective primers



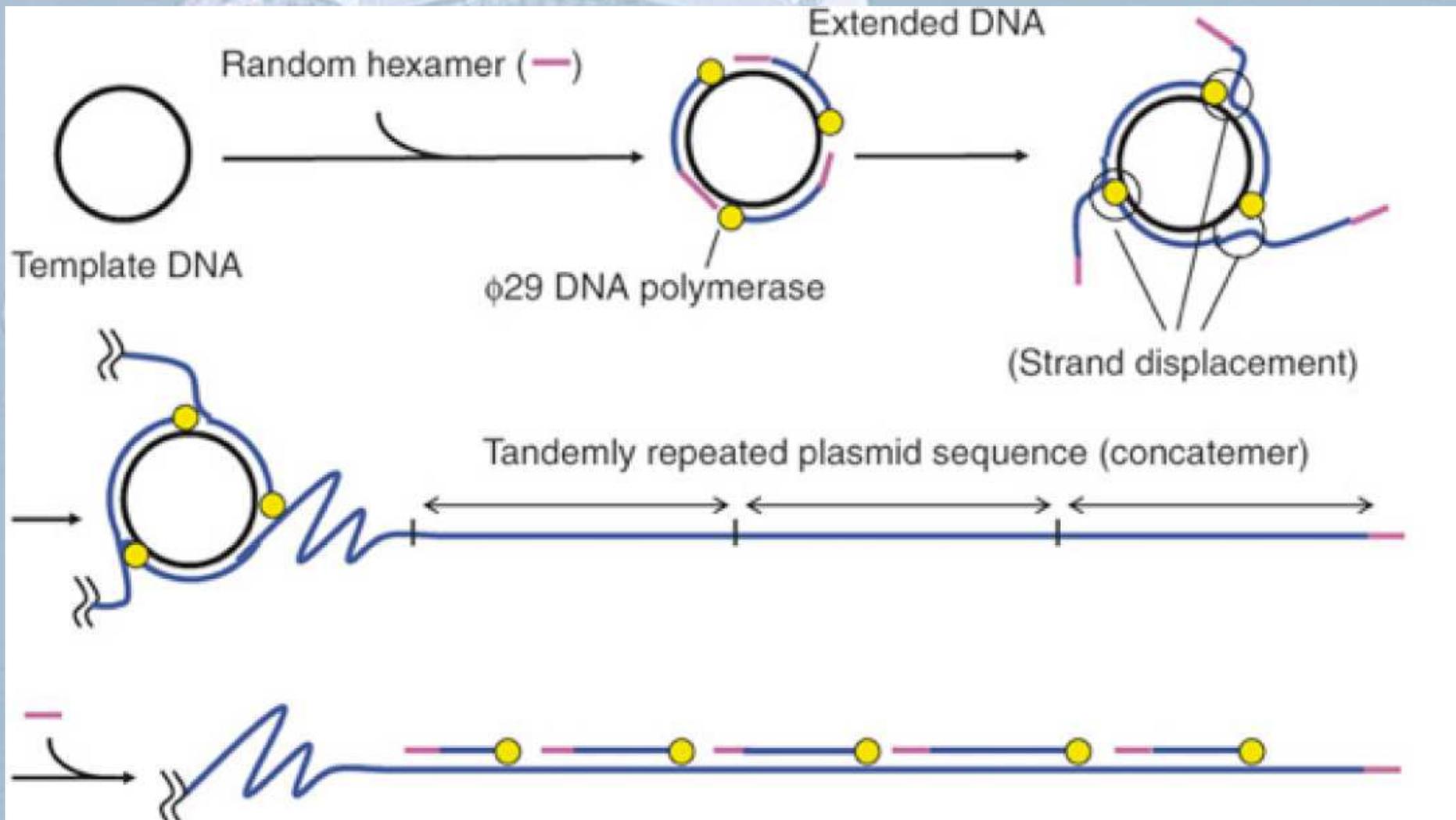
Parvo B19 plasma  
(ss-DNA)

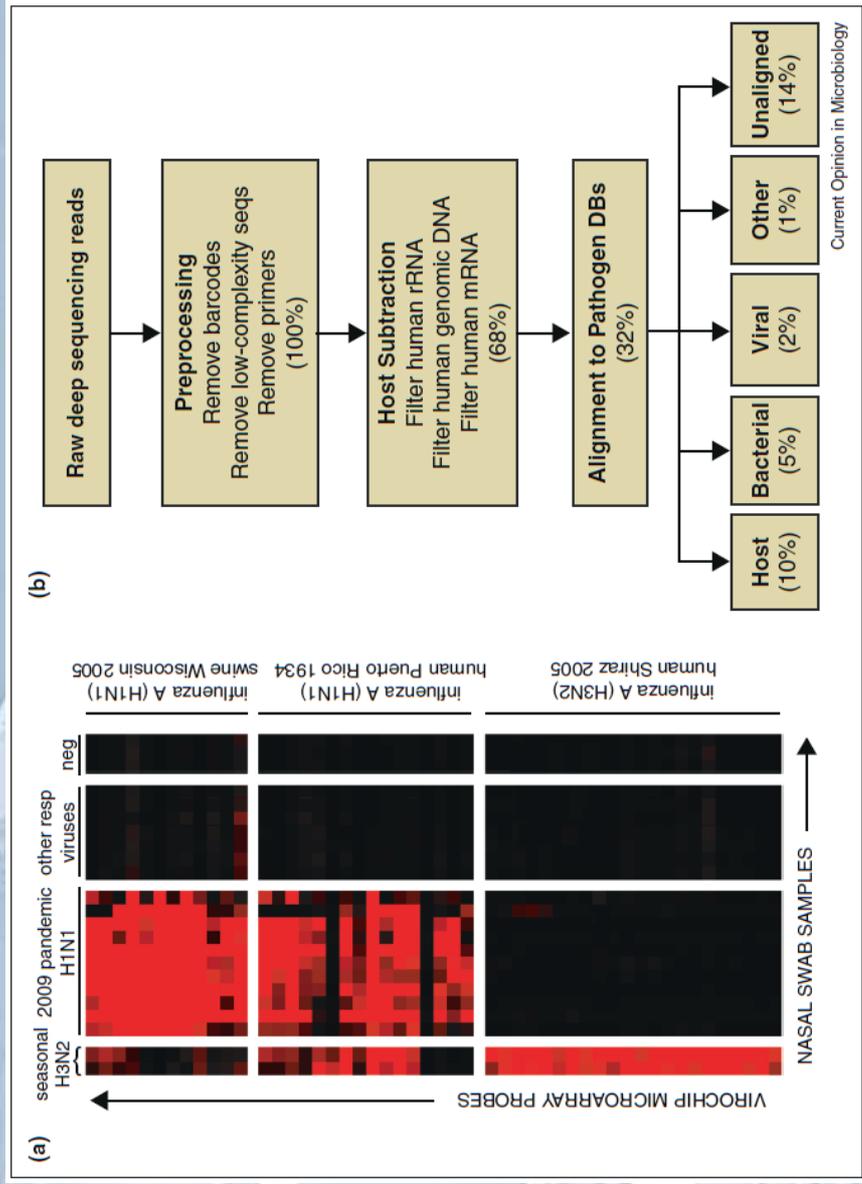
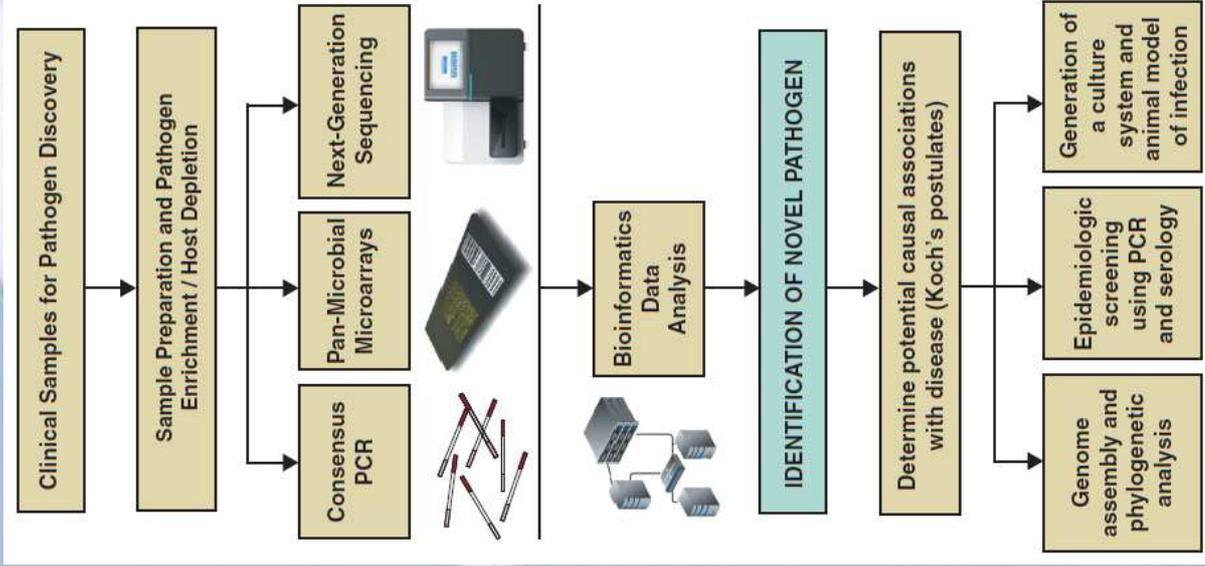
HIV-1 virus culture  
(ss-RNA)

HBV plasma  
(partially ds-DNA)



# ix- RCA Rolling Circle Amplification





# L'exemple des nouveaux polyomavirus humains



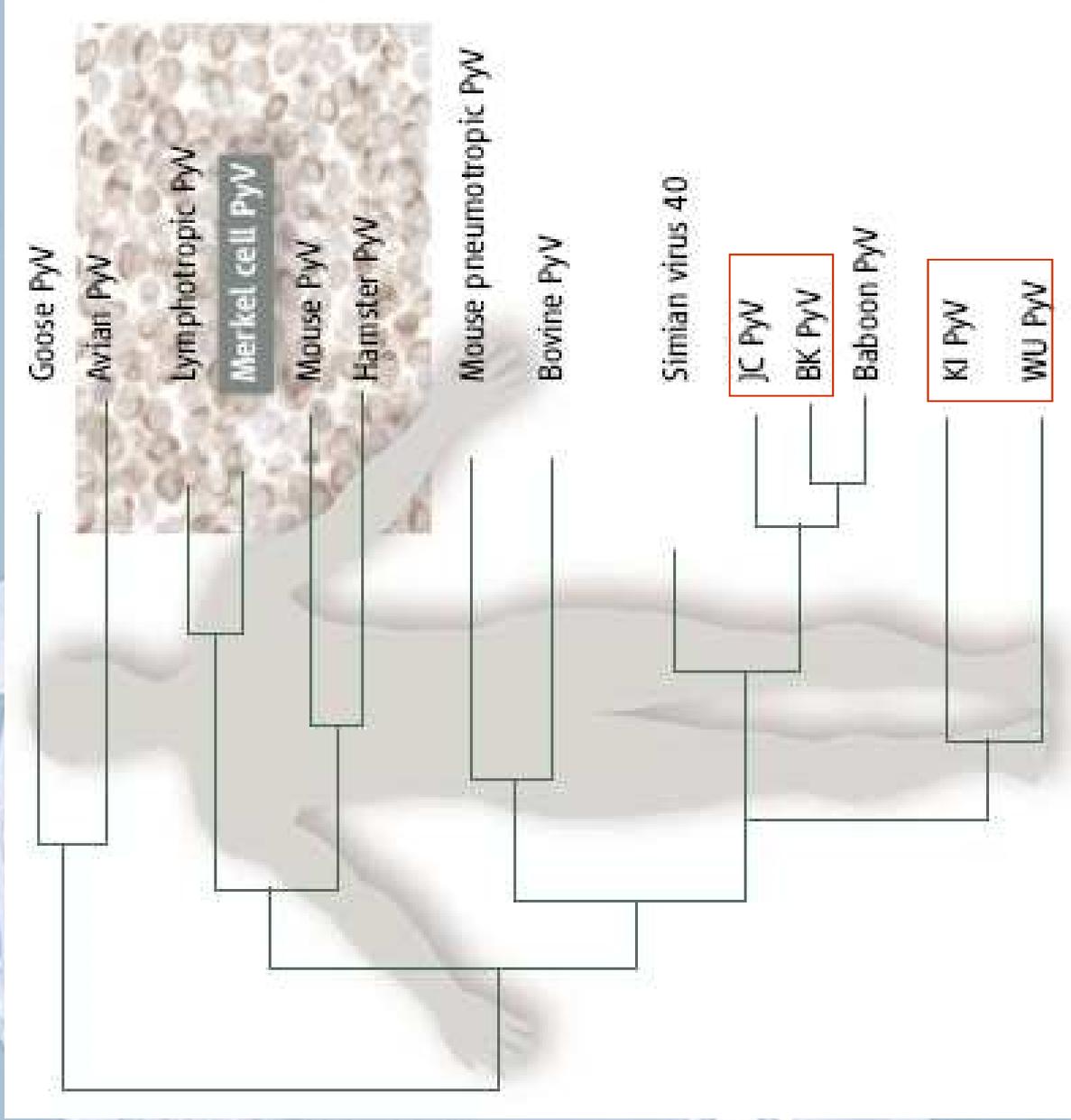


**Famille des *Polyomaviridae* avec le seul genre  
*polyomavirus***

**Polyomavirus = virus capable d'induire de  
nombreuses (poly-) tumeurs (-oma)**

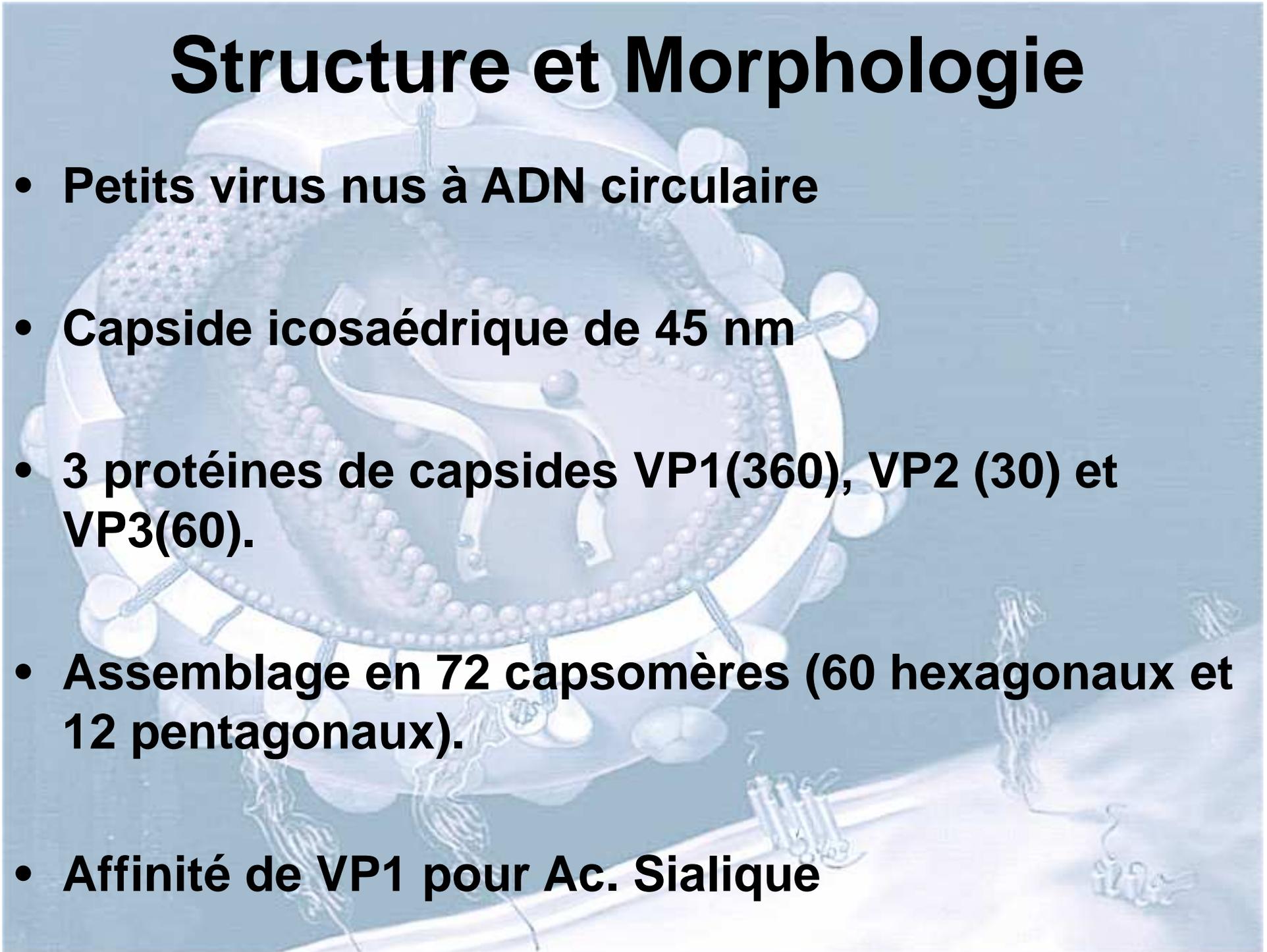
# Historique

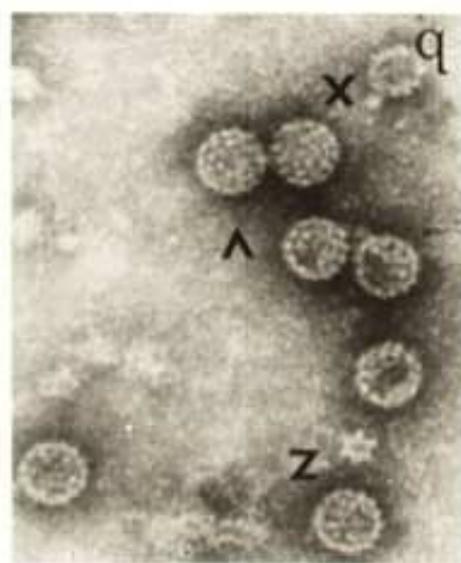
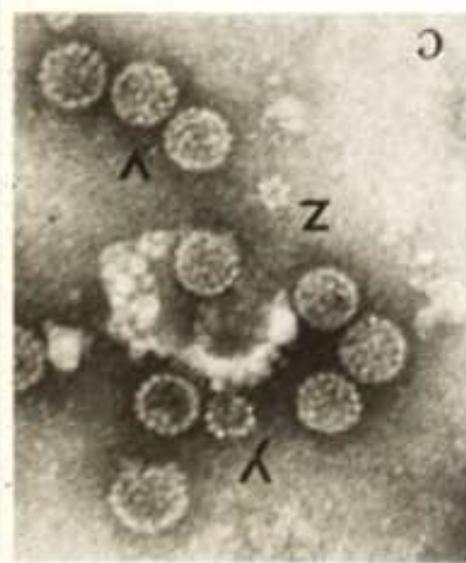
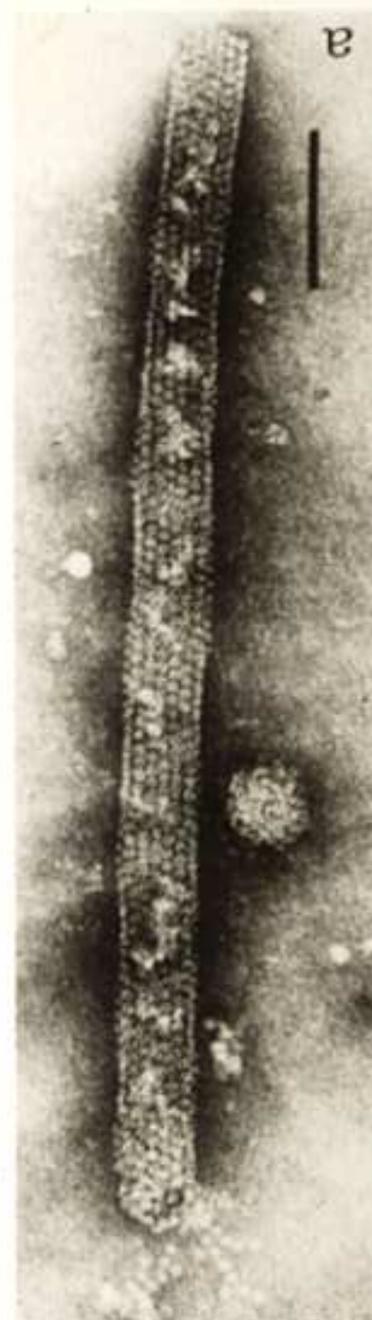
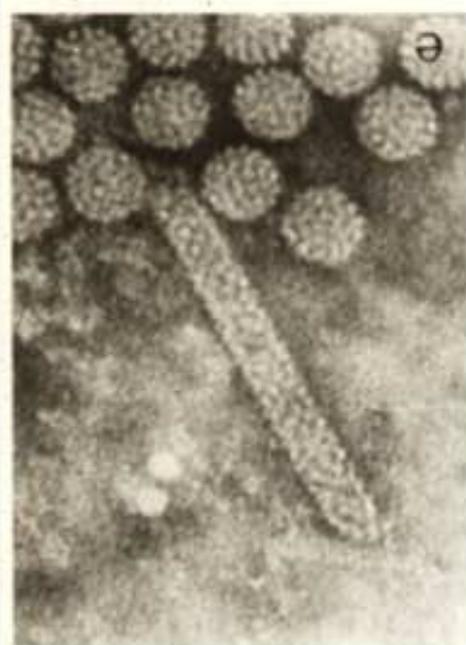
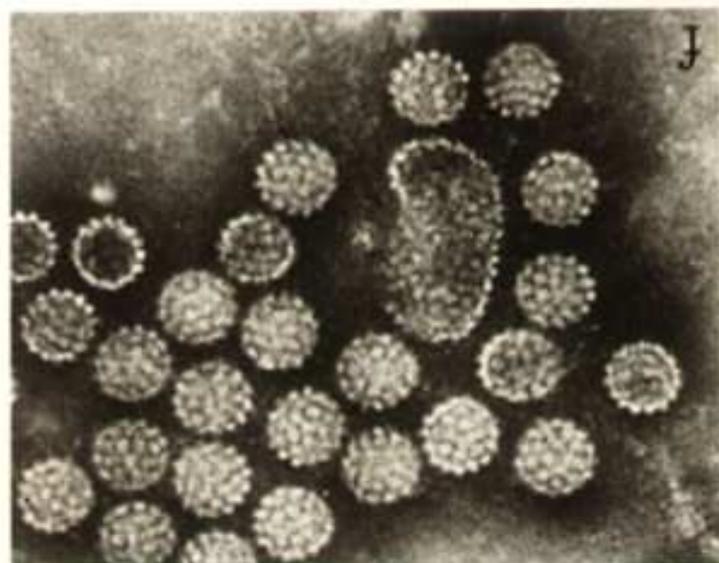
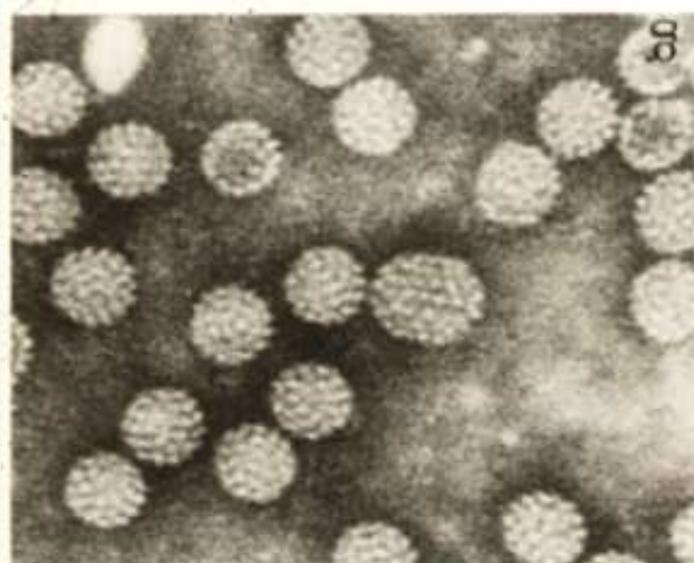
- Les *Polyomavirus* infectent de nombreux vertébrés
- *Polyomavirus* murin isolé en 1953 par Gross impliqué dans des tumeurs solides chez la souris
- Simian Vacuolating Virus 40 (SV40) isolé en 1960 à partir de culture de souche vaccinale Sabin sur cellules de reins de singe
- 1971: Deux premiers *polyomavirus* humains
  - **BKV** (Initiales patient) transplanté rénal
  - **JCV** (Jamestown Canyon) cas de LEMP
- 2007 Deux nouveaux *polyomavirus* humains
  - **KIPyV** (Karolinska Institute polyomavirus)
  - **WUPyV** (Washington University polyomavirus)
- 2008 Merkel Cell Virus (MCPyV)
- 2010 HPyV6, HPyV7 et TSPyV



# Structure et Morphologie

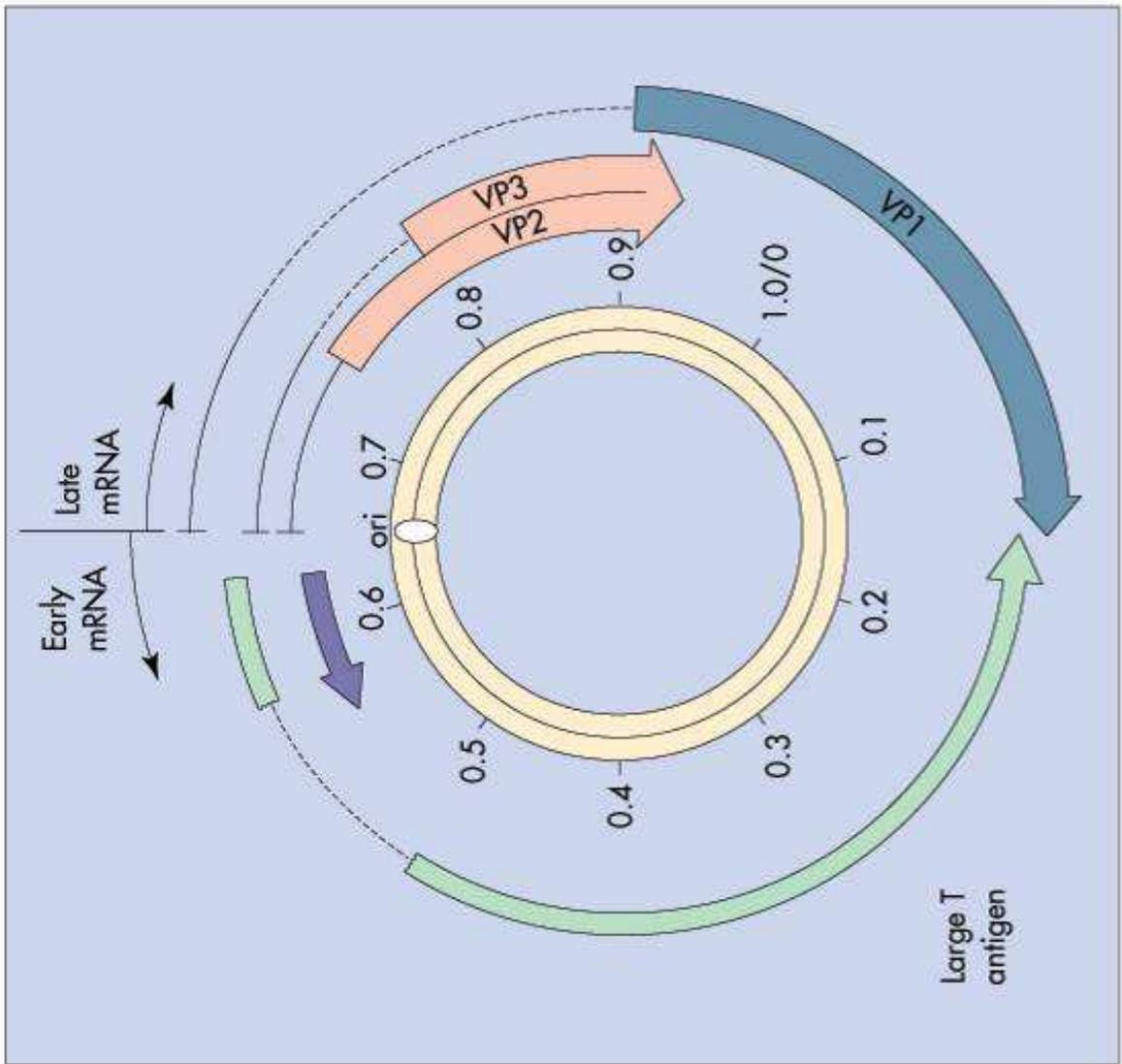
- **Petits virus nus à ADN circulaire**
- **Capside icosaédrique de 45 nm**
- **3 protéines de capsides VP1(360), VP2 (30) et VP3(60).**
- **Assemblage en 72 capsomères (60 hexagonaux et 12 pentagonaux).**
- **Affinité de VP1 pour Ac. Sialique**

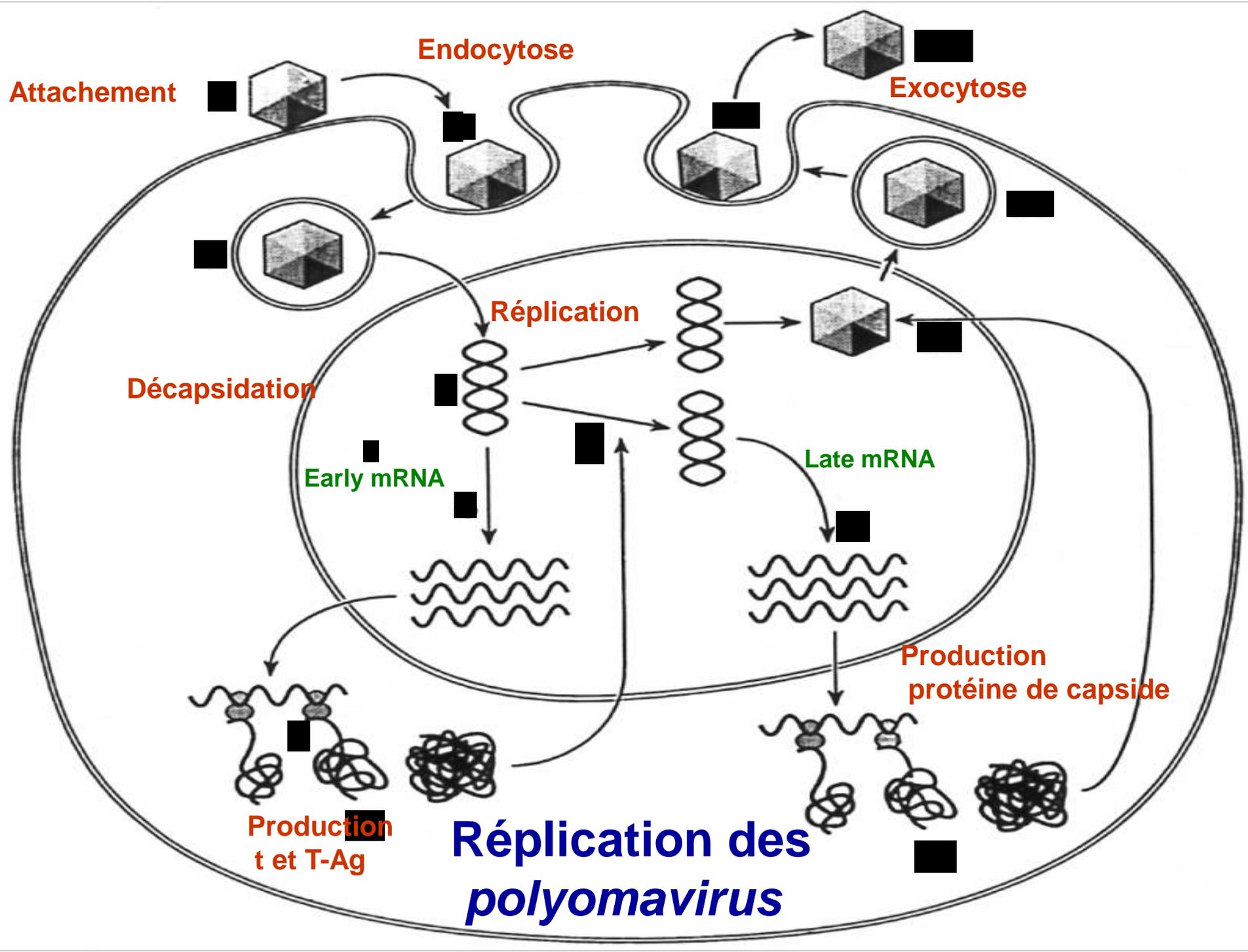




# Génome des *polyomavirus*

- ADN circulaire de 5.5 kb
- Associé à des histones cellulaires (pseudo Chromosome, pseudo-plasmide)
- Code pour 6 ORFs
- 3 gènes de capsides chevauchants
- Code **Antigènes T**, small T, middle T and large T antigen (sTAg, LTAg) + agnoprotéine
- *Ori* entourée de zones non codantes

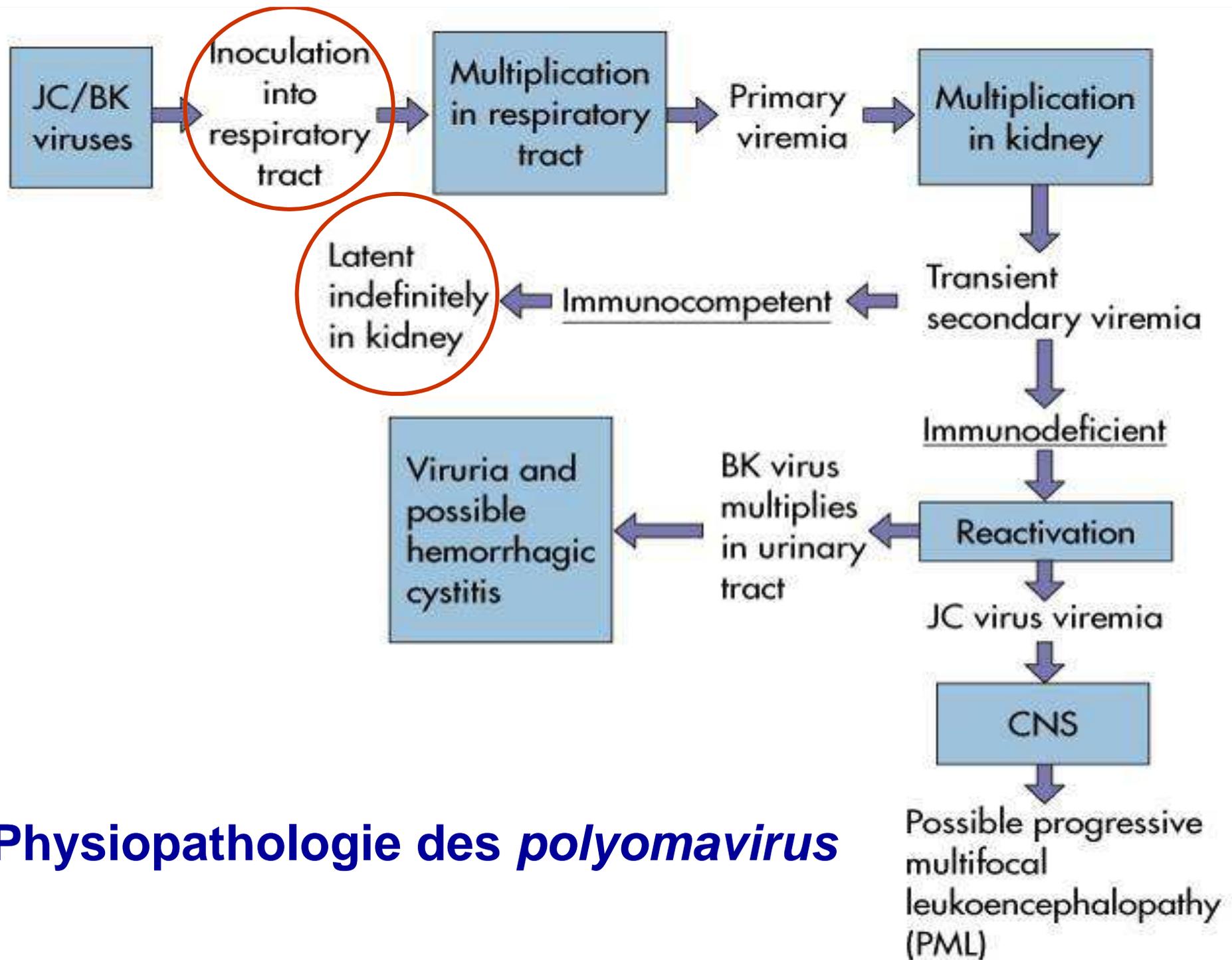




# Réplication des polyomavirus

# Réplication des *polyomavirus*

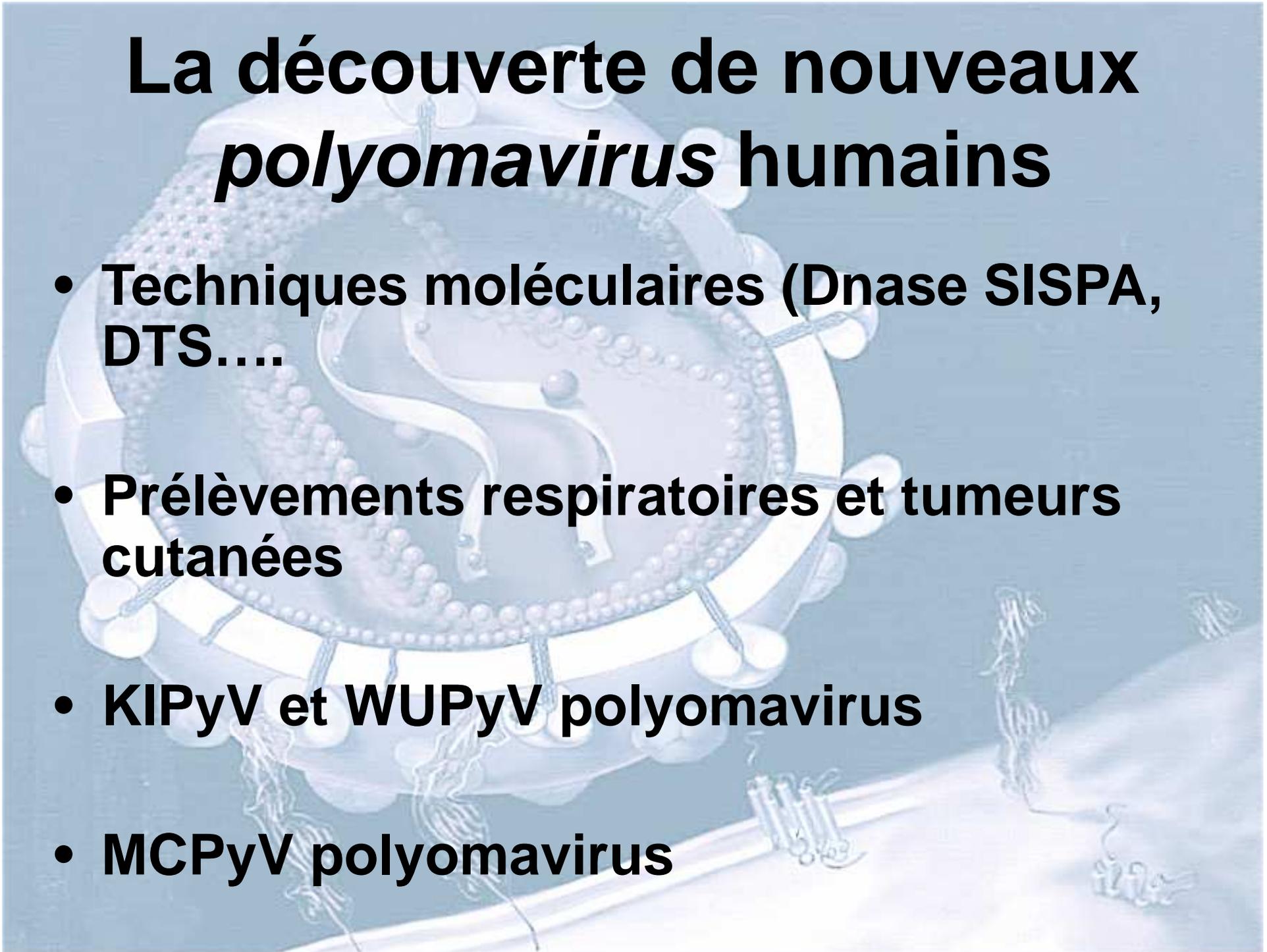
- Cycle lytique avec production de virus
- Infection abortive et oncogénèse
  - Antigène T (LTA<sub>g</sub>) suffisant pour induire l'immortalisation de certaines cellules (LTA<sub>g</sub> de SV40 et cellules murines)
  - 3 domaines indispensables
    - Liaison ADN et interaction avec DNA-J
    - Liaison pRb protéines (rétinoblastoma protein) (blocage phosphorylation)
    - Liaison p53
  - Associations suspectées: toujours la controverse
    - Virus du polyome de la souris
    - SV40 et tumeurs chez les rongeurs (et l'homme?)
    - Plus récemment JCV et tumeurs solides chez l'homme?



## Physiopathologie des *polyomavirus*

# La découverte de nouveaux *polyomavirus* humains

- Techniques moléculaires (Dnase SISPA, DTS....)
- Prélèvements respiratoires et tumeurs cutanées
- KIPyV et WUPyV polyomavirus
- MCPyV polyomavirus



# KIPyV et WUPyV



# Identification of a Novel Polyomavirus from Patients with Acute Respiratory Tract Infections

Anne M. Gaynor<sup>1</sup>, Michael D. Nissen<sup>2</sup>, David M. Whiley<sup>2</sup>, Ian M. Mackay<sup>2</sup>, Stephen B. Lambert<sup>2</sup>, Guang Wu<sup>1</sup>, Daniel C. Brennan<sup>3</sup>, Gregory A. Storch<sup>4</sup>, Theo P. Sloots<sup>2</sup>, David Wang<sup>1,5\*</sup>

**1** Department of Molecular Microbiology, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri, United States of America, **2** Queensland Paediatric Infectious Diseases Laboratory, Sir Albert Sakzewski Virus Research Centre, Royal Children's Hospital, Brisbane, Queensland, Australia, **3** Department of Internal Medicine, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri, United States of America, **4** Department of Pediatrics, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri, United States of America, **5** Department of Pathology and Immunology, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri, United States of America

JOURNAL OF VIROLOGY, Apr. 2007, p. 4130–4136  
0022-538X/07/\$08.00+0 doi:10.1128/JVI.00028-07

Copyright © 2007, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 81, No. 8

## Identification of a Third Human Polyomavirus<sup>▽</sup>

Tobias Allander,<sup>1,\*</sup> Kalle Andreasson,<sup>2</sup> Shawon Gupta,<sup>1</sup> Annelie Bjerkner,<sup>1</sup> Gordana Bogdanovic,<sup>1,2</sup> Mats A. A. Persson,<sup>3</sup> Tina Dalianis,<sup>2</sup> Torbjörn Ramqvist,<sup>2</sup> and Björn Andersson<sup>4</sup>

*Laboratory for Clinical Microbiology, Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska University Hospital, Karolinska Institutet, SE-17176 Stockholm, Sweden<sup>1</sup>; Cancer Center Karolinska, Department of Oncology and Pathology, Karolinska University Hospital, Karolinska Institutet, SE-17176 Stockholm, Sweden<sup>2</sup>; Center for Molecular Medicine, Department of Medicine, Karolinska University Hospital, Karolinska Institutet, SE-17176 Stockholm, Sweden<sup>3</sup>; and*

*Department of Cell and Molecular Biology, Karolinska Institutet, SE-17177 Stockholm, Sweden<sup>4</sup>*

# Epidémiologie

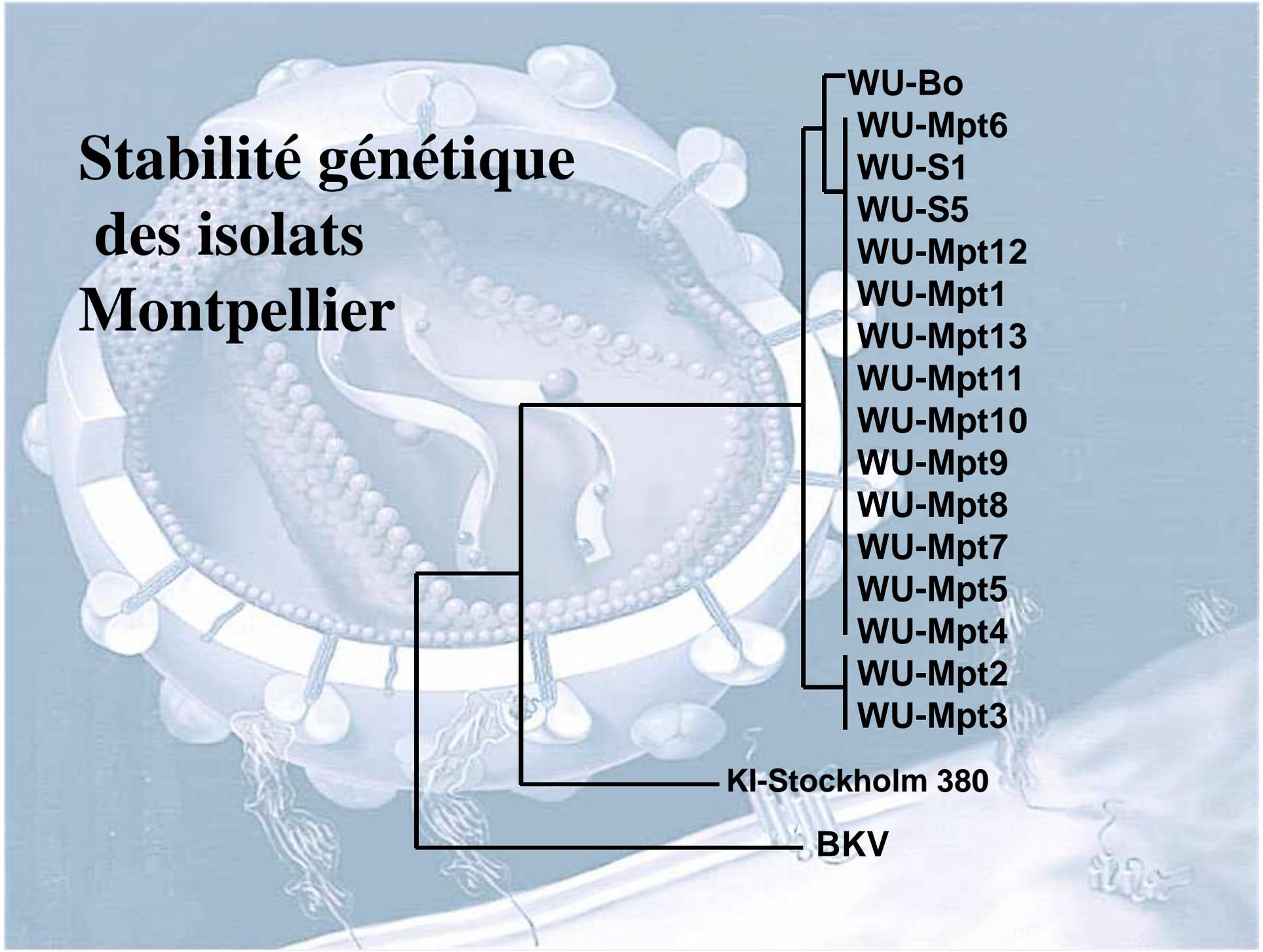
- **Etudes initiales WU 2% et KI 1%**
- **Distribution cosmopolite, Suède, Australie, USA, Corée du Sud, Canada, UK et France.**
- **Prévalences comparables**
- **Montpellier (WU 2,4%; KI 0,6%)**
- **Nombreuses co-détections avec d'autres agents pathogènes (30->70%)**
- **Absence de saisonnalité dans la détection**

# Stabilité génétique des isolats Montpellier

- WU-Bo
- WU-Mpt6
- WU-S1
- WU-S5
- WU-Mpt12
- WU-Mpt1
- WU-Mpt13
- WU-Mpt11
- WU-Mpt10
- WU-Mpt9
- WU-Mpt8
- WU-Mpt7
- WU-Mpt5
- WU-Mpt4
- WU-Mpt2
- WU-Mpt3

KI-Stockholm 380

BKV

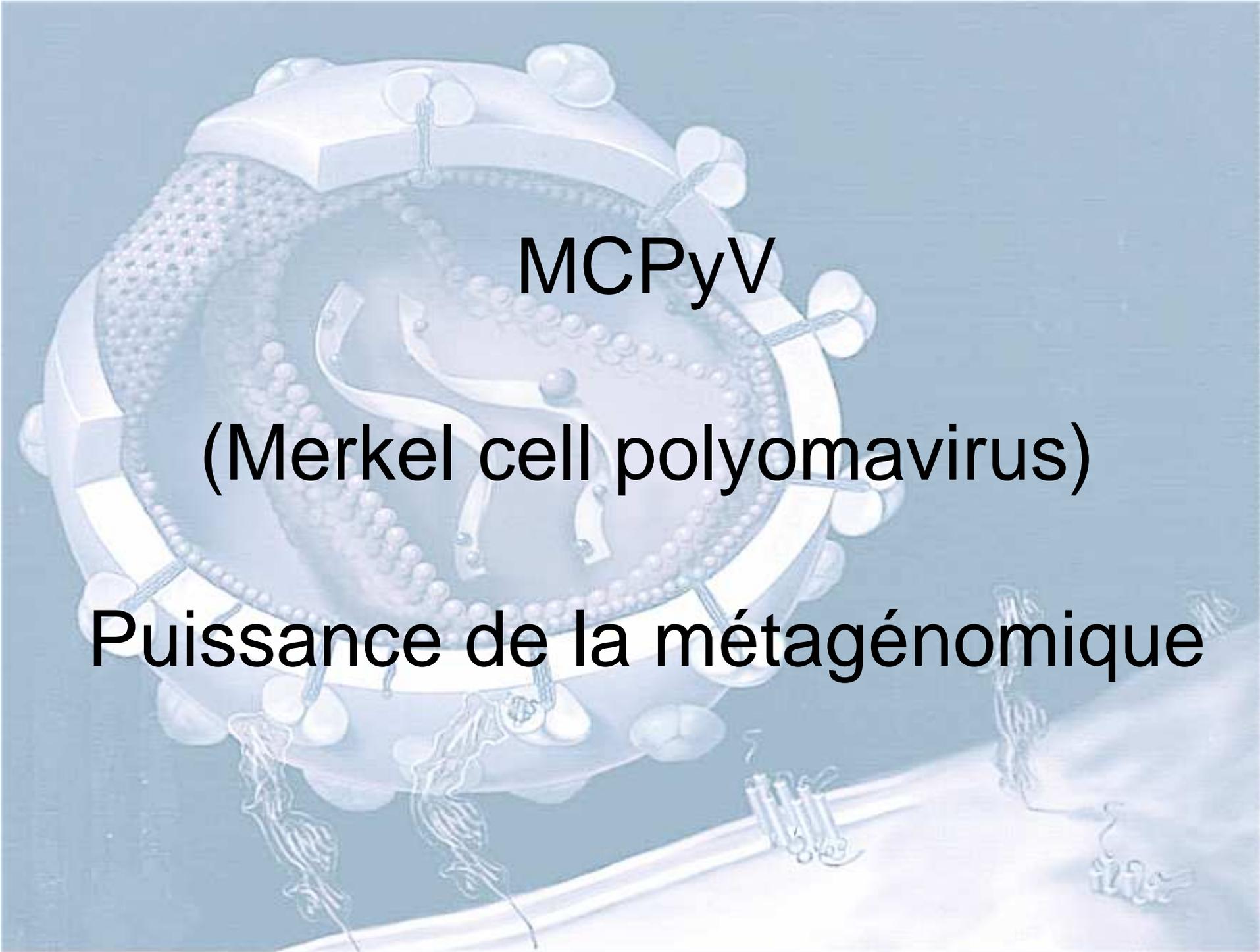


# Pathogénèse

- **Ce que l'on sait des polyomavirus**
  - Ubiquitaires, prévalence élevée
  - Primo-infection ????? (Porte d'entrée respiratoire)
  - Persistance, latence
  - Sécrétion asymptomatique fréquente
  - Réactivation symptomatique surtout chez sujets ID
  - Oncogénèse ???
- **Rôle pathogène des WUPyV et KIPyV**
  - Isolé chez enfants avec RTD mais co-infection
  - Isolé chez enfants asymptomatiques
    - Canada, 6,4%; Corée du Sud, 4,2%, Ecosse, 10,7%
  - Fréquent chez enfants ID (Ecosse) idem JC/BK

# Conclusion

- **Virus ubiquitaire, avec prévalence non négligeable**
- **Aucune évidence de pathogénèse respiratoire**
- **Virus à transmission respiratoire probable**
- **Latence ?**
- **Conditions de réactivation ?**
- **Pathogénèse chez ID lors des réactivations?**

A detailed 3D cutaway diagram of a MCPyV virus particle. The virus is roughly spherical with a hexagonal cross-section. It features a prominent outer shell (capsid) and an inner core. The capsid is composed of several layers of protein subunits. The inner core contains a circular arrangement of viral DNA. The diagram is rendered in shades of blue and white, with a semi-transparent cutaway revealing the internal structure. The background is a dark blue gradient.

**MCPyV**

**(Merkel cell polyomavirus)**

**Puissance de la métagénomique**

# Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma

Huichen Feng, Masahiro Shuda, Yuan Chang,\* Patrick S. Moore\*

Merkel cell carcinoma (MCC) is a rare but aggressive human skin cancer that typically affects elderly and immunosuppressed individuals, a feature suggestive of an infectious origin. We studied MCC samples by digital transcriptome subtraction and detected a fusion transcript between a previously undescribed virus T antigen and a human receptor tyrosine phosphatase. Further investigation led to identification and sequence analysis of the 5387-base-pair genome of a previously unknown polyomavirus that we call Merkel cell polyomavirus (MCPyV). MCPyV sequences were detected in 8 of 10 (80%) MCC tumors but only 5 of 59 (8%) control tissues from various body sites and 4 of 25 (16%) control skin tissues. In six of eight MCPyV-positive MCCs, viral DNA was integrated within the tumor genome in a clonal pattern, suggesting that MCPyV infection and integration preceded clonal expansion of the tumor cells. Thus, MCPyV may be a contributing factor in the pathogenesis of MCC.

Polyomaviruses have been suspected as potential etiologic agents in human cancer since the discovery of murine polyoma virus (MuPyV) by Gross in 1953 (1). However, although polyomavirus infections can produce tumors in animal models, there is no conclusive evidence that they play a role in human cancers (2). These small double-stranded DNA viruses

[~5200 base pairs (bp)] encode a variably spliced oncoprotein, the tumor (T) antigen (3, 4), and are divided into three genetically distinct groups: (i) avian polyomaviruses, (ii) mammalian viruses related to MuPyV, and (iii) mammalian polyomaviruses related to simian virus 40 (SV40) (5). All four known human polyomaviruses [BK virus (BKV), JC virus (JCV), K1 virus (K1V), and WU virus (WUV) (6, 7)] belong to the SV40 subgroup. In animals, integration of polyomavirus DNA into the host genome often precedes tumor formation (8).

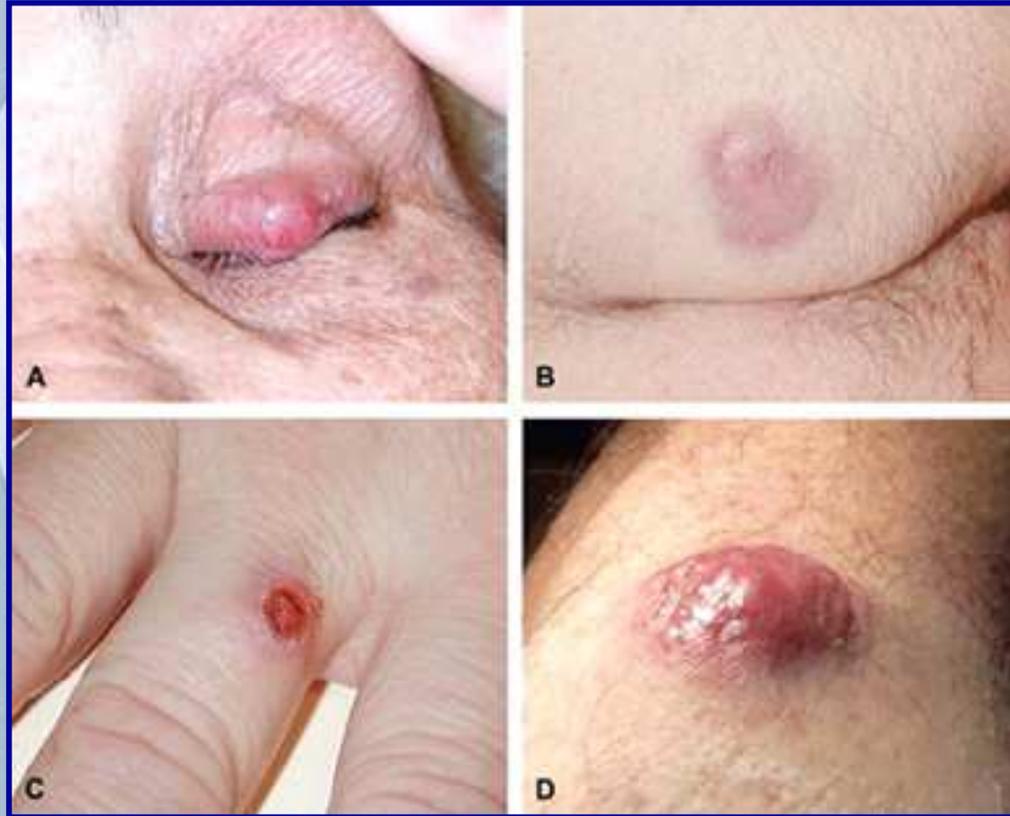
Merkel cell carcinoma (MCC) is a neuroectodermal tumor arising from mechanoreceptor Merkel cells (Fig. 1A). MCC is rare, but its incidence has tripled over the past 2 decades in the United States to 1500 cases per year (9). It is one of the most aggressive forms of skin cancer; about 50% of advanced MCC patients

Molecular Virology Program, University of Pittsburgh Cancer Institute, University of Pittsburgh, 5117 Centre Avenue, Suite 1.8, Pittsburgh, PA 15213, USA.

\*These authors contributed equally to this work. To whom correspondence should be addressed. E-mail: yc70@pitt.edu (Y.C.); psm9@pitt.edu (P.S.M.)



# Carcinome à cellules de Merkel (MCC)



- Un cancer cutané rare (<0.5/100000) mais agressif (**mortalité 33% /an**)
- Avec une incidence en augmentation (x3 sur 10 ans)
- Incidence plus élevée chez personnes âgées et patients immunodéprimés
- Analogies avec KS

**Origine infectieuse ...?????.....**

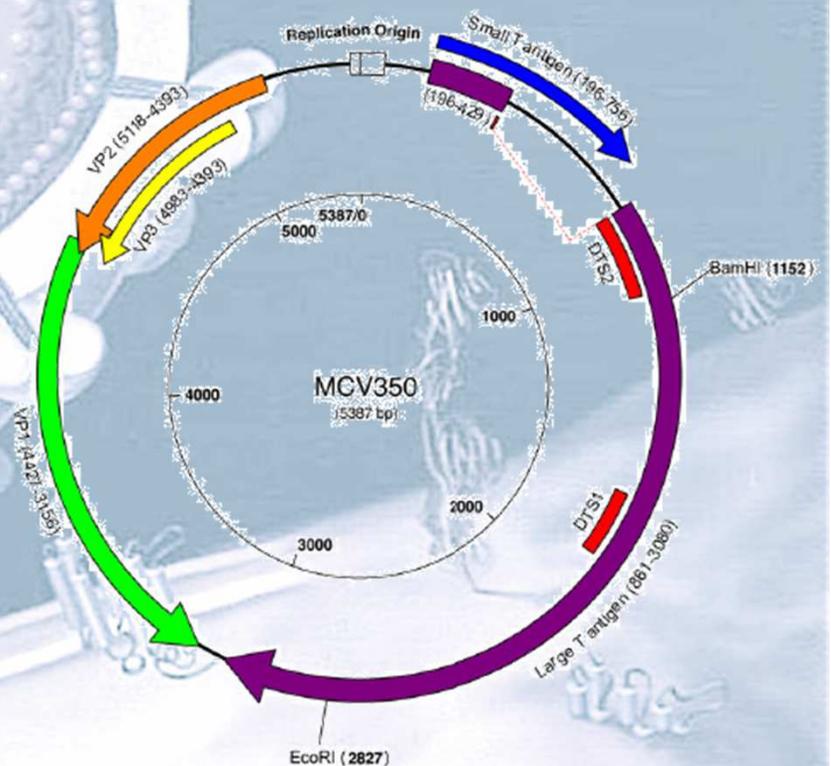
# MCC: origine infectieuse ?

Echantillons de MCC étudiés par Digital Transcriptome subtraction (DTS)

→ Identification de séquences homologues à l'AgT des polyomavirus

→ Nouveau polyomavirus: MCPyV

*Feng et al., Science 2008, 319: 1096-100*



# MCC: origine infectieuse probable ?

---

**MCPyV retrouvé dans:**

- Environ 80% des MCC selon études
- 5 à 30% des tissus contrôles....

**Intégration du génome viral dans la plupart des tissus tumoraux MCC**

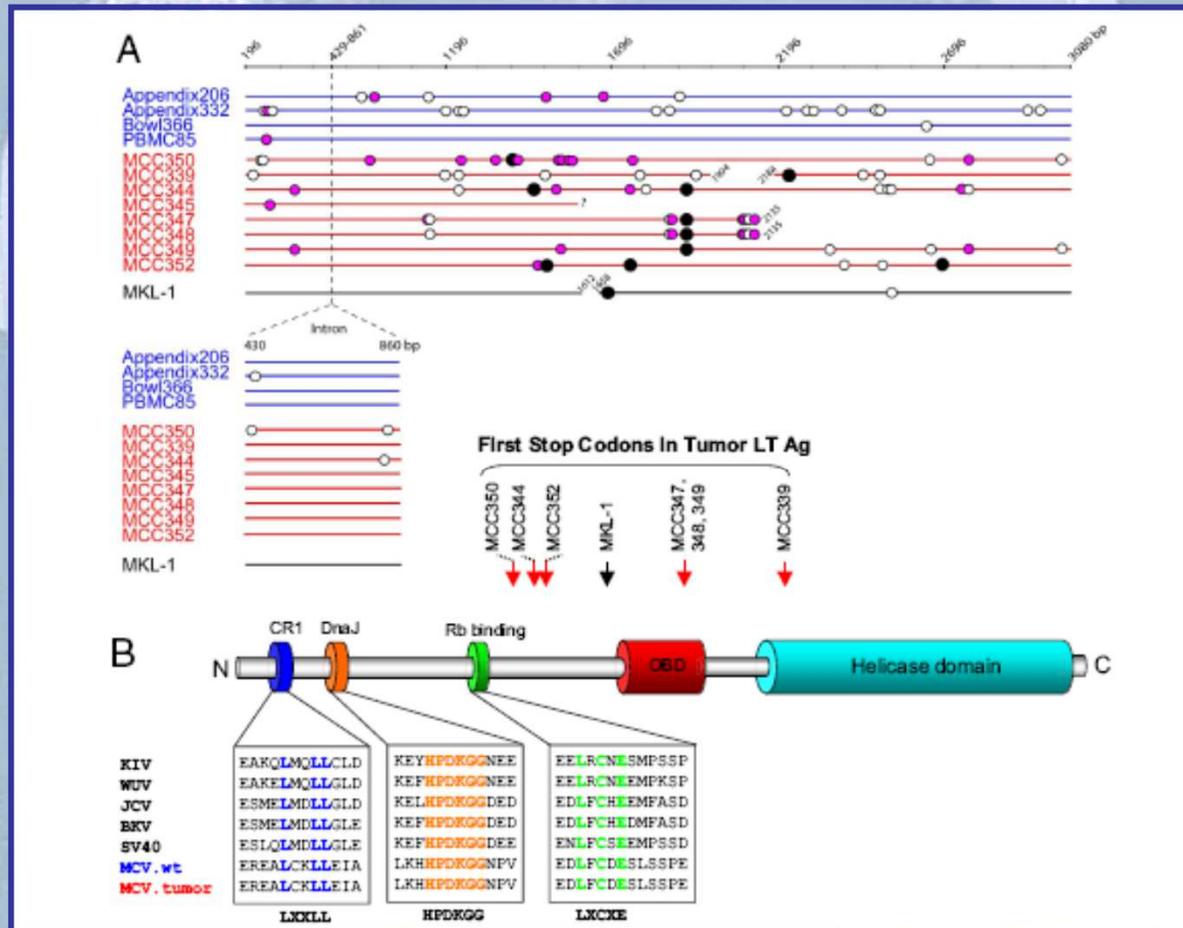
*Feng et al., Science 2008, 319: 1096-100.*

*Shuda et al., PNAS 2008, 05:16272-7.*

*Sastre- Garau et al., J Pathol 2009, 218:48-56.*

# MCC: origine infectieuse probable ?

## Mutations signature spécifiques de tumeurs



*Shuda et al., PNAS 2008, 05:16272-7.*

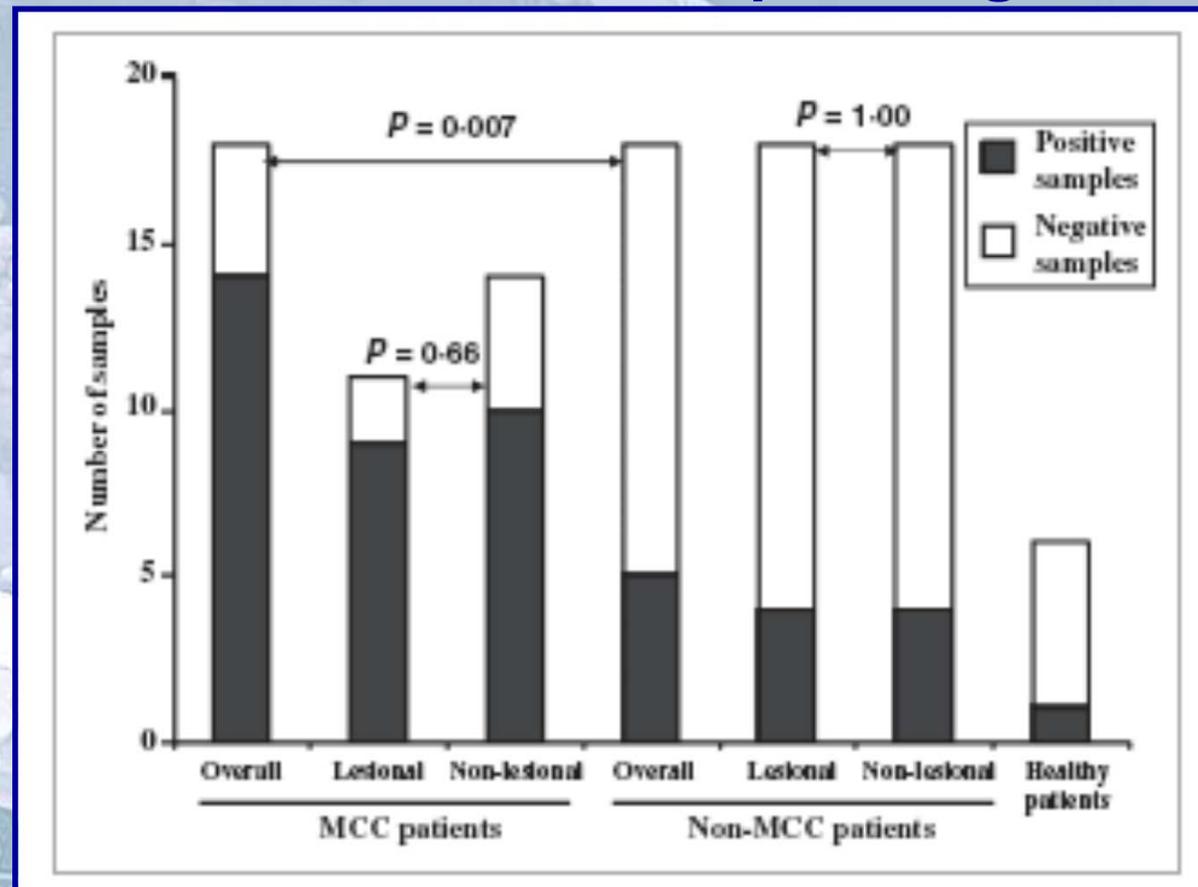
# MCC: origine infectieuse probable ?

---

- Détection d'ADN viral dans d'autres pathologies cutanées
  - Squamous cell carcinoma
  - Other non melanoma skin cancer
  - KS
  - Porokeratosis
  - ...etc...
- Détection de l'ADN viral dans des tissus cutanés sains
- Détection ADN viral dans sécrétion respiratoire

# MCC: origine infectieuse probable ?

- Détection d'ADN viral dans d'autres pathologies cutanées



*Foulongne et al., Br J Dermatol 2009;05:16272-7.*

# MCC: origine infectieuse probable ?

---

- **Séroprévalence > 70% avec acquisition précoce du virus dans la vie**

*Tolstov et al., Int J Cancer 2009; 125:1250-6.*

*Kean et al., PLOS Pathogens 2009; 5, e1000363.*

*Pastrana et al., PLOS Pathogens 2009; 5, e1000578.*

*Touzé et al., L Clin Microbiol 2010; ahead of print.*

- **Comparable avec séroprévalence des autres polyomavirus humains BK, JC...**



# MCPyV et portage cutané?

# Résultats

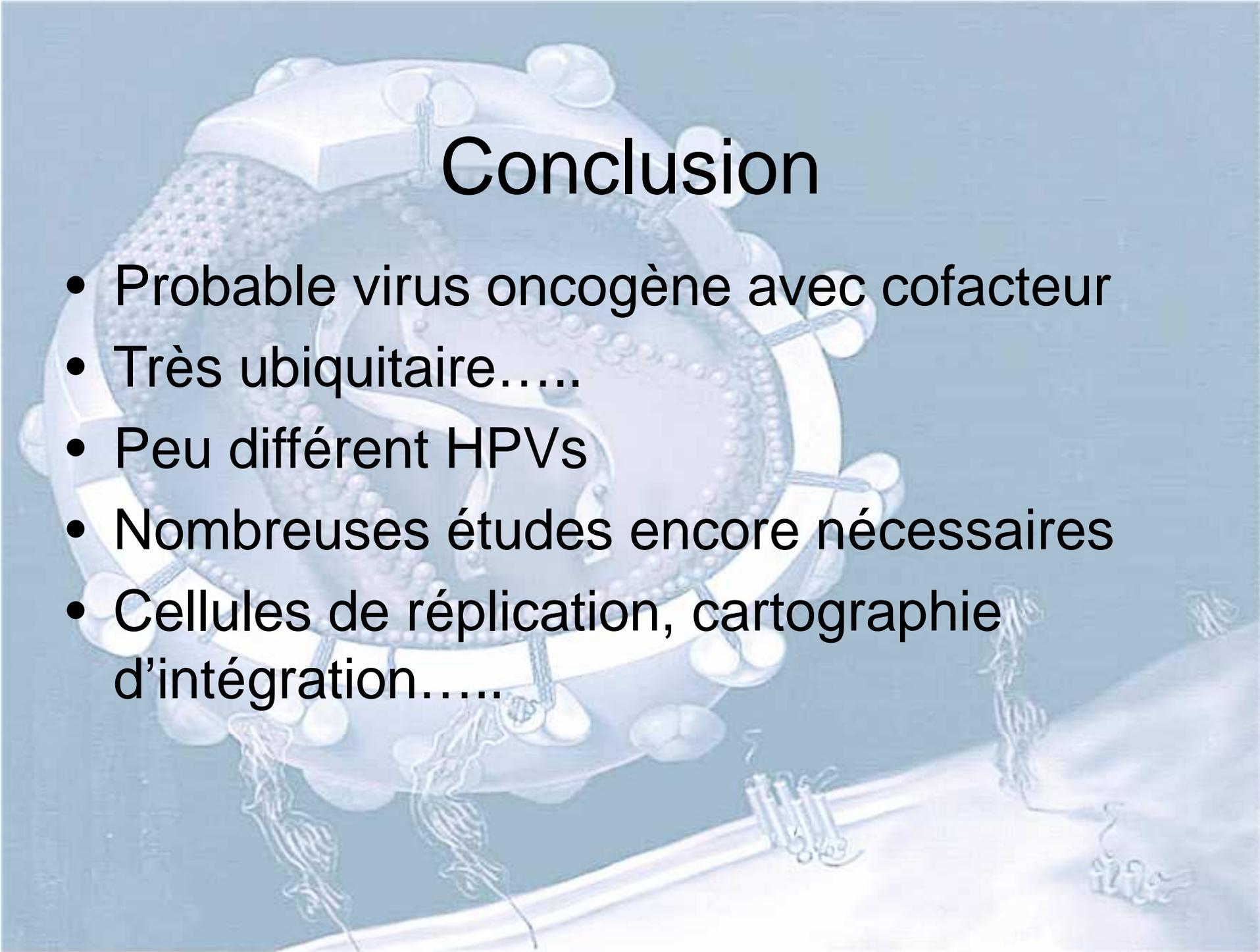
Samples	Merkel cell carcinoma (n = 5)	Other skin diseases <sup>*</sup> (n = 16)	Healthy individuals (n = 25)
Buccal swabs	1/5	0/13	1/24
Cutaneous swabs			
Overall	27/29	58/78	56/70
Face	6/6	14/16	23/25
Trunk	11/11	16/20	13/16
Upper limb	1/2	10/15	9/14
Lower limb	7/8	10/15	11/15
Lesional skin	2/2	8/12	-

<sup>\*</sup> Patients with Kaposi sarcoma (n = 6), cutaneous drug side-effect (n = 3), leg ulcer (n = 3), bullous pemphigoid (n = 2), psoriasis (n = 1), and mycosis fungoide (n = 1).

**Visage: 91,5%**

**Tronc: 85% (P < 0.01)**

**Membres: 70%**



# Conclusion

- Probable virus oncogène avec cofacteur
- Très ubiquitaire.....
- Peu différent HPVs
- Nombreuses études encore nécessaires
- Cellules de réplication, cartographie d'intégration.....

# Et encore des nouveaux!!!

Cell Host & Microbe

## Short Article

### Merkel Cell Polyomavirus and Two Previously Unknown Polyomaviruses Are Chronically Shed from Human Skin

Rachel M. Schowalter,<sup>1</sup> Diana V. Pastrana,<sup>1</sup> Katherine A. Pumphrey,<sup>1</sup> Adam L. Moyer,<sup>1</sup> and Christopher B. Buck<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Tumor Virus Molecular Biology Section, Laboratory of Cellular Oncology, National Cancer Institute, Bethesda, MD 20892-4263, USA

\*Correspondence: buckc@mail.nih.gov

DOI: 10.1016/j.chom.2010.05.006

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS PATHOGENS

### Discovery of a New Human Polyomavirus Associated with *Trichodysplasia Spinulosa* in an Immunocompromized Patient

Els van der Meijden<sup>1</sup>, René W. A. Janssens<sup>2</sup>, Chris Lauber<sup>1</sup>, Jan Nico Bouwes Bavinck<sup>3</sup>, Alexander E. Gorbalenya<sup>1</sup>, Mariet C. W. Feltkamp<sup>1\*</sup>

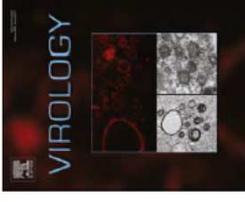
<sup>1</sup>Department of Medical Microbiology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands, <sup>2</sup>Department of Dermatology, Jeroen Bosch Hospital, 's-Hertogenbosch, The Netherlands, <sup>3</sup>Department of Dermatology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands



Contents lists available at ScienceDirect

## Virology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yviro](http://www.elsevier.com/locate/yviro)



### Isolation and characterization of a novel putative human polyomavirus

Tarik Gheit<sup>a</sup>, Sankhadeep Dutta<sup>a</sup>, Javier Oliver<sup>a</sup>, Alexis Robitaille<sup>a</sup>, Shalaka Hampras<sup>b</sup>, Jean-Damien Combes<sup>a</sup>, Sandrine McKay-Chopin<sup>a</sup>, Florence Le Calvez-Kelm<sup>a</sup>, Neil Fenske<sup>c,d</sup>, Basil Cherpelis<sup>c,d</sup>, Anna R. Giuliano<sup>e</sup>, Silvia Franceschi<sup>a</sup>, James McKay<sup>a</sup>, Dana E. Rollison<sup>b</sup>, Massimo Tommasino<sup>a,\*</sup>



<sup>a</sup> International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon 69372, France

<sup>b</sup> Department of Cancer Epidemiology, Moffitt Cancer Center, Tampa, FL, USA

<sup>c</sup> Department of Dermatology & Cutaneous Surgery, University of South Florida, Morsani College of Medicine, Tampa, FL, USA

<sup>d</sup> Department of Cutaneous Oncology, Moffitt Cancer Center, Tampa, FL, USA

<sup>e</sup> Center for Infection Research in Cancer, Moffitt Cancer Center, Tampa, FL, USA



# Metagénomique et description du microbiome humain

- Human virome
- Exemple de la peau: Très nombreux HPVs et nombreux HPyVs (MCPyV, HPyV6, HPyV7.....)
- « Flore cutanée virale » .....?????