

Analyse du microbiote dans un laboratoire diagnostic : définitions, applications et aspects qualité

Gilbert Greub, Marta Rosikiewicz et Claire Bertelli.

Introduction

Durant ces 10 dernières années, plusieurs nouvelles technologies ont été introduites dans les laboratoires diagnostiques permettant d'obtenir plus d'informations, plus rapidement. Outre le MALDI-TOF, introduit dans la plupart des laboratoires en 2009, et l'automatisation qui s'est étendue progressivement des laboratoires de sérologie aux laboratoires de biologie moléculaire et de microbiologie classique (microscopique et culture), l'avènement du séquençage à haut débit a également permis d'obtenir plus d'informations sur la composition microbienne dans un champ donné et ce de manière suffisamment rapide et fiable pour devenir un outil de l'arsenal diagnostique. A Lausanne, nous avons développé la génomique bactérienne et l'analyse du microbiote dès le début de l'année 2012 et avons pu accréditer notre laboratoire de génomique bactérienne et métagénomique cette année. Cet effort d'accréditation nous a permis d'établir les applications diagnostiques du séquençage à haut débit et de définir précisément les protocoles d'analyse.

Définitions

Le microbiote est l'ensemble des microorganismes vivant dans un écosystème donné et le terme microbiome fait référence à tout leur matériel génétique. Il existe différentes manières d'analyser la diversité microbienne par séquençage à haut débit. De manière simple, il existe 2 types principaux de séquençage à haut débit pour l'analyse de la composition microbienne : avec et sans amplification par PCR (Table 1). Dans cet article, nous allons nous concentrer sur l'analyse du microbiote basé sur l'amplification par PCR également appelé métagénomique ciblée ou sur amplicon. Le terme métagénomique devrait être réservé au séquençage de l'ensemble du matériel génétique présents dans un échantillon donné, également appelé métagénomique directe ou métagénomique shotgun.

Table 1. Analyse de la diversité microbienne par séquençage à haut débit (métagénomique sensu lato).

Avec amplification PCR	Sans amplification PCR
Métagénomique ciblée ou sur amplicon	Métagénomique directe
	Métagénomique shotgun
	Métagénomique (sensu stricto)
Composition microbienne limitée à un type de microorganisme, le plus souvent les bactéries	Composition microbienne en bactéries, virus, champignons et parasites.
Résultats limités au profil microbien	Informations sur la diversité microbienne, mais également sur les compétences métaboliques, le résistome et le virulome des microbes présents dans l'échantillon
Analyse peu coûteuse	Coûteux, analyse plus complexe

Les applications principales de l'analyse de la diversité microbienne en microbiologie clinique

Historiquement, la microbiologie visait principalement à identifier la présence de microbes pathogènes dans un échantillon clinique afin de déterminer l'agent étiologique d'une infection. Cette application est l'une des plus communes puisqu'en analysant le microbiote basé sur les amplicons obtenus par une PCR ciblant l'ARN ribosomal 16S, il est possible d'appliquer le principe de la PCR eubactérienne également à des échantillons non physiologiquement stériles, une démarche auparavant complexe. En effet, lors de flores mixtes, une étape de clonage des amplicons était nécessaire pour observer l'ensemble de la diversité microbienne, une étape coûteuse, longue et donc réservée à des applications en recherche. L'analyse du microbiote en utilisant diverses PCR plus spécifiques ciblant des gènes conservés et discriminants (*rpoB* ou *gltA* par exemple) va se développer dans les laboratoires diagnostiques et pourrait progressivement supplanter la PCR eubactérienne classique suivie d'un séquençage Sanger.

Les autres applications de la métagénomique clinique modifient totalement la perception de notre spécialité puisque nos clients ne sont plus uniquement des médecins en charge d'infections (intensivistes, urgentistes, pédiatres, infectiologues, ...), mais également des spécialistes s'occupant principalement de maladies non infectieuses (endocrinologues,

diabétologues, dermatologues, ...). En effet, l'analyse du microbiote digestif par exemple pourrait être utile pour mieux prendre en charge des patients souffrant d'obésité et/ou de diabète de type 2 (1). L'analyse du microbiote cutané pourrait permettre aux dermatologues de préciser la physiopathologie de certaines maladies telle la dermatite atopique ou le psoriasis et peut-être d'envisager de nouvelles thérapies. L'analyse du microbiote cutané pourrait également être utile pour identifier les germes colonisant la peau chez des patients souffrant de brûlures étendues et aider au choix du traitement empirique lors de signes cliniques et paracliniques d'infections non contrôlées. De même, l'analyse du placenta et/ou de frottis vaginaux lors d'épisodes de fausses couches, pourrait permettre aux obstétriciens d'identifier un éventuel agent étiologique de fausses couches et de prévenir des fausses couches récurrentes. L'analyse du microbiote digestif pourrait également aider les oncologues à mieux comprendre les effets sur notre flore des chimiothérapies et des nouvelles immunothérapies employées aujourd'hui. Enfin, comme décrit dans l'un des articles de ce numéro (2), l'identification d'individus basée sur la composition salivaire est une nouvelle application dans le domaine de la criminologie, qui permet la prise d'échantillons mal préservés sur une scène de crime (vu la meilleure persistance de l'ADN bactérien par rapport à l'ADN humain, notamment pour les bactéries Gram positif). Une autre application de l'analyse du microbiote en criminologie consiste à préciser si un corps retrouvé immergé est issu d'une noyade ou a été immergé après le décès (par exemple pour camoufler un crime).

Ainsi, comme le montre les exemples susmentionnés, les applications de l'analyse du microbiote en microbiologie clinique sont vastes et ne vont cesser de croître ces prochaines années. Toute la question sera de bien définir les analyses qui seront suffisamment fiables, reproductibles et dont l'interprétation sera suffisamment aisée pour être proposées en routine diagnostique. Dans ce contexte, il est indispensable que ces diverses futures applications quittent le domaine de la recherche et soit progressivement implémentés par des microbiologistes cliniques qui incluent dans leurs approches une réflexion sur les aspects préanalytiques, analytiques et post-analytiques en terme de qualité.

Aspects qualité

Dans le cadre d'une étude récente effectuée à Lausanne, neuf selles par sujet ont été étudiées de manière sérielle chez quatorze sujets subissant des restrictions diététiques et une exposition à des probiotiques mélangés à du yogourt ou à du lait acidifié, et ce de manière cross-over avec des périodes de wash-out (3). Le nombre significatif d'échantillons

provenant des mêmes sujets nous a permis d'analyser l'impact de nombreux facteurs qui influencent le microbiote observé ; principalement, l'extraction d'ADN, les bases de données et les méthodes bioinformatiques d'analyse. Ainsi, la méthode d'extraction de l'ADN du kit Macherey-Nagel s'avère bien meilleur pour extraire l'ADN de firmicutes et d'actinobacteria, par rapport au kit Qiagen (Figure 1). Comme le montre la figure 2, les bases de données influencent considérablement les résultats. De plus, l'un des pipelines nous a permis de grouper précisément l'ensemble des échantillons en fonction des sujets (chaque sujet est représenté par une couleur différente). En revanche, un autre pipeline, en l'occurrence celui proposé par défaut par Illumina, permettait une moins bonne discrimination des divers échantillons appartenant au même sujet (Figure 3). S'il est difficile de conclure en l'absence d'étalon, cette simple analyse démontre toutefois l'impact majeur de l'outil bioinformatique utilisé. Ainsi, les laboratoires de microbiologie diagnostique doivent établir précisément les limites des pipelines et doivent garantir la traçabilité du pipeline utilisé. En utilisant les selles de 3 sujets (005, 013 et 009) de la même étude (3), nous avons également pu montrer (figure 3) l'impact majeur des bases de données utilisées pour classer les séquences 16S obtenues. En conséquence, les laboratoires proposant des analyses de métagénomique doivent soigneusement évaluer l'impact des procédures et des différents pipelines bioinformatiques sur les résultats observés et déterminer la fiabilité des résultats dans des contextes cliniques définis.

Conclusions

Le séquençage à haut débit est une révolution récente dans la microbiologie diagnostique qui permet d'entrevoir de nombreuses nouvelles applications dont l'analyse du microbiote par séquençage de gènes conservés. Ces nouvelles technologies nous permettent d'acquérir rapidement d'importantes masses de données, d'où leur connotation de « big data », mais représentent une révolution technologique qui nécessite l'adaptation des compétences de nos microbiologistes cliniques et de nos équipes. Afin d'avoir les bioinformaticiens nécessaires à l'analyse fine des données, nous avons initié il y a quelques années à Lausanne un cycle d'enseignement de l'analyse microbiologique des données issus du séquençage à haut-débit, et ce dans le cadre de travaux pratiques dispensés au niveau Master à l'école de biologie (4). Cet enseignement, d'ailleurs couronné du « Biology teaching award de la Faculté de Biologie et Médecine », a porté ses fruits et nous permet aujourd'hui d'avoir la masse critique de bioinformaticien-ne-s. Nous avons par ailleurs passablement travaillé sur les aspects formels en préparant des directives et procédures

dans notre système de documents d'accréditation (système v-doc) pour les différentes étapes listées dans la table 2.

Table 2 : Etapes d'analyse du microbiote par métagénomique sur amplicon ou métagénomique directe.

N°	Étapes
1	Indication du test
2	Échantillonnage (type d'échantillons, modalités de prélèvement, stockage, délais)
3	Extraction d'ADN
4 *	Amplification par PCR (gène ciblé, ...)
5	Type de séquençage (Illumina, PacBio, ...)
6	Analyses bioinformatiques (type de pipeline, bases de données,...)
7	Validation technique des séquences obtenues
8	Validation biomédicale et interprétation des résultats.
* Uniquement pour la métagénomique sur amplicon	

Cette révolution apportée par le séquençage à haut débit et notre nouvelle capacité à analyser le microbiote rapidement impactent considérablement la pratique des microbiologistes cliniques étendant notre réseau en dehors des médecins impliqués dans la gestion des infections et nous donne l'opportunité d'interagir avec des spécialistes de branches variées, y compris certains avec lesquels nous avions peu d'interactions jusqu'alors. Cependant cette révolution nécessite également que l'on définisse précisément les protocoles et que l'on développe des contrôles de qualité adéquats. Enfin cela nécessite le développement de nouvelles compétences, une capacité de management du changement, et le mentoring de jeunes microbiologistes cliniques (5).

Références.

1. Somm E, Henry H, Bruce SJ, Aeby S, Rosikiewicz M, Sykiotis GP, Asrih M, Jornayvaz FR, Denechaud PD, Albrecht U, Mohammadi M, Dwyer A, Acierno JS Jr, Schoonjans K, Fajas L, Greub G, Pitteloud N. β -Klotho deficiency protects against obesity through a crosstalk between liver, microbiota, and brown adipose tissue. *JCI Insight*. 2017 Apr 20;2(8). pii: 91809.
2. Scherz V, Bertelli C, Palmiere C, Taroni F, G Greub. Microbiote et médecine forensique : une nouvelle évidence ? *Pipettes* 2018, **ce numéro**
3. Burton KJ, Rosikiewicz M, Pimentel G, Bütikofer U, von Ah U, Voirol MJ, Croxatto A, Aeby S, Draï J, McTernan PG, Greub G, Pralong FP, Vergères G, Vionnet N. Probiotic yogurt and acidified milk similarly reduce postprandial inflammation and both alter the gut microbiota of healthy, young men. *Br J Nutr*. 2017 May;117(9):1312-1322.
4. Bertelli C, Aeby S, Chassot B, Clulow J, Hilfiker O, Rappo S, Ritzmann S, Schumacher P, Terrettaz C, Benaglio P, Falquet L, Farinelli L, Gharib WH, Goesmann A, Harshman K, Linke B, Miyazaki R, Rivolta C, Robinson-Rechavi M, van der Meer JR, Greub G. Sequencing and characterizing the genome of *Estrella lausannensis* as an undergraduate project: training students and biological insights. *Front Microbiol*. 2015 Feb 19;6:101.
5. Opota O, Greub G. Mentor-mentee relationship in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect*. 2017 Jul;23(7):448-453.

Figure 2. Clustering du microbiote d'échantillons séquentiels de selles de sujets en bonne santé. Le microbiote est relativement constant chez un individu en l'absence de traitement antibiotique ou d'intervention majeure. Ainsi, suivant l'approche bioinformatique utilisée, les échantillons d'un sujet se regroupent comme attendu (ici, méthode basée sur les OTUs avec USEARCH et QIIME) ou se retrouvent mélangé (pipeline par défaut proposé par Illumina).

Chaque couleur représente les échantillons d'un individu.

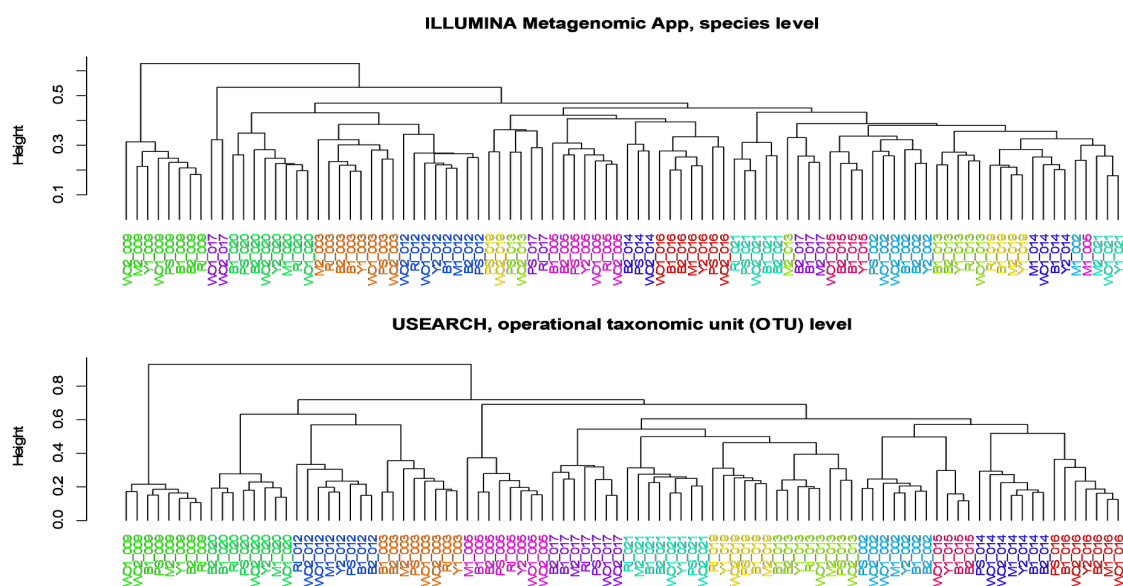


Figure 3. La diversité microbienne de 3 individus a été analysée à l'aide de 3 bases de données différentes : Greengenes, Silva et Illumina. Les résultats sont largement différents démontrant l'impact majeur de la base de donnée utilisée sur le résultat d'analyse de diversité microbienne.

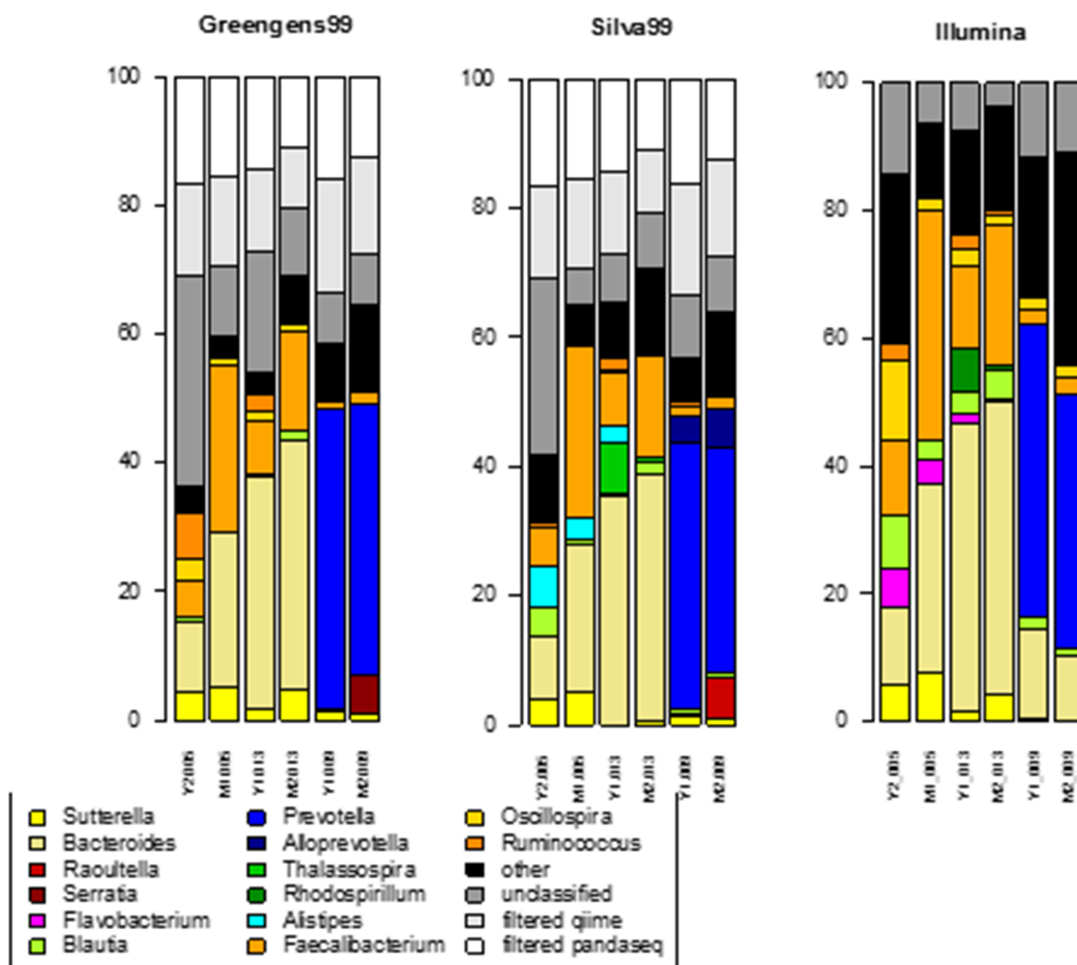


Figure 1. Comparaison de la quantité de divers microbes après 2 types d'extraction d'ADN. La supériorité du kit Macherey-Nagel pour l'extraction de l'ADN de Firmicutes (triangles rouges) et d'Actinobacteria (carré bleus) par rapport au kit Qiagen est significative (plus d'un log de différence). En revanche, les deux méthodes sont similaires pour les Bacteroidetes.

