

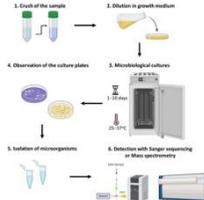
Techniques “NGS” pour la caractérisation des microbiotes

Jacques Ravel, PhD
Professor of Microbiology and Immunology
Center for Advanced Microbiome Research and Innovation
Institute for Genome Sciences
University of Maryland School of Medicine
javel@som.umaryland.edu



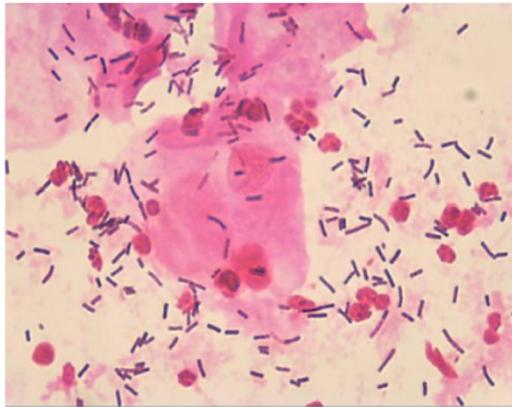
Définitions

NGS: Next Generation Sequencing or “Séquençage de nouvelle generation”

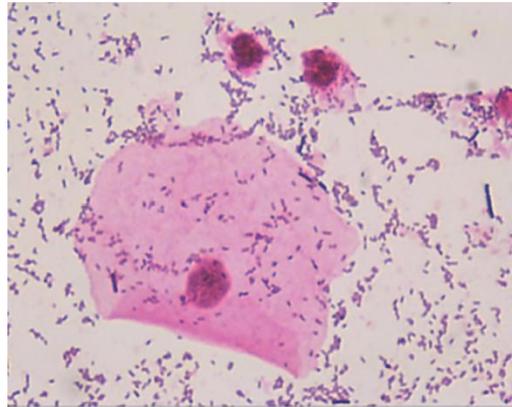


Pourquoi utiliser le séquençage de nouvelle génération pour caractériser le microbiome?

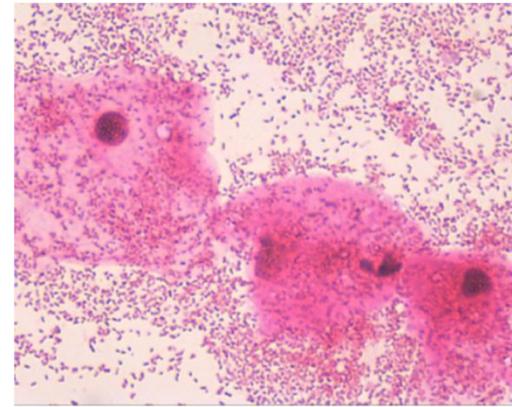
Remplacer les méthodes diagnostiques microbiologiques (culture) ou microscopiques (comme la coloration de Gram et le score de Nugent) pour établir un diagnostic des conditions vaginales cliniques (par exemple, la vaginose bactérienne ou la vaginite aérobie) avec plus de précision, et améliorer la stratégie de traitement en étant potentiellement personnalisé.



Optimal

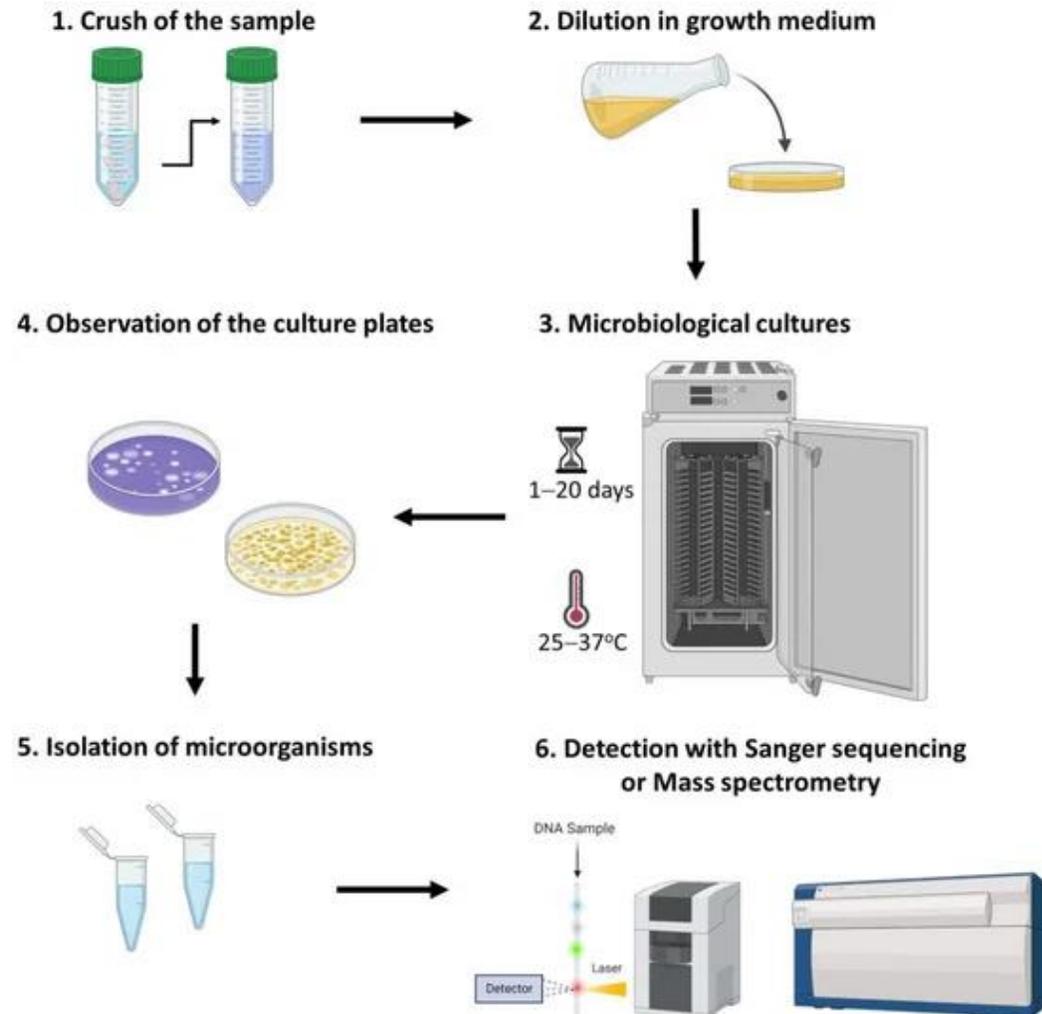


Intermédiaire



Vaginose bactérienne

Culture Microbienne



Culture : manque d'exhaustivité (de nombreux microbes ne sont pas cultivables), approche semi-quantitative, nécessitant du séquençage ou de la spectrométrie de masse pour l'identification microbienne.

Pouvons-nous faire mieux ?

Caractérisation des microbiotes par séquençage de nouvelle génération: *les methodes*

Deux types d'analyses utilisant le séquençage de nouvelle génération pour caractériser le microbiote :

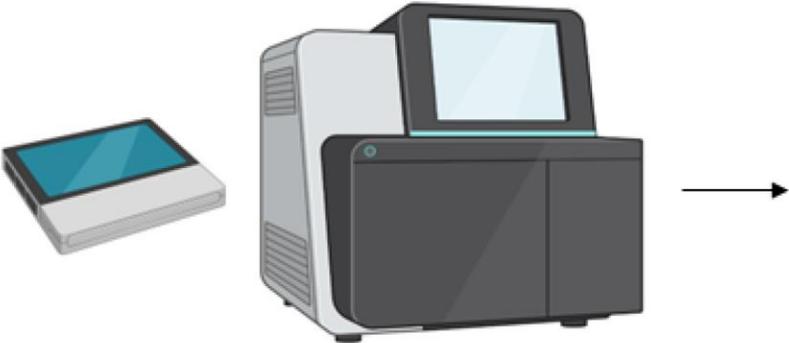
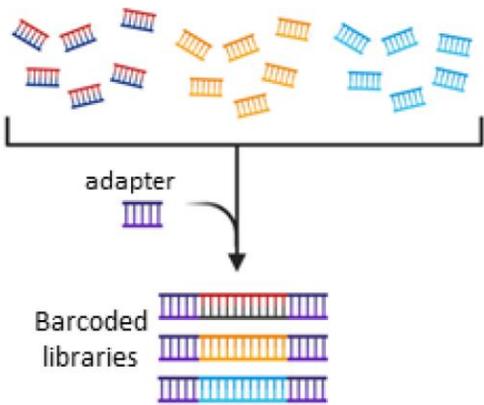
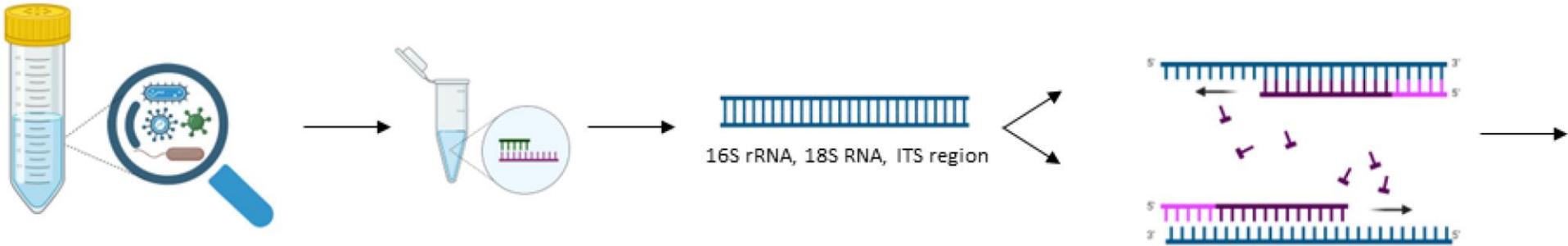
1. Séquençage d'amplicons PCR des gènes d'ARN ribosomal 16S/18S ou ITS
2. Séquençage métagénomique

Chaque méthode présente des avantages et des inconvénients et permet de répondre à des questions différentes.

Il est essentiel que le clinicien comprenne les limites de ces technologies afin d'interpréter avec précision leur validité et leur valeur clinique.

Séquençage d'amplicons PCR

- 1** Collecte d'échantillons
- 2** Extraction d'ADN
- 3** Amplification à l'aide d'amorces spécifiques



Séquençage d'amplicons PCR

Régions génomiques ciblées: Gene d'ARN ribosomal 16S, 18S, l'ITS ou le gene *cpn60*

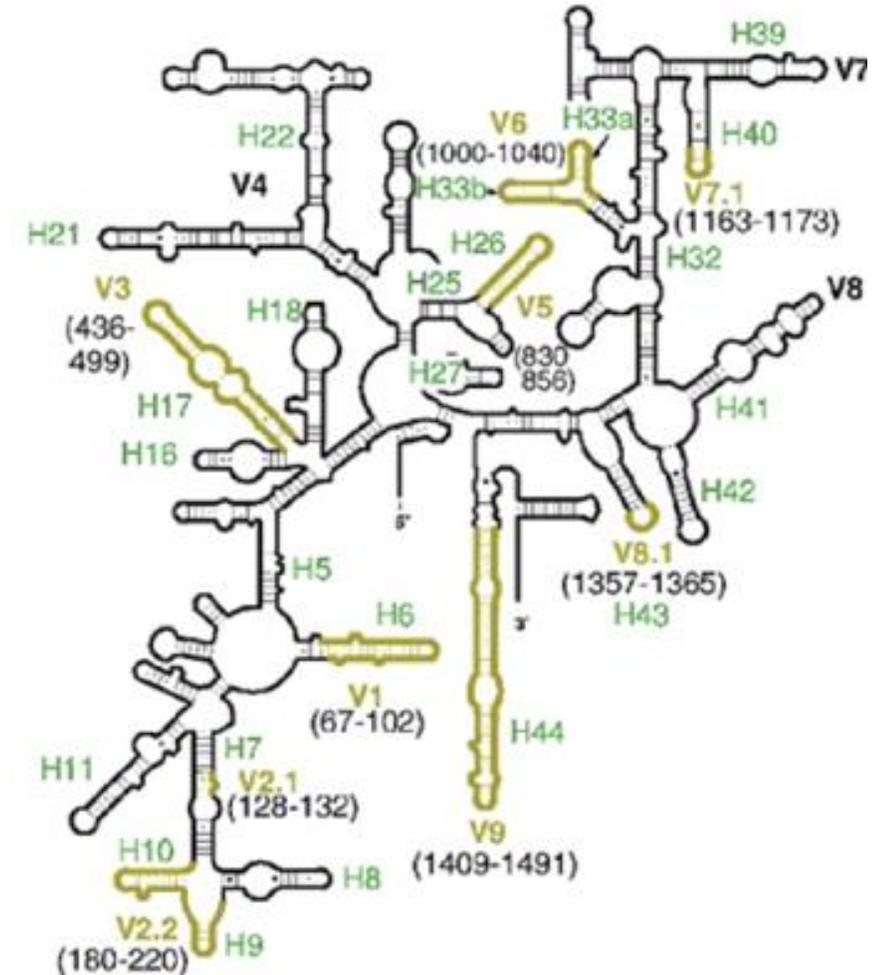
Pourquoi ces regions?

Les sequences de ces régions sont uniques pour chaque microbe.

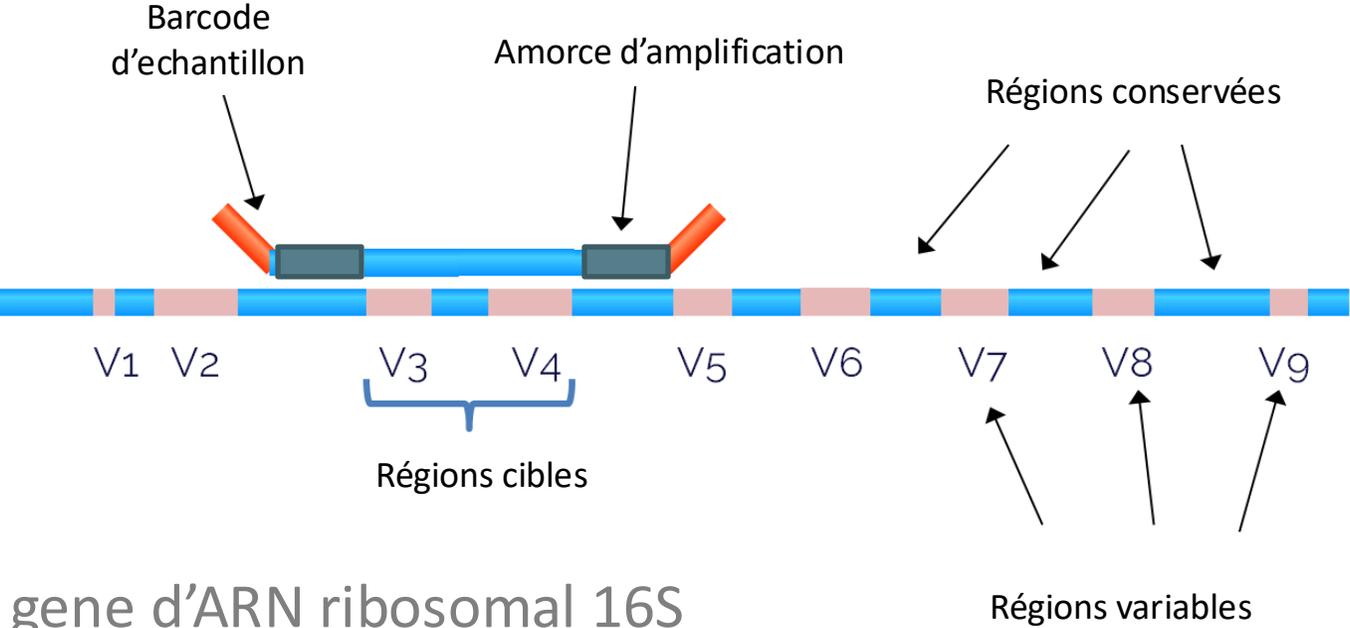
- Gène d'ARNr 16S : ~1,5 kb - spécifique aux bactéries

Séquençage d'amplicons PCR – Le gène d'ARN 16S

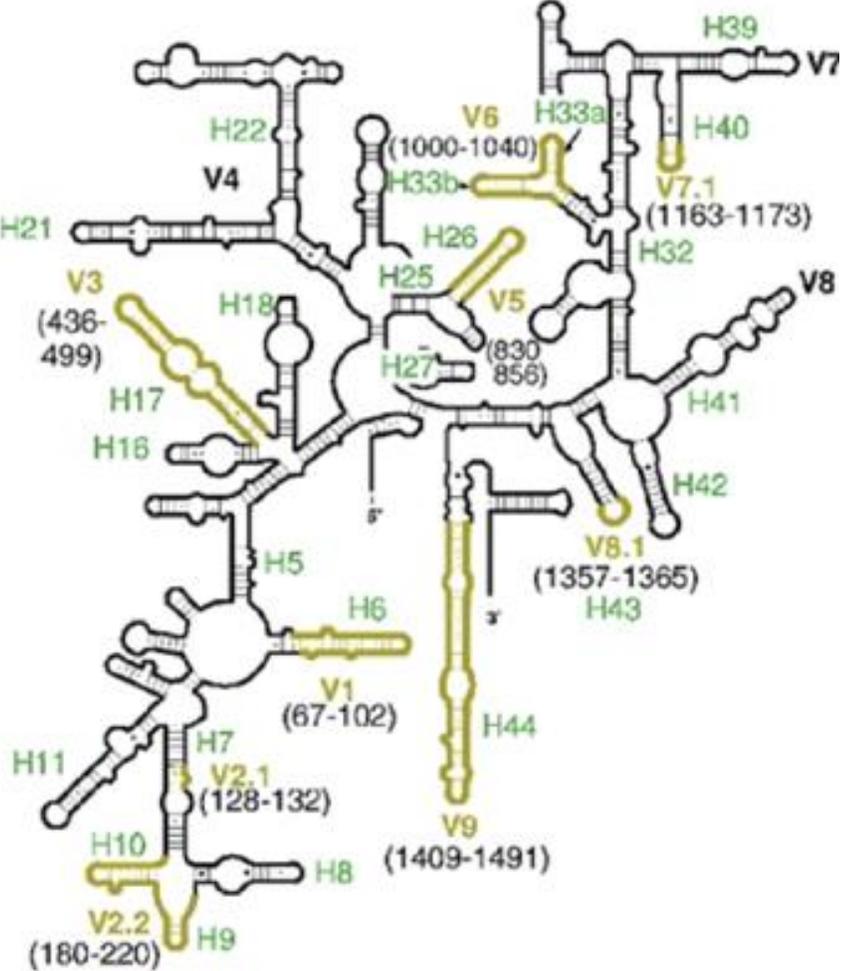
- Le ribosome est composé de protéines et d'ARN structuraux. L'ARNr 16S fait partie de la petite sous-unité du ribosome des bactéries et des archées.
- Le gène d'ARNr 16S possède des régions conservées et variables. Les régions conservées sont utiles pour la conception d'amorces PCR, et les régions variables sont utiles pour la taxonomie et la phylogénie.



Séquençage d'amplicons PCR – Le gène d'ARN 16S

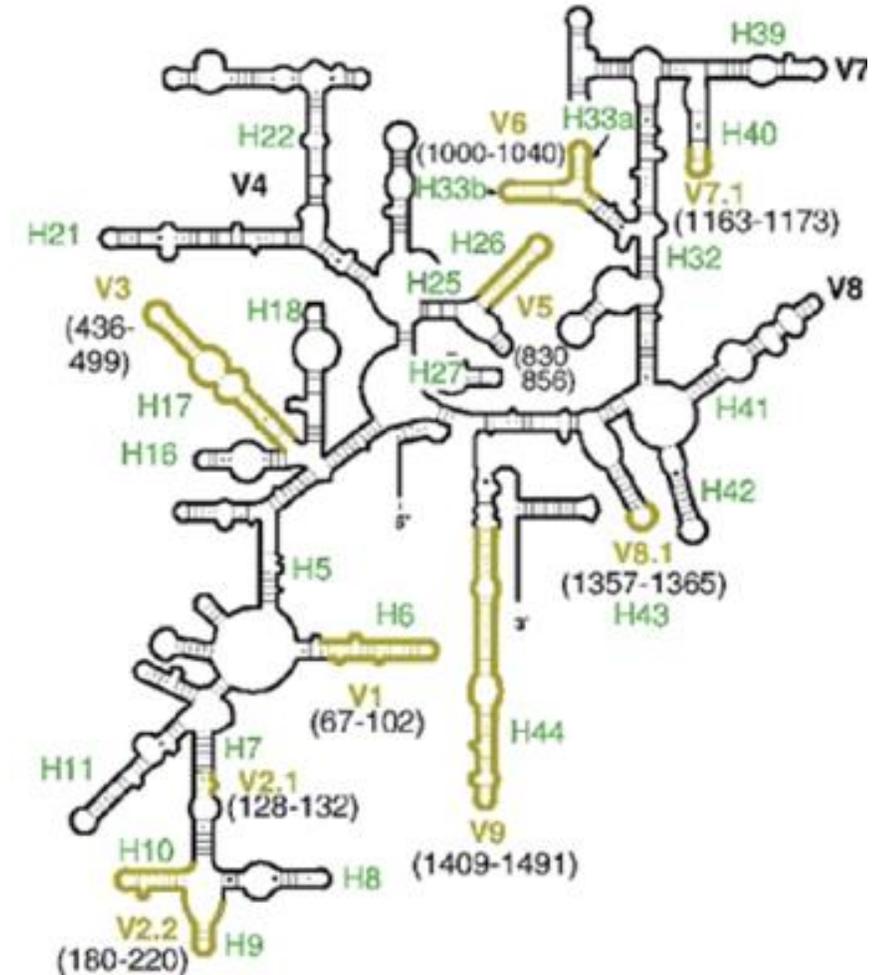


Le gene d'ARN ribosomal 16S



Séquençage d'amplicons PCR – Le gène d'ARN 16S

- Le ribosome est composé de protéines et d'ARN structuraux. L'ARNr 16S fait partie de la petite sous-unité du ribosome des bactéries et des archées.
- Le gène d'ARNr 16S possède des régions conservées et variables. Les régions conservées sont utiles pour la conception d'amorces PCR, et les régions variables sont utiles pour la taxonomie et la phylogénie.
- C'est comme une carte d'identité bactérienne.



Séquençage d'amplicons PCR

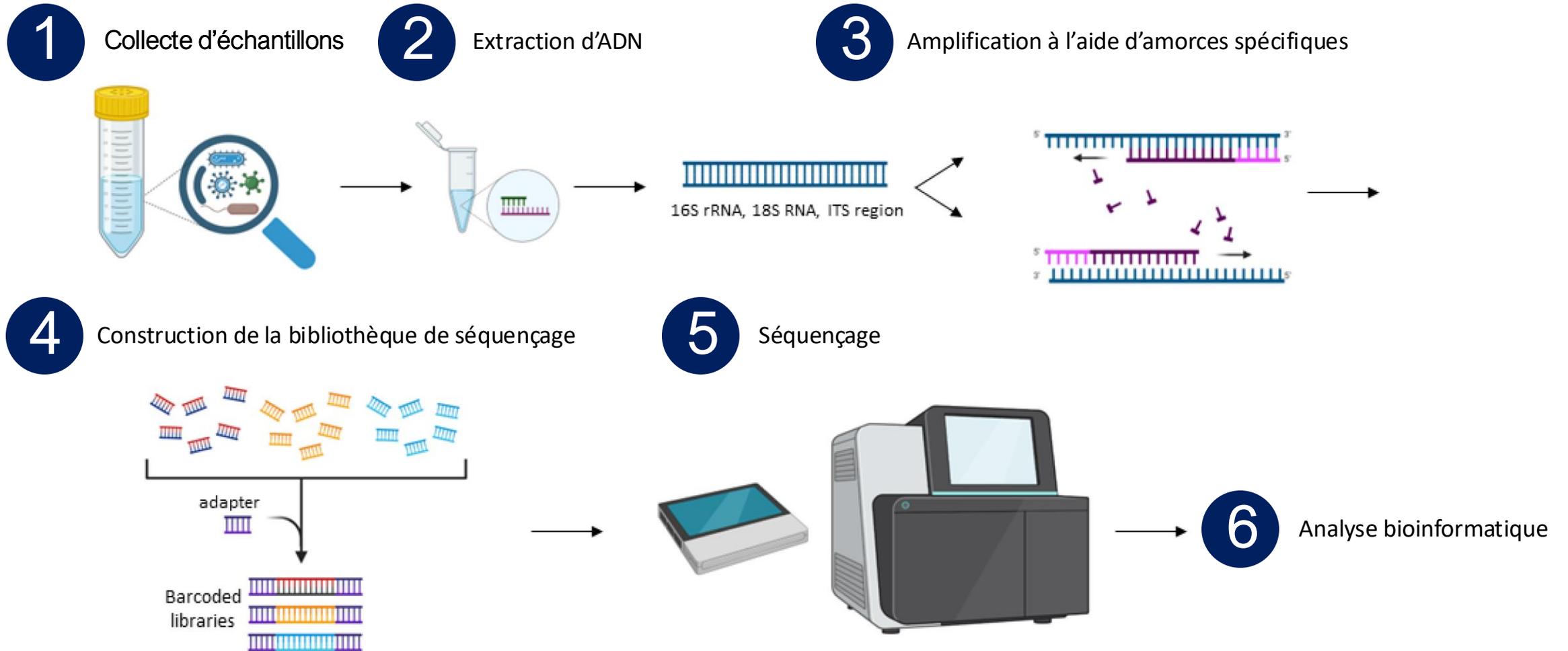
Régions génomiques ciblées: Gene d'ARN ribosomal 16S, 18S, l'ITS ou le gene *cpn60*

Pourquoi ces regions?

Les sequences de ces régions sont uniques pour chaque microbe.

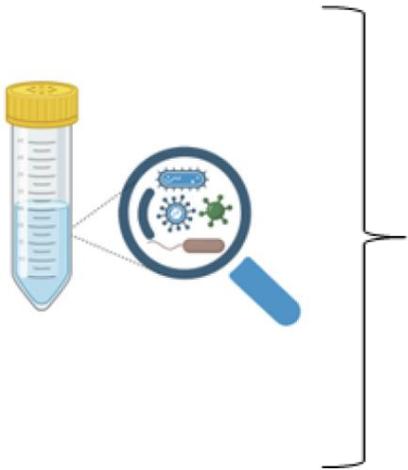
- Gène d'ARNr 16S : ~1,5 kb - spécifique aux bactéries
- Gène d'ARNr 18S : spécifique aux eucaryotes (champignons, parasites, humain)
- ITS : L'espaceur interne transcrit (ITS) est non codant et situé entre les ARNr SSU et LSU. La région ITS1 est très utilisée et varie de 50 à 350 pb et se trouve entre les gènes de l'ARNr 18S et de l'ARNr 5.8S.

Séquençage d'amplicons PCR

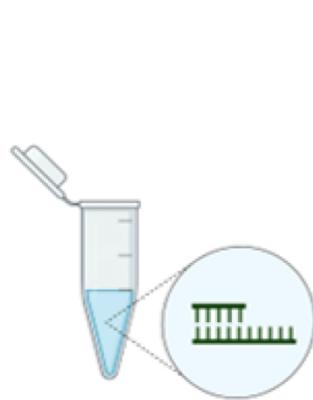


Séquençage métagénomique

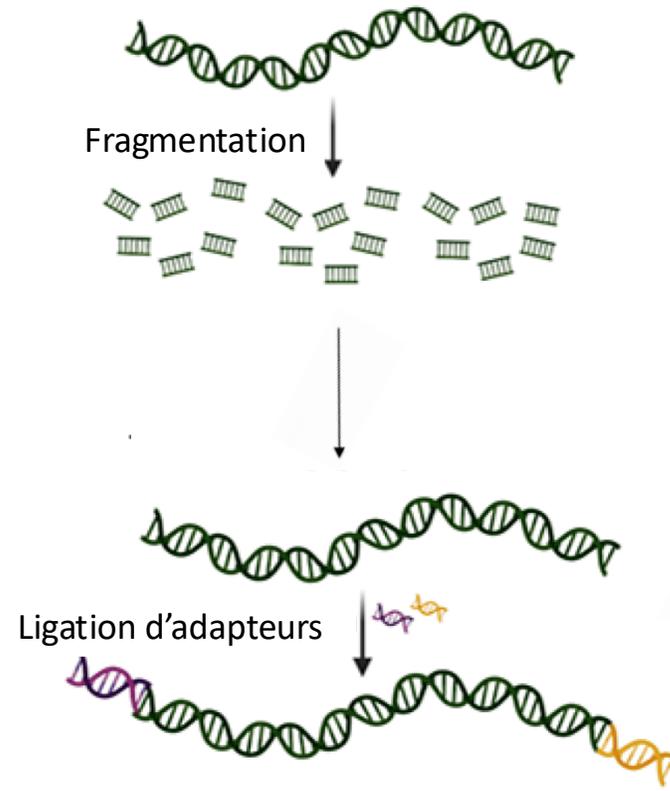
1 Collecte d'échantillons



2 Extraction d'ADN



3 Construction de la bibliothèque de séquençage



5 Analyse bioinformatique



4 Séquençage

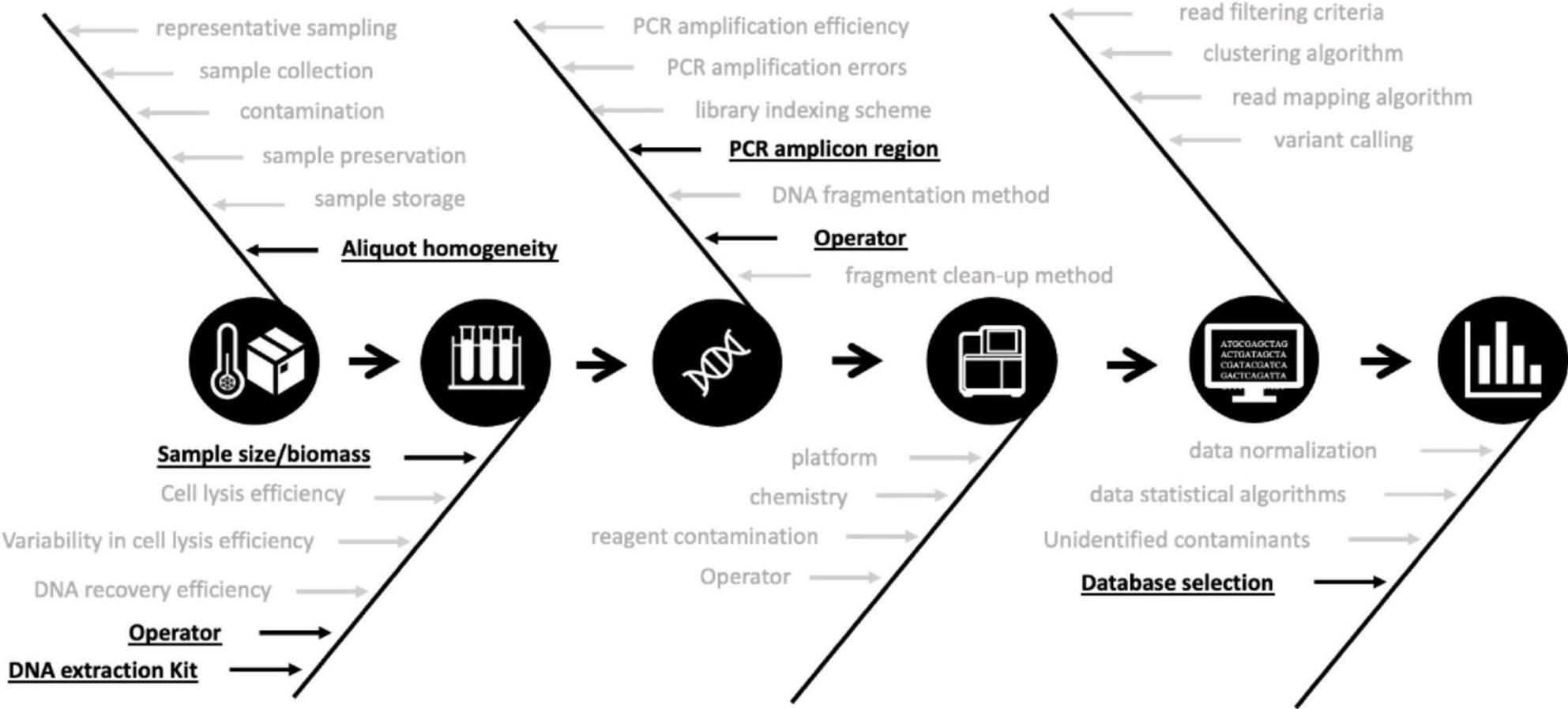
Séquençage métagénomique

- La métagénomique détermine le contenu en gènes et génomes d'un microbiote en séquençant l'ADN génomique total.
- Elle permet d'évaluer la composition et l'abondance relative du microbiome.
- Elle aide à comprendre le potentiel fonctionnel d'un microbiome à partir des génomes reconstruits des membres du microbiote, par exemple, **la présence de gènes de résistance aux antibiotiques** ou de **gènes associés à la pathogénicité** (toxines, etc.).
- Évaluation des souches microbiennes

Comparaison des méthodes d'analyse "NGS" du microbiote

	Séquençage d'amplicons PCR	Séquençage métagénomique
Ce qui est séquencé	Gene d'ARN 16S, 18S ou l'ITS	ADN de l'hôte et microbien
Résolution taxonomique	Phylum – Genus – Species possible	Species et souches microbiennes
Couverture taxonomique	Bacteria, archaea (16S); eucaryotes (18S/ITS)	Bacteria, archaea, eucaryotes, Viruses ADN
Base de données de references pour taxonomie	Oui, >3 million sequences pour le gene de l'ARNr 16S, moins pour 18S et ITS	Oui, base de données de genomes bacteriens (moins pour eucaryotes et virus)
Contamination par des séquences de l'hôte	Limitée	Oui (limite la couverture microbienne, augmente le cout)
Profil fonctionnel (ex. : résistance aux antibiotiques))	Non	Oui
Potential de biais?	Oui, choix d'amorces, regions ciblées,ou amplification PCR	Non, méthode non-ciblée
Temps d'analyse	Plusieurs jours, voir semaines ((dépend du nombre d'échantillons analysés en même temps)	Plusieurs jours, voir semaines (dépend du nombre d'échantillons analysés en même temps)

Où sont les risques de biais?



Évaluation des performances d'analyses microbiotes commerciales

Evaluating the Analytical Performance of Direct-to-Consumer Gut Microbiome Testing Services

Stephanie L. Servetas¹, Diane Hoffmann², Jacques Ravel^{3,4}, Scott A. Jackson¹

¹Complex Microbial Systems Group, National Institute of Standards and Technology (NIST), Gaithersburg, MD, USA.

²University of Maryland School of Law, Baltimore, MD, USA.

³Institute for Genome Sciences, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD, USA.

⁴Department of Microbiology and Immunology, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD, USA.

Company	Sampling Method	Sampling Tool ³	Storage buffer (Y/N)	Library Prep Method ⁴	Read length ⁴	Total Reads (M, Million; K, thousand) ⁴	Species Identified ⁵
A	swipe over TP	 a	N	16S (V3-4)	300		
B	swipe over TP	 b	N	16S (V4)	variable		
C	swipe over TP	 c	Y	16S (V4)	150		
D	swipe over TP	 a	N	WGS	151		
E	Proprietary collector; Insert coring brush in 10-12 areas	 d	Y	WGS	151		
F ¹	Proprietary collector; 1-2mL liquid; 10-12 areas in solid stool	 d	Y	WGS	151		
G ²	Proprietary collector; swipe collectors along pad	 e,f	Y/N	WGS	Data not provided		

Évaluation des performances d'analyses microbiotes commerciales

Evaluating the Analytical Performance of Direct-to-Consumer Gut Microbiome Testing Services

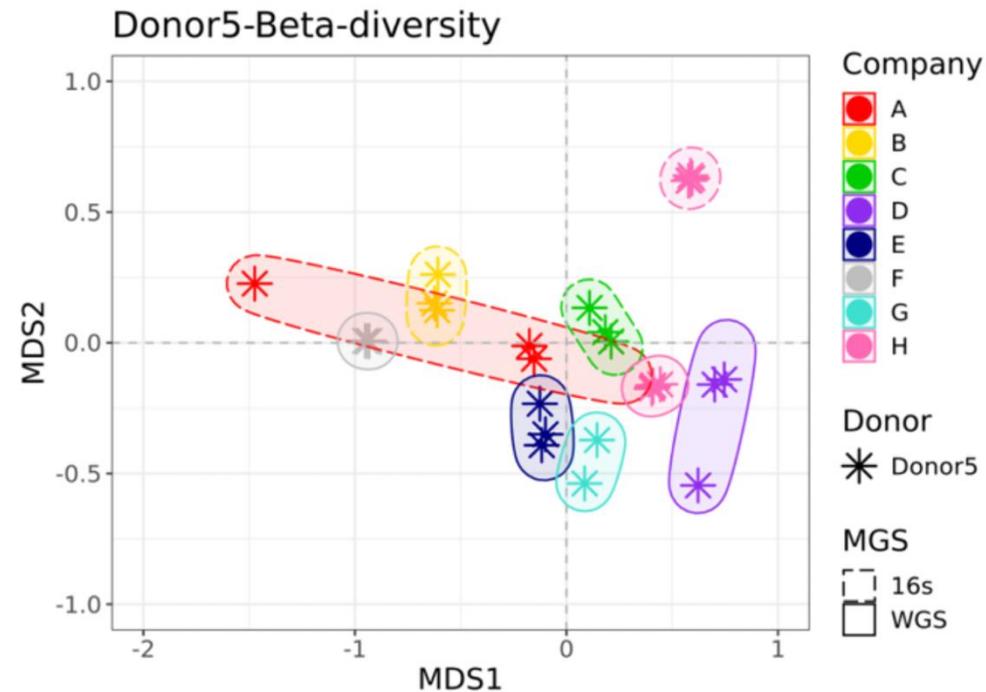
Stephanie L. Servetas¹, Diane Hoffmann², Jacques Ravel^{3,4}, Scott A. Jackson¹

¹Complex Microbial Systems Group, National Institute of Standards and Technology (NIST), Gaithersburg, MD, USA.

²University of Maryland School of Law, Baltimore, MD, USA.

³Institute for Genome Sciences, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD, USA.

⁴Department of Microbiology and Immunology, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD, USA.



Résultats

Your Microbiome At-a-Glance

Protective Score
Indicates what percent of your microbiome is made up of protective bacteria. Higher scores are better!

0%

Very low Good

You have a **low amount** of protective bacteria. These bacteria protect you against infections and other health outcomes, so you may want to focus on increasing these levels (and your Evvy plan can show you how!)

Disruptive Score
Indicates what percent of your microbiome is made up of disruptive bacteria. Lower scores are better!

96%

Good Very High

You have a **high amount** of disruptive microbes. Research suggests these can be associated with vaginal symptoms and infections, so it might be helpful to decrease these levels (and your Evvy plan can show you how!)

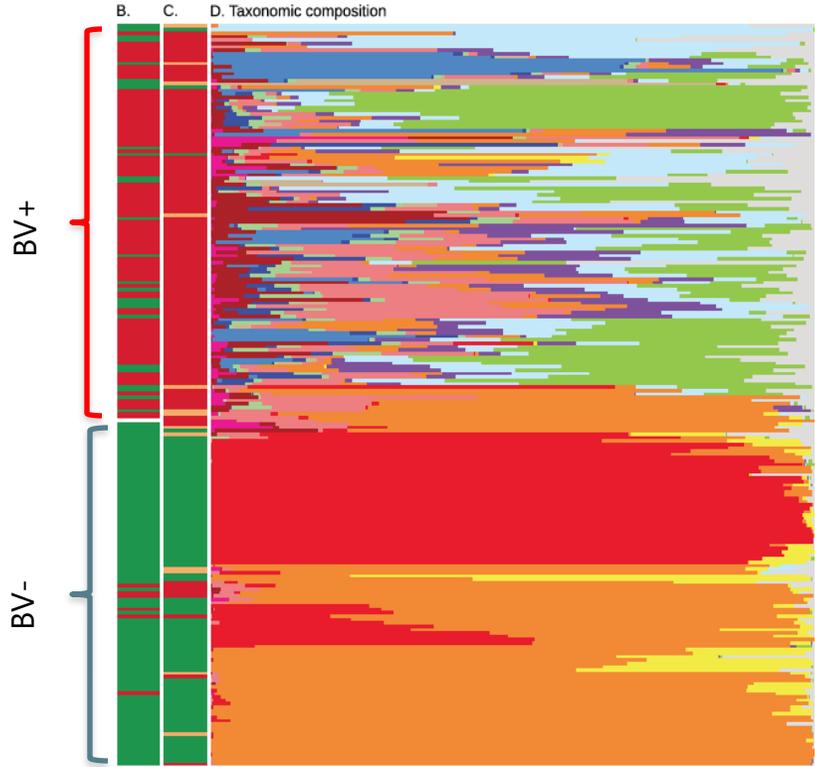
Your Detailed Results

Select a tag to view your microbes related to:

GOOD HEALTH BACTERIAL VAGINOSIS
AEROBIC VAGINITIS YEAST INFECTION UTI

Gardnerella swidsinskii	32.59%
Gardnerella vaginalis	22%
Gardnerella piotii	13.42%
Fannyhessea (Atopobium) vaginae	10.44%
Prevotella bivia	7.91%
Gardnerella leopoldii	6.25%
Megasphaera lorae	3.25%
Coriobacteriaceae	2.48%
Lactobacillus iners	1.67%

● Protective ● Disruptive
● Variable ● Unknown



L'avenir des analyses du microbiote en médecine

- **Interprétation des résultats** : C'est l'un des problèmes les plus importants.

L'interprétation repose sur des publications ayant établi des associations entre la présence de certains microbes et une maladie. Toutefois, ces associations ont été déterminées à l'aide de méthodes différentes et ne sont donc pas toujours valides, compte tenu du niveau de variabilité inhérente à ces analyses.

- **Validation clinique** : Il est essentiel de valider l'analyse et son potentiel diagnostique à l'aide d'essais cliniques rigoureux. Sans ces validations, ces tests n'ont pas d'avenir en médecine.

Techniques “NGS” pour la caractérisation des microbiotes

Questions?