

## **Analyse du microbiote intestinal bactérien par séquençage de l'ADNr 16s**

### **Caractérisation du microbiote intestinal: un enjeu technique**

Mettre en évidence l'implication du microbiote intestinal dans certaines fonctions biologiques, et estimer l'impact de son altération dans la physiopathologie, nécessite au préalable de le caractériser de façon fiable et précise.

**Pour décrire un écosystème, il est impératif d'identifier et de quantifier les organismes qui le composent.**

L'analyse du microbiote intestinal trouve alors tout naturellement une place de choix dans un parcours de soin.

### **Un processus complexe**

**Différentes étapes et de nombreuses contraintes techniques jalonnent sa caractérisation.**

Chacune de ces étapes fait appel à une technique spécifique dont la maîtrise garantit la qualité des résultats obtenus.

**C'est pourquoi, le processus global de production de l'information doit répondre à un ensemble de procédures dites standardisées qui limitent les risques de biais de lecture.**

### **Une avancée considérable**

Jusque dans les années 1980, déterminer la composition du microbiote intestinal bactérien était limitée aux seules bactéries cultivables, soit 30% environ.

**Surmonter cette limite devait donc passer par des approches indépendantes de la culture.**

Dans les années 1970, le microbiologiste Américain Carl Woese démontre que l'**ARN ribosomal bactérien** permet d'identifier la bactérie auquel il appartient, et de la positionner dans la phylogénie du vivant. La phylogénie étant l'étude des liens de parenté entre les êtres vivants et ceux qui ont disparus.

L'ARN ribosomal est comparée à une **horloge moléculaire**, et devient le témoin des liens de parenté entre les bactéries.

L'ADN ribosomal 16s quant à lui devient le **marqueur universel** pour étudier les relations évolutives entre les espèces bactériennes.

**Des séquences ADNr16s spécifiques sont alors attribuées à des groupes bactériens, à l'image d'une carte d'identité, ou encore d'un code barre.**

Pour rappel, la séquence ADN est l'ordre dans lequel s'enchaînent les bases nucléotidiques qui la composent.

Cette avancée technologique permet de déterminer l'identité d'une bactérie grâce à son matériel génétique, et de s'affranchir enfin des techniques de mise en culture.

**L'émergence des techniques de biologie moléculaire révèle toute l'importance et la complexité de l'écosystème intestinal, et dévoile la partie restée encore immergée de l'iceberg.**

### Analyse de l'échantillon: plusieurs options possibles

Pour analyser le contenu d'un échantillon deux stratégies sont fréquemment utilisées: l'amplification par PCR du gène ADNr 16S appelée aussi Metabarcoding, et la métagénomique shotgun.

### Amplification PCR du gène d'intérêt ADNr16s

Après avoir collecté l'échantillon de selles, l'ADN en est extrait, puis le gène cible ADNr 16s est amplifié par PCR (*Polymerase Chain Reaction*), avant d'être séquencé.

Une séquence ADNr 16s est constituée de **régions similaires** à toutes les bactéries et de **régions variables spécifiques** à chacune d'entre elles.

Les **régions conservées** servent à concevoir les **amorces universelles** pour amplifier et séquencer le gène cible, les **régions variables** servent à **distinguer les bactéries** entre elles.

L'utilisation de la PCR a favorisé la création d'une base de données de séquences spécifiques d'ADNr 16s à partir d'ADN extrait d'écosystèmes complexes. C'est à cette base de données que les séquences générées par la PCR seront comparées dans un second temps.

**La PCR universelle 16s utilisée dans ce contexte devient avec le temps, un outil de détection et d'identification bactérienne robuste et fiable, et reste à ce jour la plus utilisée pour décrire les écosystèmes complexes.**

### Shotgun

Cette stratégie de séquençage vise à séquencer l'ensemble du matériel ADN présent dans l'échantillon. Son avantage principal réside donc dans son analyse intégrale de l'écosystème microbien, incluant les bactéries, les archées, les virus, les champignons.

Cependant, l'énorme quantité d'informations générées est complexe à traiter, interpréter, et augmente considérablement le coût de l'analyse.

Dans l'objectif de limiter son coût, certains laboratoires proposent une variante dénaturée appelée Shallow Shotgun. Cette dernière consiste à diminuer la profondeur d'analyse, donc la quantité de données générées.

**Résultat, le Shallow Shotgun comme son nom l'indique, n'est plus que l'ombre du Shotgun classique.**

La perte de profondeur analytique fait perdre l'intérêt majeur de cette technique censée donner accès à l'ensemble du génome.

### **Séquençage à haut débit**

Une fois le matériel génétique bactérien amplifié par PCR ou Shotgun, l'étape de lecture des différentes séquences obtenues peut débuter.

Depuis les années 2000, l'avènement du séquençage à haut débit permet de lire plusieurs millions de séquences en parallèle, à partir de concentrations d'ADN initiales relativement faibles, en réduisant fortement le coût de séquençage.

**La PCR ou l'analyse Shotgun ajoutée à la lecture de l'ADN par séquençage à haut débit permet de caractériser l'écosystème à un instant T en évaluant sa composition, ainsi que le potentiel fonctionnel des différents microorganismes qui le composent.**

### **Conclusion**

Les progrès technologiques ont permis le développement et l'application de méthodes d'analyse de la composition du microbiote intestinal humain, notamment le metabarcoding PCR 16s et la métagénomique Shotgun.

Ces analyses permettent toutes deux de définir le profil taxonomique intestinal bactérien d'une personne et son potentiel fonctionnel pour la santé de l'hôte.

La technique de PCR et de séquençage du gène bactérien 16s a l'avantage d'être éprouvée, fiable et moins coûteuse. L'analyse Shotgun en ciblant l'ensemble du génome de l'échantillon augmente considérablement le coût de l'analyse, la rendant quasi inaccessible dans sa forme optimale, à l'usage du grand public.