



Le séquençage à haut débit dans le diagnostic microbiologique

Maxime Pichon, Laurence Delhaes

► To cite this version:

Maxime Pichon, Laurence Delhaes. Le séquençage à haut débit dans le diagnostic microbiologique. Revue Francophone des Laboratoires, 2022, 2022 (541), pp.60-66. <10.1016/S1773-035X(22)00137-X>. <hal-03657282>

HAL Id: hal-03657282

<https://hal.science/hal-03657282v1>

Submitted on 2 May 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

Le séquençage à haut débit dans le diagnostic microbiologique

Maxime Pichon^{a,b,c,*}, Laurence Delhaes^{d,e}

a Centre hospitalier universitaire de Poitiers, département des agents infectieux, laboratoire de bactériologie et hygiène hospitalière, 2 rue de la Milétrie, 86021 Poitiers cedex, France

b Université de Poitiers, faculté de médecine et pharmacie, 6 rue de la Milétrie, 86073 Poitiers cedex, France

c Inserm U1070, Pharmacology of antimicrobial agents and antibioresistance (Phar 2), 1 rue Georges-Bonnet, 86022 Poitiers cedex, France

d Service de parasitologie-mycologie, hôpital Pellegrin, centre hospitalier universitaire de Bordeaux, place Amélie-Raba-Léon, 33076 Bordeaux cedex, France.

e Inserm U1045, plateforme technologique d'innovation biomédicale (PTIB), hôpital Xavier-Arnoz, avenue du Haut-Lévêque, 33600 Pessac, France

*Auteur correspondant.

Adresse e-mail : maxime.pichon@chu-poitiers.fr (M. Pichon).

RÉSUMÉ

Les applications du séquençage haut débit (NGS) en santé se sont récemment démocratisées, d'abord en recherche puis en microbiologie clinique. L'utilisation du NGS a surtout des applications en bactériologie et mycologie, principalement basées sur les marqueurs phylogénétiques documentés (régions hypervariables du 16S, 18S, ou 28S) permettant, par métataxonomie, de décrire les variations physiopathologiques des microbiotes. En métagénomique non ciblée, la comparaison des données de séquençage de génomes complets à des banques de données internationales permet de détecter une antibiorésistance génomique, souvent corrélée au phénotype de résistance. De même, différentes stratégies d'étude des facteurs de virulence ont été développées pour comparer les génomes des souches isolées en clinique à des souches de référence et ainsi analyser les îlots génomiques. Le NGS a aussi montré son efficacité à déterminer une chaîne de transmission interindividuelle, afin de remonter au patient source ou d'améliorer la prise en charge collective. L'approche métagénomique a permis de rechercher l'agent étiologique d'une infection. Malgré la prise en compte par des structures comme le Comité français d'accréditation, l'absence de standardisation limite le développement en routine de ces approches, en particulier du fait des besoins en bioinformatique.

MOTS CLÉS

- infectiologie
- microbiologie
- séquençage génome entier
- séquençage à haut débit
- séquençage nouvelle génération

KEYWORDS

- high throughput sequencing
- infectiology
- microbiology
- next generation sequencing
- whole genome sequencing

ABSTRACT

High throughput sequencing in microbiological diagnosis

The applications of next-generation sequencing (NGS) in health have recently become more widespread, at first in research studies and then in clinical microbiology. The use of NGS has mainly been developed in bacteriology and mycology, especially based on phylogenetic markers (hypervariable regions of rDNA 16S, 18S, or 28S) which allow by metataxonomy, to describe the physiopathological variations of microbiota. By non-targeted metagenomics approaches, the comparison of whole genome NGS data to international databases allows the detection of genomic antimicrobial resistance which is often correlated with the resistance phenotype. Similarly, different strategies to study virulence factors have been developed to compare the genomes of clinical isolates to reference strains and thus to analyze genomic islands. NGS has also shown its efficiency in determining an inter-individual transmission cluster, to identify the source patient or to improve collective management, to search for the etiological agent of an infection.

Even though structures such as the Cofrac have taken NGS into account, the lack of standardization limits the routine development of these approaches, due to the need for bioinformatics.



Dossier scientifique

Nouvelles approches de biologie moléculaire infectieuse

► Introduction

Apparu au début des années 2000, le séquençage à haut débit dit « de nouvelle génération » (*next generation sequencing*, ou NGS) s'est propagé depuis 2010-2015, avec une véritable explosion des publications en rapport avec, tout d'abord, la génomique humaine et la cancérologie, la microbiologie n'arrivant que dans un deuxième temps. Recoupant la métagénomique et la métataxonomie (ou « métagénomique ciblée » ou « métagénétique »), les applications microbiologiques du NGS se sont rapidement démocratisées, initialement pour des approches dans le domaine de la recherche scientifique puis, à l'instar des autres technologies innovantes, ont été déclinées en microbiologie clinique. En effet, le diagnostic du ou des pathogènes responsables de la présentation clinique est l'une des étapes les plus cruciales de la prise en charge des maladies infectieuses. En parallèle, l'avènement des approches NGS a permis de mieux appréhender et étudier les microbiotes humains des différents sites (tractus digestif et respiratoire, cutanéomuqueux...) et leur pathologie qu'est la dysbiose.

Après une brève introduction sur les principes et contextes de l'utilisation du NGS en microbiologie, les principales applications à courte et à plus longue échéance de ces technologies à la microbiologie médicale seront présentées, ainsi que l'impact du NGS sur la prise en charge thérapeutique en infectiologie.

► Du séquençage Sanger au séquençage massif en parallèle

Le séquençage à haut débit s'avère être une véritable révolution de la biologie moléculaire reposant sur les performances bio-informatiques démultipliées depuis la découverte, historique, du séquençage par Frederick Sanger en 1977 [1]. La caractérisation du premier génome bactérien (*Haemophilus influenzae*, en 1995, après plus d'une année de travail et un million de dollars) a permis de mettre en avant l'utilité de connaître un génome entier, pour appréhender efficacement les propriétés des micro-organismes, dont les règnes sont immenses [2].

En complément des technologies de biologie moléculaire ciblée qui gardent leur intérêt dans de nombreuses situations bien particulières, les approches métagénomiques (ciblées ou non) apportent un complément d'information permettant d'appréhender l'implication suspectée, mais quelquefois non prouvée,

des micro-organismes bactériens, parasitaires, fongiques et/ou viraux dans la physiopathologie des maladies infectieuses mais aussi non-infectieuses.

Ainsi depuis sa démocratisation, le NGS a montré son utilité dans les situations cliniques causées par des micro-organismes non- ou difficilement cultivables (bactéries intracellulaires ou bactéries anaérobies strictes, infection par *Pneumocystis jirovecii* [3]). Toutefois, il est évident que celui-ci reste à ce jour une méthode complémentaire des approches de microbiologie conventionnelle – examen direct et cultures microbiologiques – et/ou de biologie moléculaire classique, et non un remplacement de celles-ci.

► Quelles places actuellement pour le NGS ?

Identification de pathogènes

Le NGS en microbiologie regroupe des approches de séquençage ciblées (métataxonomie, applicable essentiellement en bactériologie et mycologie-parasitologie) et non ciblées (métagénomique, applicable dans tous les champs de la microbiologie). Basé sur les marqueurs phylogénétiques documentés que sont les régions hypervariables de l'ADN ribosomique (ADNr) 16S pour les bactéries, et ITS (*Internal transcribed spacers*, régions intergéniques de l'opéron ribosomique), ou ADNr 18S ou 28S pour les micromycètes ou les parasites, le séquençage multi-parallélisé en métataxonomie du locus universel de la communauté étudiée permet d'en analyser la composition et la diversité. Il fonctionne sans *a priori* mais de façon suboptimale, notamment en cas de prélèvements plurimicrobiens. Mais cette approche métataxonomique n'est pas applicable pour les virus, ceux-ci n'ayant pas de gènes « universels ». La métagénomique non ciblée – approche de type « pathogen discovery » par métagénomique – permet quant à elle de détecter, identifier et caractériser un micro-organisme responsable d'une infection non documentée par des techniques classiques de microbiologie, mais reste une approche longue, coûteuse et difficile d'interprétation, réservée à l'identification de pathogènes lors d'un diagnostic étiologique de dernier recours réalisé actuellement dans des laboratoires spécialisés (impasses diagnostiques dans le cadre d'encéphalites, d'infections ostéo-articulaires, d'endocardites ou de pneumopathies...).

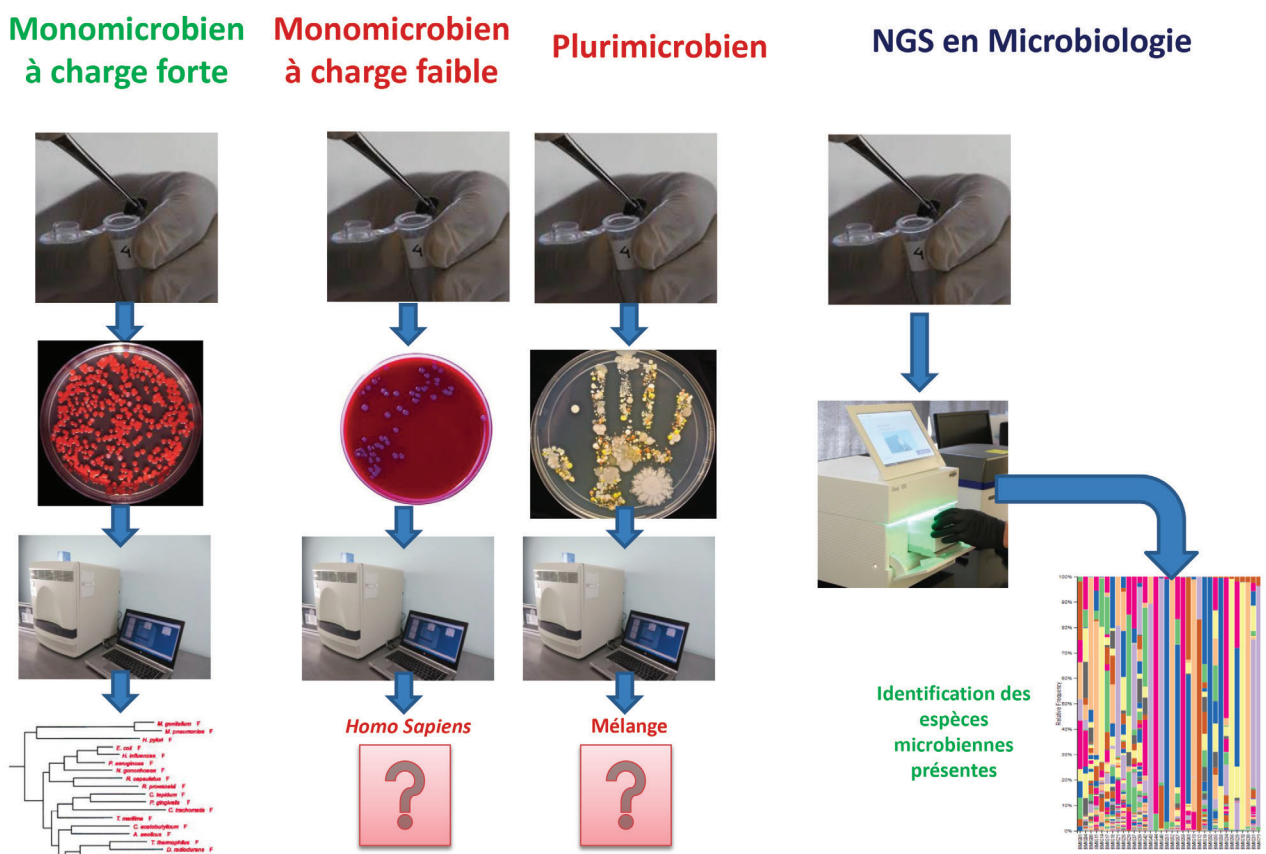
Le séquençage à haut débit dit « de nouvelle génération » regroupe des approches de séquençage ciblées et non ciblées

Par ailleurs, l'approche métagénomique ne permet pas de phénotyper mais d'appréhender l'état physiologique du micro-organisme ainsi que sa résistance prévisible (antibiogramme génomique ou résistome) aux thérapeutiques anti-infectieuses (**figure 1**).

Il faut garder à l'esprit que, comme toute technique de microbiologie moléculaire, le séquençage par NGS n'est pas une technique d'une sensibilité absolue. Cet état de fait peut sembler paradoxal, du fait de la très grande quantité de données générées par unité de temps et d'expérimentation par les séquenceurs de deuxième et de troisième génération mais il a été clairement établi que celles-ci peuvent être moins sensibles que les techniques d'amplification des acides nucléiques ciblées (PCR ciblées par exemple). Ainsi, dans une situation à faible charge microbienne mais en présence de quantité de cellules eucaryotes importantes, l'analyse NGS ne

permettra de mettre en évidence que le génome de l'hôte, spécialement en cas d'approche métagénomique non ciblée. De même, et ce bien que de meilleures performances de discrimination aient été observées en comparaison au séquençage conventionnel, les espèces microbiennes présentes en plus faible concentration pourront ne pas être détectées, ce qui est susceptible de poser des problèmes dans des situations d'analyse de prélèvements polymicrobiens comme les prélèvements respiratoires, digestifs ou cutanés. Il est à noter que la vérification pour chaque échantillon de l'obtention d'un plateau de la courbe de raréfaction (utilisée pour estimer la richesse en espèces d'une communauté écologique) permet d'évaluer la diversité au sein des écosystèmes et d'assurer la qualité/robustesse des résultats obtenus en limitant la sous-estimation des espèces en plus faible concentration en métataxonomie.

Figure 1. Représentation des situations cliniques d'utilisation de la métataxonomie en microbiologie clinique et infectiologie.



En présence d'un échantillon mono-microbien à charge forte (culture pure ou fort inoculum), le séquençage conventionnel ainsi que le NGS permettent une identification précise du microorganisme. À l'inverse, en cas de charge microbienne faible ou d'échantillon plurimicrobien, le séquençage conventionnel se trouve souvent limité, identifiant seulement l'hôte (*Homo sapiens* par exemple) ou le règne du microorganisme (*Bacteria* par exemple). Quelle que soit la situation, le NGS appliqué à la microbiologie permet, en fonction du gène ciblé, d'identifier l'ensemble des microorganismes présents.



Dossier scientifique

Nouvelles approches de biologie moléculaire infectieuse

Détection de l'antibiorésistance

Au cours de ces dernières décennies, la résistance aux anti-infectieux a émergé comme un problème majeur de santé publique [4]. En comparant des données de séquençage génome complet à des banques de données internationales (comme ResFinder [5] ou *Antibiotic resistance genes database*, ARDB [6]), il est possible de détecter une antibiorésistance génomique, souvent corrélée, en cas de détection positive, au phénotype de résistance [7]. Ces approches sont largement utilisées par des laboratoires de référence, en attente de kits commercialisés (de rares kits étant sur le marché à l'heure actuelle), qui permettront l'obtention d'un antibiogramme génomique d'interprétation facilitée et standardisée. Ne pouvant pas, à l'heure actuelle, supplanter les approches d'antibiogrammes par méthode conventionnelle, le NGS permet déjà, dans des situations où l'antibiogramme est difficile, voire impossible à obtenir (délai incompatible avec la prise en charge clinique par exemple), d'orienter la prise en charge thérapeutique du patient [7]. À ce jour, l'analyse de résistome n'a été proposée qu'en bactériologie et en virologie pour la résistance aux anti-viraux, même si de rares études génomiques se sont concentrées sur d'autres micro-organismes comme la détection de la résistance de *Plasmodium*, sans implications thérapeutiques directes en santé pour l'instant [8].

Criblage des gènes de virulence et virulome

Les facteurs de virulence, y compris les toxines bactériennes ou fongiques – l'aflatoxine par exemple – contribuent à la pathogénicité. Identifier les gènes de virulence impliqués dans la physiopathologie d'une maladie est une étape fondamentale pour suivre l'émergence de certaines pathologies. Différentes stratégies ont été développées, comparant les souches isolées cliniquement à des souches de référence de la même espèce (raisonnement par homologie), analyse d'îlots génomiques connus pour héberger des gènes de virulence (îlot de pathogénicité comme CagPAI de *Helicobacter pylori* par exemple) ou comparaison à des banques de données internationales [9].

Plus récemment, la méthode « *Metagenomics genome-phenome association* » (MetaGPA) a été développée pour permettre de relier l'information génétique des métagénomiques à un phénotype fonctionnel défini ou observé [10]. Cette méthode, qui fonctionne de manière similaire aux études d'association pangénomique (*Genome wide association study*, GWAS [11])

utilisées pour identifier les gènes impliqués dans les maladies génétiques humaines, permet de trouver des gènes microbiens associés à un phénotype fonctionnel spécifique d'un échantillon donné, comme trouver de nouvelles enzymes impliquées dans la modification de l'ADN [10]. Cette méthode très prometteuse pourrait être utile dans la caractérisation de virulome spécifique à des situations pathologiques en santé humaine ou animale.

Taxonomie et investigation épidémiologique

Mis à part l'identification de pathogènes et la détermination de la résistance aux anti-infectieux, fondamentaux pour la prise en charge individuelle, les laboratoires de microbiologie sont fréquemment confrontés à des investigations d'épidémies ou cas groupés d'infection. Le NGS a montré l'efficacité de son utilisation en vue de déterminer une chaîne de transmission inter-individuelle, permettant ainsi de remonter au patient source de l'épidémie ou permettant d'améliorer la prise en charge collective en vue d'enrayer l'épidémie.

Une épidémie bactérienne, attribuée à la consommation de graines germées, a défrayé la chronique et a été investiguée par NGS [12]. La bactérie impliquée, *Escherichia coli* sérotype O104:H4, est une souche entérohémorragique rare d'*E. coli*, productrice de Shiga-toxine, connue pour avoir été la cause de l'épidémie de syndromes hémolytiques et urémiques de 2011 en Europe. En séquençant le génome entier de plusieurs isolats provenant des foyers épidémiques allemands et français, une très faible diversité (2 *Single nucleotide polymorphisms*, SNPs) a été retrouvée dans les isolats de quatre individus allemands alors qu'une plus grande diversité (19 SNPs) était observée dans les isolats de sept individus infectés au cours de l'épidémie française. L'analyse phylogénétique montre que les isolats allemands forment un clade au sein des isolats plus divers de l'épidémie française [12].

Un autre exemple concerne l'identification de l'agent viral responsable de la pandémie actuelle comme étant un coronavirus étroitement lié (96,3 % d'homologie) au coronavirus RaTG13 de la chauve-souris par NGS et analyse phylogénétique. Depuis l'émergence en Chine (Wuhan) en décembre 2019 de ce coronavirus-2 du syndrome respiratoire aigu sévère (Sars-CoV-2 responsable de la maladie nommée *coronavirus disease-2019* – Covid-19 –, dénomination proposée par l'Organisation mondiale de la santé), de nombreuses équipes travaillent au séquençage de son génome.

Le NGS permet ,
dans des situations
où l'antibiogramme est
difficile, voire impossible à
obtenir, d'orienter la prise
en charge thérapeutique
du patient

Un génome de référence est désormais disponible dans la base de données génomiques du NCBI (29 903 nucléotides, séquence de référence NCBI : NC_045512.3) et environ 7 655 génomes complets provenant de 67 pays sont disponibles dans la base de données de la *Global initiative on sharing all influenza Data* (Gisaid) [13]. Ils permettent de bien documenter l'évolution de la pandémie, notamment d'identifier les différents variants d'intérêt.

► Quelle est la place à venir, et quelles sont les limites actuelles du NGS ?

À ce jour, deux grandes applications du NGS semblent émerger en microbiologie : d'une part la caractérisation du microbiote en tant que communauté microbienne globale présente dans un site donné qui pourrait devenir un biomarqueur pertinent dans certains contextes cliniques, et d'autre part l'utilisation de la métagénomique non ciblée qui permettrait de résoudre des situations d'impasse diagnostique.

Le microbiote comme biomarqueur clinique

De nombreuses études se focalisent sur les liens entre physiologie, pathologie – infectieuse ou non, aiguë ou non –, et caractéristiques d'un microbiome (qu'il soit gastro-intestinal, respiratoire, cutané, uro-génital ou même parodontal, et qu'il cible la flore bactérienne, et/ou fongique et/ou plus rarement virale). Elles ont vu leur nombre exploser depuis une dizaine d'années avec la généralisation de l'utilisation des séquenceurs à haut débit. Bien que de très nombreux paramètres (comme l'âge, le sexe, le statut hormonal, l'alimentation, le lieu et le mode de vie, le site de prélèvement du microbiote ...) varient entre ces études et les rendent difficilement comparables entre elles, elles ont toutes comme objectif de déterminer des modifications ou déséquilibres de la flore – ou dysbiose – en lien avec les caractéristiques cliniques de la population étudiée, en analysant et comparant les diversités alpha et bêta. L'alpha-diversité étant une mesure de la biodiversité de tout ou partie d'un écosystème, elle désigne le nombre d'espèces présentes dans un échantillon donné et leurs proportions. Pour sa part, la bêta-diversité compare la diversité des espèces entre plusieurs échantillons (écosystèmes ou plusieurs conditions physiopathologiques, par exemple entre sujets sains et malades).

En ce qui concerne les pathologies chroniques non infectieuses, le microbiome gastro-intestinal est étudié de longue date en tant que « flore digestive », dont la caractérisation a pu être grandement facilitée par l'utilisation du NGS. Son déséquilibre, ou dysbiose, a été associé à de nombreuses maladies inflammatoires chroniques (maladie de Crohn et rectocolite

hémorragique), systémiques (diabète de type II, obésité) mais aussi fonctionnelles (syndrome de l'intestin irritable) ou néoplasiques (cancer colorectal, etc.).

À ce jour, c'est probablement l'analyse du microbiome intestinal, notamment l'étude de la composition des communautés microbiennes intestinales et les changements qui s'y opèrent (suivi longitudinal), qui semble être un biomarqueur intéressant pour le diagnostic, la surveillance et la prédiction des maladies intestinales inflammatoires ou cancéreuses, voire des troubles métaboliques [14-16].

Sur le versant infectieux, d'autres microbiomes ont aussi été associés à des pathologies infectieuses comme les vaginoses bactériennes (microbiome génital), les infections dentaires ou gingivales (microbiome oropharyngé) ou respiratoires (colonisation et infection dans la mucoviscidose) [17]. Récemment, quelques études ont montré l'intérêt d'analyser les microbiotes pulmonaires au cours de la mucoviscidose, notamment lors d'exacerbations pulmonaires aiguës [18-20].

La métagénomique non ciblée, une solution aux impasses diagnostiques ?

Plusieurs études rétrospectives ont montré l'intérêt d'une approche de métagénomique non ciblée sans *a priori* de l'ensemble des acides nucléiques d'un échantillon (métagénomique) face à la recherche de l'agent étiologique d'une infection ou d'un sepsis [5]. En particulier, l'identification d'un micro-organisme fongique ou viral par métagénomique dans des échantillons stériles de liquide cébrospinal ou de biopsies peut permettre de poser un diagnostic infructueux avec les méthodes de routine, et donc de modifier la stratégie thérapeutique. De plus, dans de nombreux cas, le délai de diagnostic impacte directement le pronostic de survie du patient ; or une approche métagénomique similaire a été récemment proposée avec un délai d'exécution optimal d'environ six heures [21].

Cependant, identifier un agent pathogène parmi tous les micro-organismes composant la flore microbienne de l'échantillon analysé en métagénomique peut s'avérer complexe. Parmi les perspectives permettant de distinguer les véritables agents pathogènes des commensaux ou contaminants, certains auteurs ont proposé un ratio définissant un potentiel pathogène comme un agent ayant un nombre de séquences issues de la métagénomique 10 fois supérieur à celui de ce même agent dans le contrôle négatif, ou encore une estimation des concentrations absolues de micro-organismes par microlitre de plasma [5]. Ces approches très prometteuses restent pour l'instant du domaine de recherche et développement, car elles nécessitent une très grande expertise non seulement en microbiologie et biologie moléculaire mais aussi, et surtout, en bio-informatique, une grande maîtrise des logiciels et pipelines étant nécessaire à l'analyse efficiente des données de NGS.



Dossier scientifique

Nouvelles approches de biologie moléculaire infectieuse

Quelques freins à l'utilisation du NGS en microbiologie de routine

Au travers de ces exemples, il apparaît que les approches de séquençage à haut débit sont tout à fait complémentaires des méthodes de microbiologie conventionnelles, n'étant pas à même de les remplacer en termes de performances analytiques et logistiques à l'heure actuelle. De plus, l'absence de standardisation de ces approches limite clairement leur développement et usage en routine [5]. Quand bien même ces problématiques seraient résolues, et au vu du coût représenté par ces méthodologies innovantes, il est fondamental de discuter leur positionnement afin de limiter une prescription irrationnelle d'investigations par NGS, à l'instar de ce qui a pu être observé par exemple pour les panels syndromiques et la biologie moléculaire délocalisée.

Le coût de production des données de séquençage à haut débit est en constante diminution, avec une vitesse défiant la loi de Moore, un génome microbien peut maintenant être séquençé en moins d'une journée pour un coût de moins de 100 euros, suivant la plateforme utilisée [22]. Devant la qualité des données générées, leur rapidité de production, l'une des problématiques majeures reste la détermination de l'indication de cette analyse, notamment afin d'en orienter la compréhension bio-informatique.

En parallèle, la démarche qualité en métagénomique et NGS commence à se développer. En effet, le NGS étant de plus en plus présent dans les laboratoires d'analyses biomédicales, notamment en génétique humaine, un groupe de travail réunissant des biologistes médicaux et bio-informaticiens issus de structures privées et publiques, des membres du comité de section et de la commission d'accréditation de la section Santé humaine, des représentants des sociétés

savantes et de l'Agence de la biomédecine, des évaluateurs et experts techniques du Cofrac, spécialisés en NGS, a proposé un guide technique d'accréditation de la technologie de séquençage à haut débit (NGS) adapté aux différents domaines médicaux comme la génétique humaine, l'immunologie cellulaire spécialisée, l'histocompatibilité et la microbiologie [23]. Brièvement, ce document propose que l'analyse par technique NGS soit découpée en différentes étapes depuis l'étape du pré-analytique (réception de l'échantillon) jusqu'aux étapes de post-analytique en incluant les étapes analytiques qui contiennent notamment l'analyse bio-informatique des données [23].

Conclusion

Le développement de la métagénomique en microbiologie est un outil innovant prometteur qui permet :

- d'identifier plus de micro-organismes que les méthodes conventionnelles en une seule analyse ;
- d'obtenir des résultats rapidement en quelques heures ;
- d'adapter la prise en charge thérapeutique des patients (notamment le traitement antibiotique).

À ce jour, ce type d'approche reste très coûteux et du domaine de l'ultra-spécialisation, son impact réel sur la prise en charge des patients restant à déterminer en particulier par des études cliniques prospectives. ■■

Déclaration de liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Points à retenir

- Le séquençage haut débit ou NGS en microbiologie regroupe des approches de séquençage ciblées (métataxonomie) et non ciblées (métagénomique).
- Alors que la métagénomique ciblée ou métataxonomie (via une « PCR universelle ») ne permet de détecter que les ADN des bactéries, parasites ou champignons, la métagénomique permet de détecter l'ensemble des acides nucléiques, microbiens ou non, présents dans un échantillon.
- La métataxonomie offre une capacité importante d'identification de nombreux microorganismes présents dans une communauté, y compris ceux non- ou difficilement identifiables par culture, mais

l'utilisation du microbiote comme biomarqueur clinique doit être encore confortée.

- La métagénomique ne permettra pas toujours de résoudre les situations cliniques où la sensibilité de la microbiologie moléculaire est mise en défaut, ses indications restent donc à discuter de manière collégiale clinico-biologique.
- Quelle que soit la méthode utilisée (métataxonomie ou métagénomique), un effort de standardisation depuis l'extraction des acides nucléiques jusqu'à l'analyse bio-informatique et l'interprétation des données issues du séquençage devra être réalisée pour faciliter l'accès en clinique à ces nouveaux outils de diagnostic microbiologique.



Références

- [1] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977; 74(12):5463-7.
- [2] Fleischmann RD, Adams MD, White O et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*. 1995;269(5223):496-512.
- [3] Charpentier E, Garnaud C, Wintenberger C et al. Added Value of Next-Generation Sequencing for Multilocus Sequence Typing Analysis of a *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia Outbreak. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(8):1237-45.
- [4] www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance.
- [5] <https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>
- [6] <https://ardb.cbcb.umd.edu/>
- [7] d'Humières C, Salmons M, Dellièvre S et al. The Potential Role of Clinical Metagenomics in Infectious Diseases: Therapeutic Perspectives. *Drugs*. 2021;81:1453-66.
- [8] Hupalo DN, Luo Z, Melnikov A, et al. Population genomics studies identify signatures of global dispersal and drug resistance in *Plasmodium vivax*. *Nat Genet*. 2016;48:953-8.
- [9] Šterbenc A, Jarc E, Poljak M, Homan M. *Helicobacter pylori* virulence genes. *World J Gastroenterol*. 2019;25(33):4870-84.
- [10] Yang W, Lin YC, Johnson W et al. A genome-phenome association study in native microbiomes identifies a mechanism for cytosine modification in DNA and RNA. *Elife*. 2021;10:e70021.
- [11] www.genome.gov/genetics-glossary/Genome-Wide-Association-Studies
- [12] Grad YH, Lipsitch M, Feldgarden M et al. Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe, 2011. *PNAS*. 2012;109 (8):3065-70.
- [13] Helmy YA, Fawzy M, Elswad A et al. The COVID-19 Pandemic: A Comprehensive Review of Taxonomy, Genetics, Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control. *J Clin Med*. 2020;9(4):1225.
- [14] Ren Z, Li A, Jiang J et al. Gut microbiome analysis as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for early hepatocellular carcinoma. *Gut*. 2019;68:1014-23.
- [15] Agus A, Clément K, Sokol H. Gut microbiota-derived metabolites as central regulators in metabolic disorders. *Gut*. 2021;70(6):1174-82.
- [16] Sokol H, Leducq V, Aschard H et al. Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut*. 2017;66(6):1039-48.
- [17] Pichon M, Picard C, Simon B et al. Clinical management and viral genomic diversity analysis of a child's influenza A(H1N1)pdm09 infection in the context of a severe combined immunodeficiency. *Antiviral Res*. 2018;160:1-9.
- [18] Soret P, Vandenborgh LE, Francis F et al. Respiratory mycobiome and suggestion of inter-kingdom network during acute pulmonary exacerbation in cystic fibrosis. *Sci Rep*. 2020;10(1):3589.
- [19] Conrad D, Haynes M, Salamon P et al. Cystic fibrosis therapy: a community ecology perspective. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013;48(2):150-6.
- [20] Nguyen LD, Viscogliosi E, Delhaes L. The lung mycobiome: an emerging field of the human respiratory microbiome. *Front Microbiol*. 2015; 6:89.
- [21] Charalampous T, Kay GL, Richardson H et al. Nanopore metagenomics enables rapid clinical diagnosis of bacterial lower respiratory infection. *Nat Biotechnol*. 2019;37(7):783-92.
- [22] Olsen RJ, Fittipaldi N, Kachroo P et al. Clinical laboratory response to a mock outbreak of invasive bacterial infections: a preparedness study. *J Clin Microbiol*. 2014;52(12):4210-6.
- [23] <https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-16>