



**HAL**  
open science

# Méthodes d'exploration du microbiote intestinal

Catherine Michel

► **To cite this version:**

Catherine Michel. Méthodes d'exploration du microbiote intestinal. Master. Nantes (FR), France. 2021, pp.52. hal-03973262

**HAL Id: hal-03973262**

**<https://hal.inrae.fr/hal-03973262>**

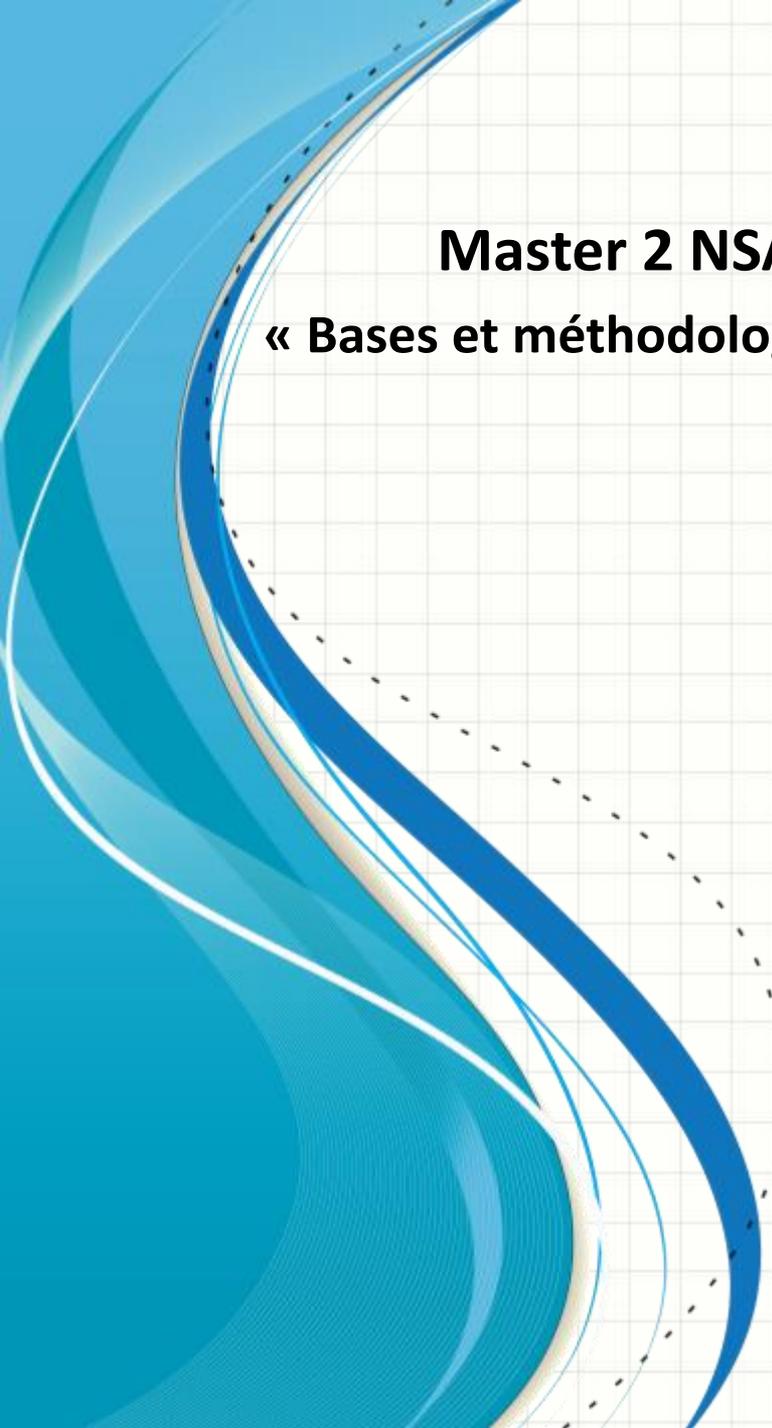
Submitted on 4 Feb 2023

**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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License



**Master 2 NSA (Nutrition et Science des Aliments )**  
**« Bases et méthodologies des Sciences de l'aliment et de la nutrition »,**  
**2021-2022**

**Méthodes d'exploration  
du microbiote intestinal**

**Catherine MICHEL**

UMR PhAN, INRA-Université Nantes

Catherine.Michel@univ-nantes.fr

# Préambule 1 : vocabulaire

Le microbiome (du grec micro, « petit », et bios, « vie ») est l'« aire biotique » (aire de vie correspondant à une niche écologique) du microbiote, **le mot microbiote désignant ici les espèces autrefois regroupées sous le terme « microflore »**, c'est-à-dire celles qui prédominent ou sont durablement adaptées à la surface et à l'intérieur d'un organisme vivant<sup>1</sup>.

[...]

En anglais, le terme microbiome fait référence aux génomes (données génétiques) d'un microbiote. (= « **métagénome** »)

Cette définition ne semble cependant pas faire consensus parmi les auteurs français : d'après Pascale Cossart « on parle de "microbiote" pour désigner l'ensemble des espèces microbiennes présentes dans un environnement, et de "microbiome" quand il s'agit de l'ensemble des gènes présents dans ce microbiote ».

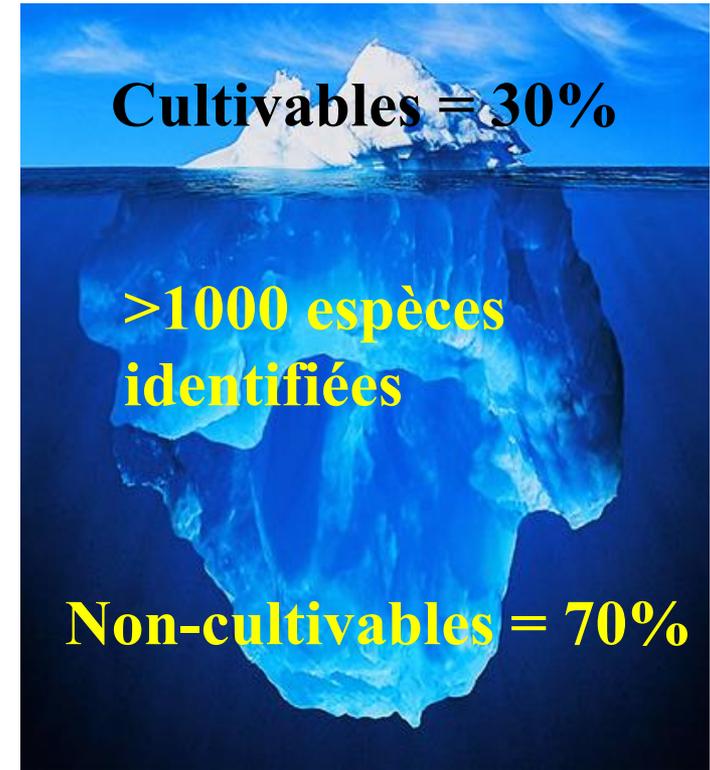
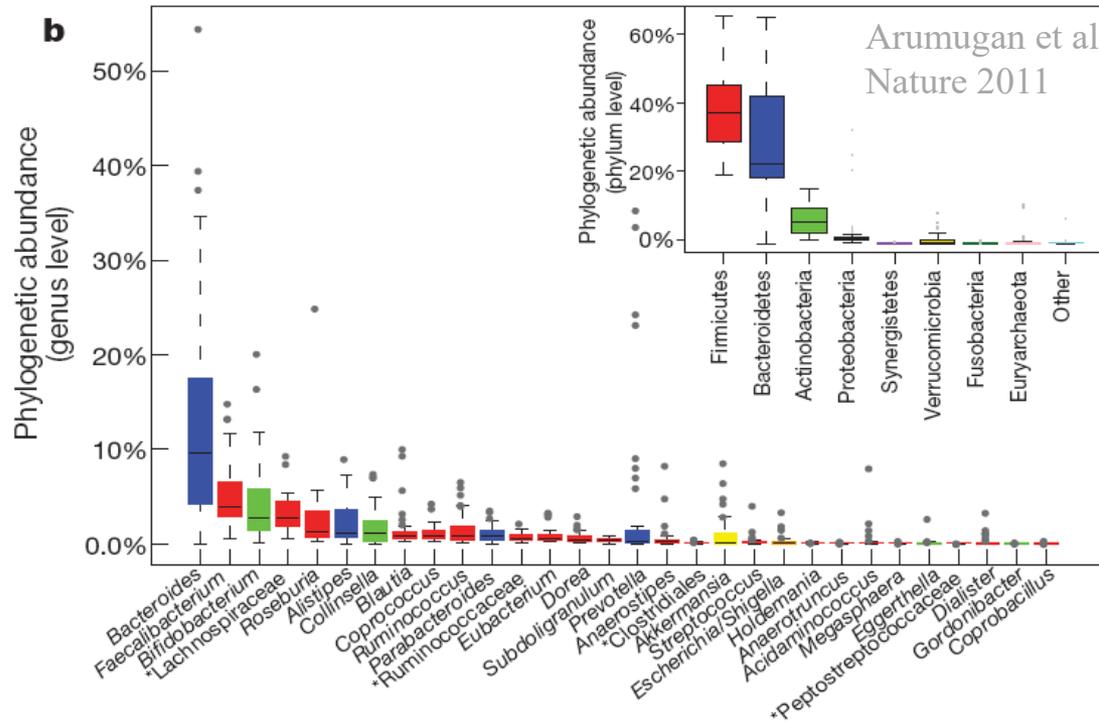
<https://fr.wikipedia.org/wiki/Microbiome>

Esposito & Kirschberg FEMS Microbiol Lett 351 (2014) 145–146

Can studies targeting a single gene be considered 'metagenomic'?

Using the word '**metagenetics**' [...] instead of metagenomic would accommodate several studies involving PCR methods that target just one gene on the metagenomic DNA

# Préambule 2 : composition bactérienne du microbiote « intestinal » humain



- ✓ **6 à 8 phylas** (Firmicutes et Bacteroidetes ultra-dominants)
- ✓ **Env 30 genres différents** (surtout anaérobies)
- ✓ **Env 1000 espèces différentes** (essentiellement incultivables, 150 à 400 / individus)
- ✓ **Env 50 trillions bactéries** (=  $5 \cdot 10^{13}$ )

*Env 1,5x plus que cellules de l'hôte*

➔ **Une composition très complexe!**

# **Méthodes d'analyse de la composition bactérienne du microbiote intestinal**

# Microbiote intestinal humain = essentiellement le microbiote fécal

## microbiote LUMINAL

## Microbiote MUCOSAL

Accès limité  
Représentativité ?

Sondes naso-gastrique/  
naso-intestinale  
+ biopsies

Représentativité ?  
Sujets sains ?

Aspirations  
lors chirurgie

Prolifération post-mortem

Autopsie

Évolution lors transit

Pyxigraphie

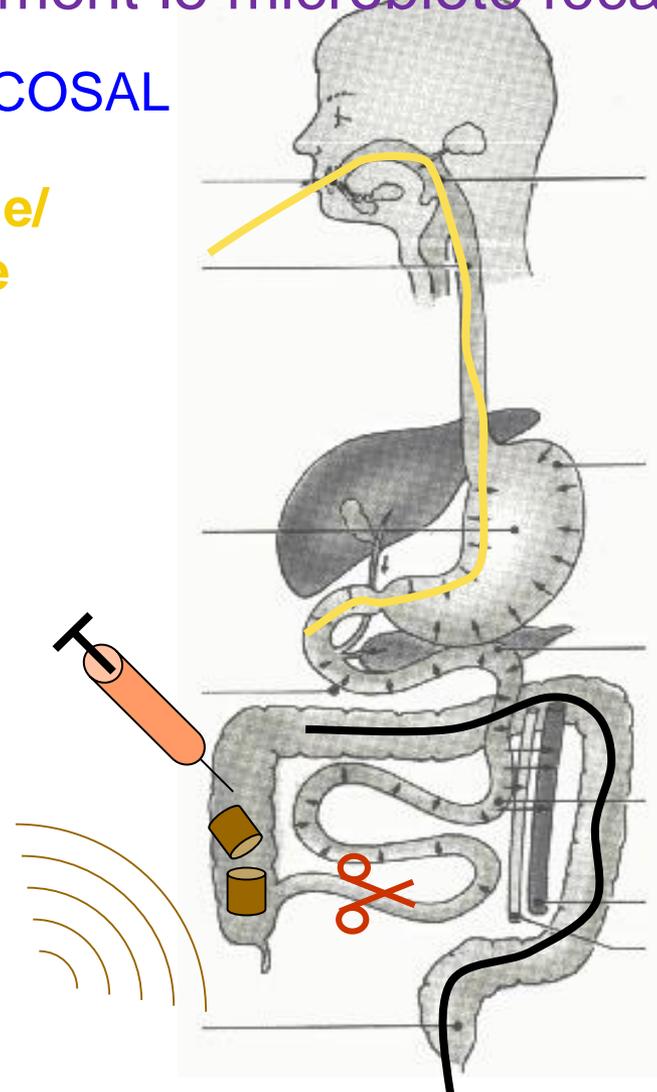
Traitements préalables

Coloscopies  
+ biopsies

Représentativité ?

Collecte selles

Très aisée



# L'analyse par culture pasteurienne : la méthode originelle, resuscite l'intérêt ?

## Culturable ? / Respect anaérobiose / Traitement immédiat

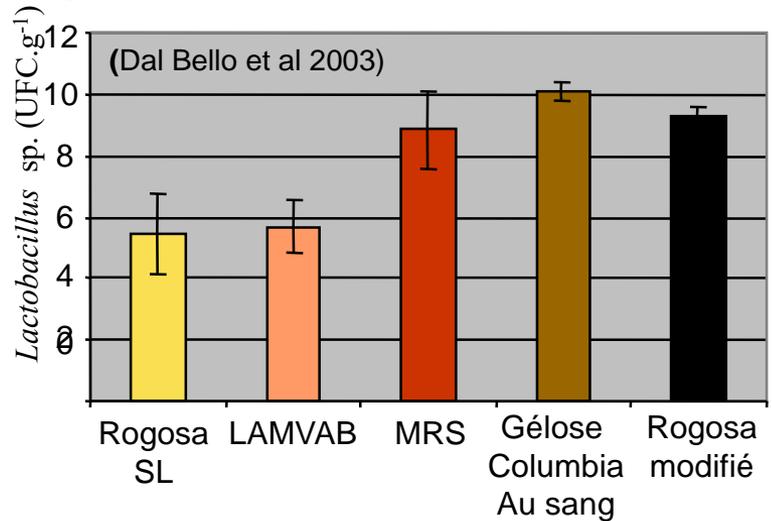
### Culture + identification phénotypique

Coloration de Gram; Morphologie; Tests biochimiques; Composition

1900

Fraction cultivable du microbiote  
15 à 60 %

### Culture sur milieux sélectifs



Sélectivité ?  
•suffisante  
•excessive

1950

Pb exhaustivité

### Culture + identification génotypique

% des colonies « BIF+ » après PCR classique

Milieu Beerens	62%
Milieu WC + mupirocine	82%

1990

Δvpmt méthodes indépendantes de la culture

### Culturomic

174 different culture media ↔ 42% of gut microbiota members  
Crhanova et al Microorganisms 2019, 7, 496

>2010

Sensible, quantitative, Accès aux bactéries !

Lourdeur, comparabilité = f(milieux/traitements), pas exhaustive

# ADN/ARN 16S est la cible majeure des 1eres méthodes d'analyse moléculaires

**Cible principale :**  
**ADN/ARN 16s:**



env 1500 pb : informatif  
Universellement distribués  
Fonction essentielle : zones conservées  
Mutation = évolution -> classification  
*Nbre de copies / genome variable selon souche*

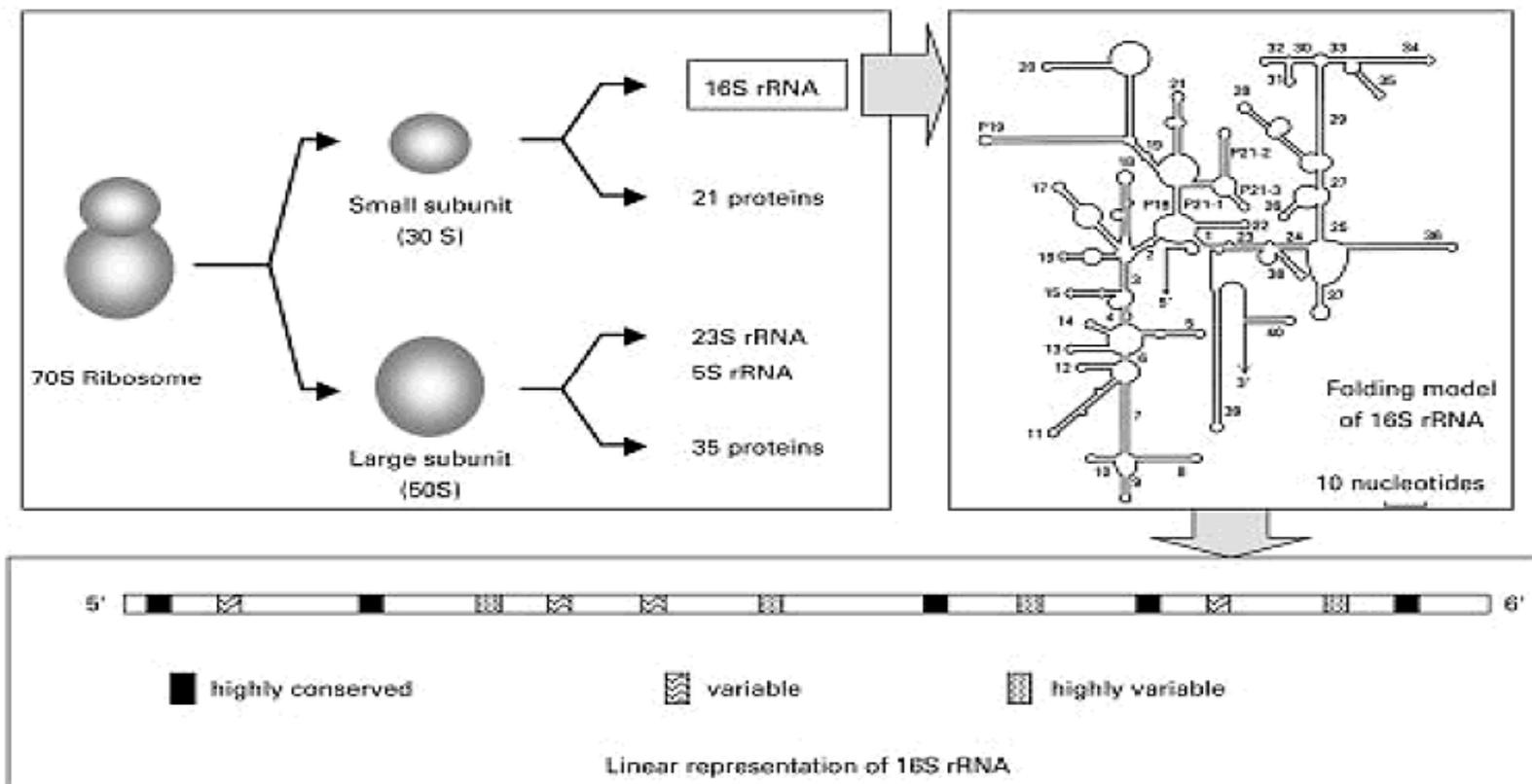


Fig. 1. The ribosomal RNA as a phylogenetic and evolutionary marker.

Cf Blaut et al 2002 BJJN 87:S203

**Pas d'accès aux bactéries**

**ADN = f(copies) : potentiel versus ARN= f( $\Delta$ vpmt) : activité**

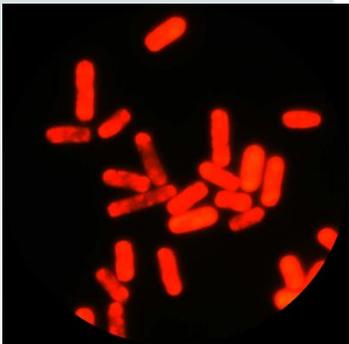
**Si méthode suppose PCR préalable : attention aux biais**

# Une grande diversité de méthodes d'études du microbiote digestif coexistent :

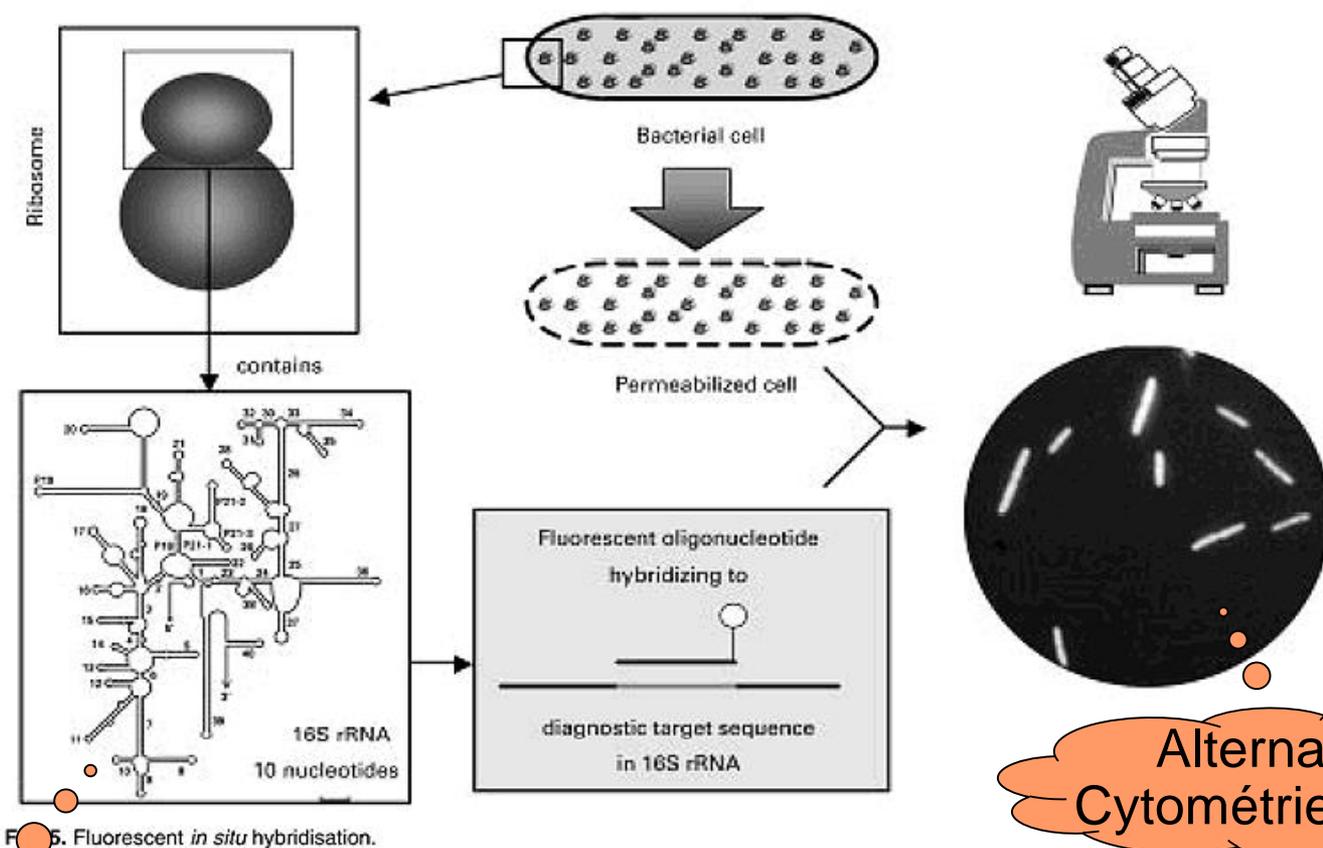
*D'après <http://www.inra.fr/internet/Projets/agroBI/PHYLO/Simonet.pdf>*



**+ FISH**



# (Fluorescent) Hybridation in situ (HIS ou FISH) : l'une des méthodes moléculaires initialement développées mais aujourd'hui en voie de désuétude



Blaut et al 2002 BJJN 87:S203

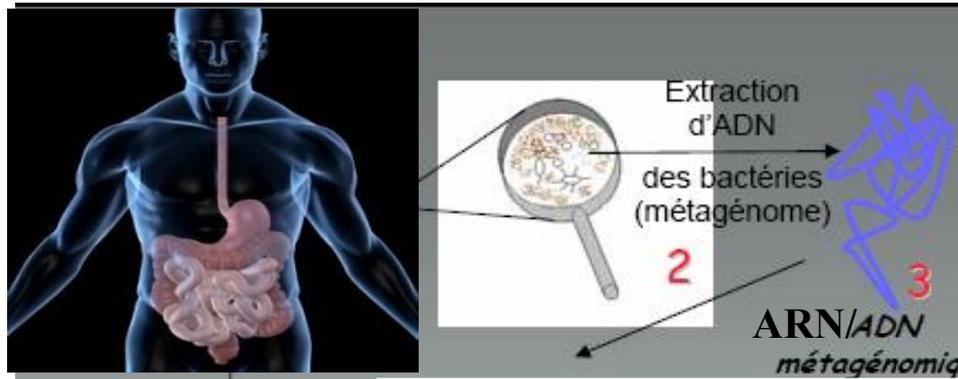
Cibler une zone accessible

Quantifications relative/absolue

Requiert prétraitement extemporané  
Lourde  
Affectée par activité  
Peu sensible (env  $10^5$  bact.g<sup>-1</sup>)

# Une grande diversité de méthodes d'études du microbiote digestif coexistent :

D'après <http://www.inra.fr/internet/Projets/agroBI/PHYLO/Simonet.pdf>



+ dot blot

+ FISH



# Hybridation sur membranes (DotBlot) : la 2<sup>e</sup> méthode moléculaire initialement développée mais aujourd'hui quasiment abandonnée

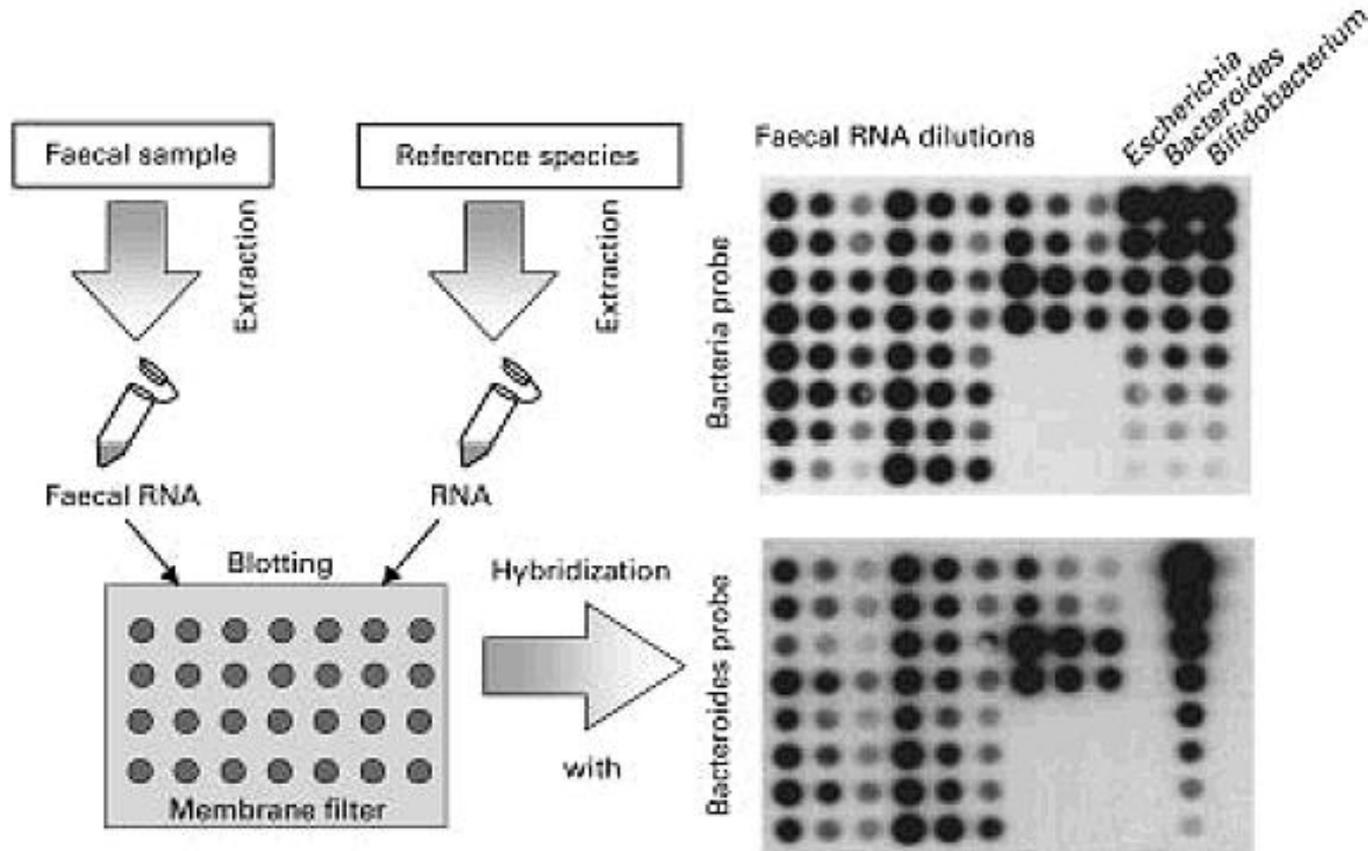


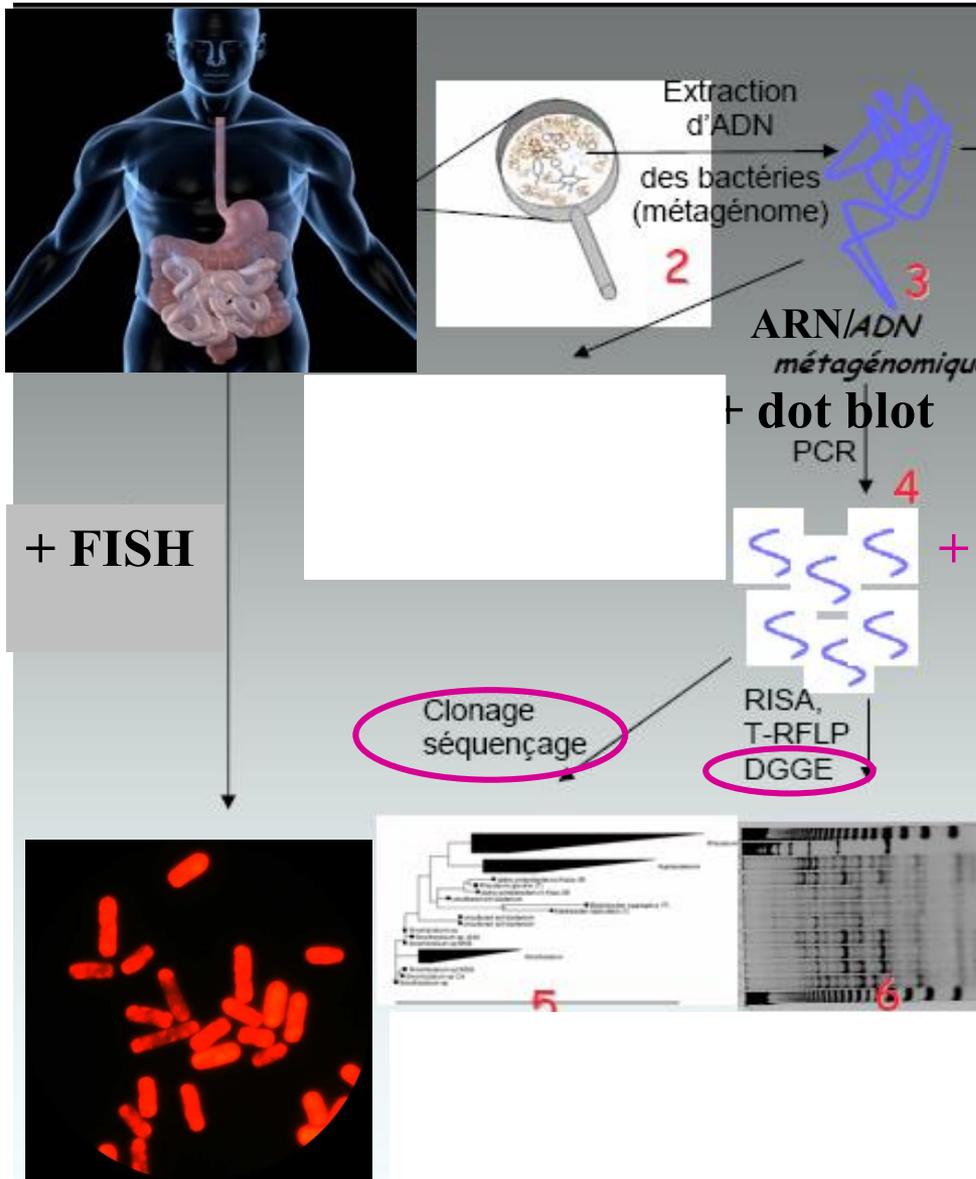
Fig. 4. Quantitative dot-blot hybridisation.

Blaut et al 2002 BJN 87:S203

**Quantification relative seulement**  
**Biais liés à extraction**  
**Pas de traitement immédiat**  
**ARN accessible pour hybridation**

# Une grande diversité de méthodes d'études du microbiote digestif coexistent :

D'après <http://www.inra.fr/internet/Projets/agroBI/PHYLO/Simonet.pdf>



# Clonage & séquençage : maintenant remplacé par séquençage direct

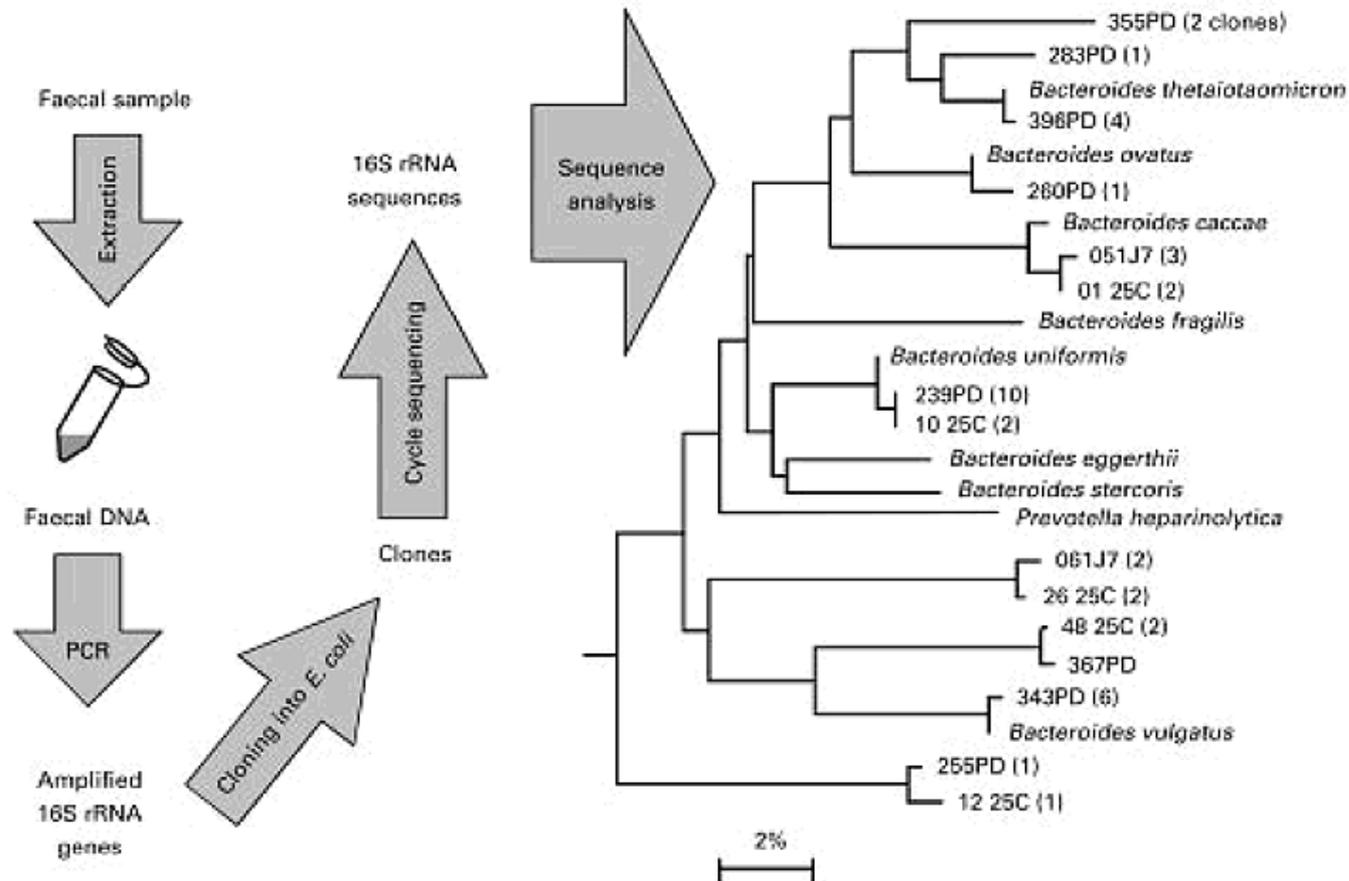


Fig. 2. The culture independent assessment of microbial diversity.

**Pas quantitatif**  
**Biais liés à extraction**  
**Biais liés à PCR**

**Pas de traitement immédiat**  
**Accès aux séquences : identification fiable**

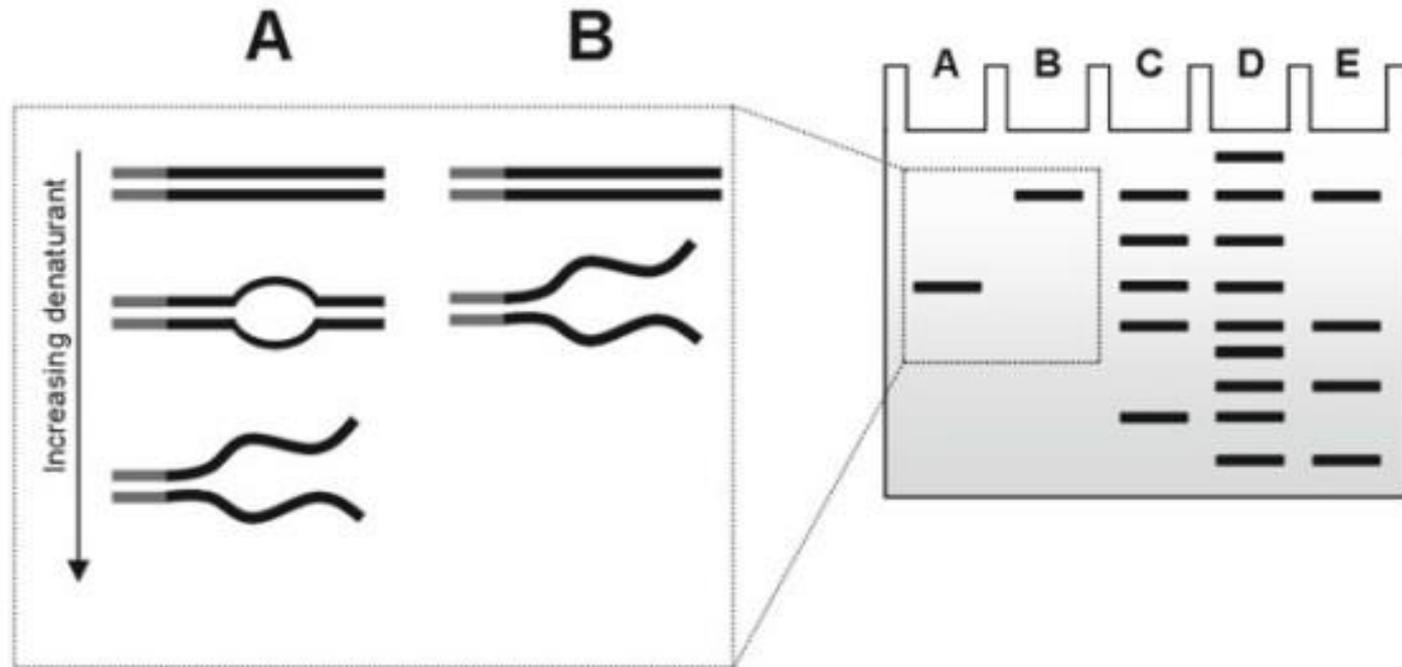
**Inventaire moléculaire**

# DGGE/TGGE: denaturing/temperature gradient gel electrophoresis

PCR avec amorces-GC clamp

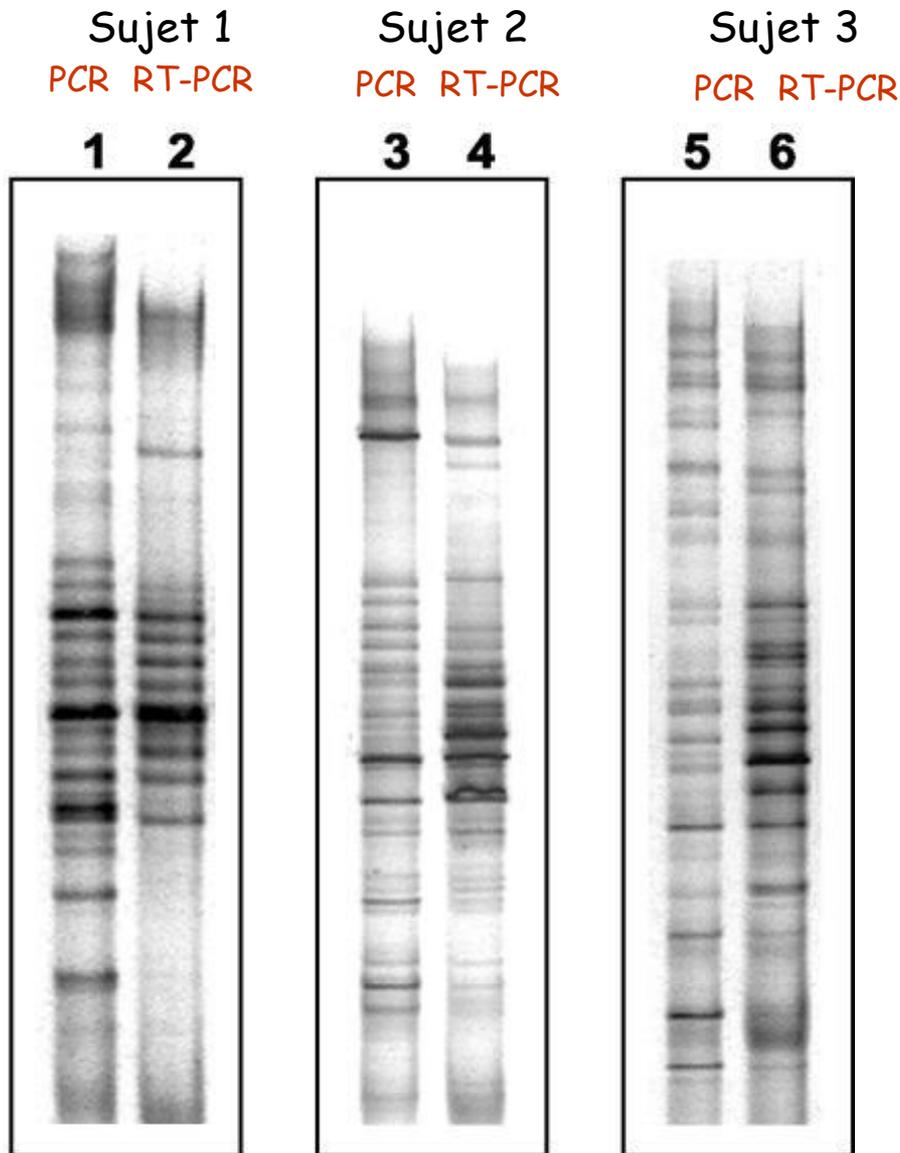
Électrophorèse en conditions dénaturantes

En théorie 1 bande = 1 espèce bactérienne



**Fig. 1** Denaturing gradient gel electrophoresis. Migration of DNA in the gel is determined by its melting behavior in a gradient of urea and formamide. DNA fragments of the same size are separated, generating a fingerprint of community diversity

## Exemple DGGE (Tannock et al AEM 2004;70:2129) :



Note intensely staining fragments in the central region of RT-PCR profiles relative to PCR profiles.

- Pas quantitative
- Biais liés à extraction
- Biais liés à PCR
- Peu informative sans excission et clonage de bandes
- Microbiote dominant seulement
- Pas de traitement immédiat
- Utilisable pour différentes cibles (selon amorces PCR)
- Adaptée à suivi cinétique



# Attention à la spécificité & couverture des séquences oligonucléotidiques !

Vrai aussi pour  
FISH, dot blot...

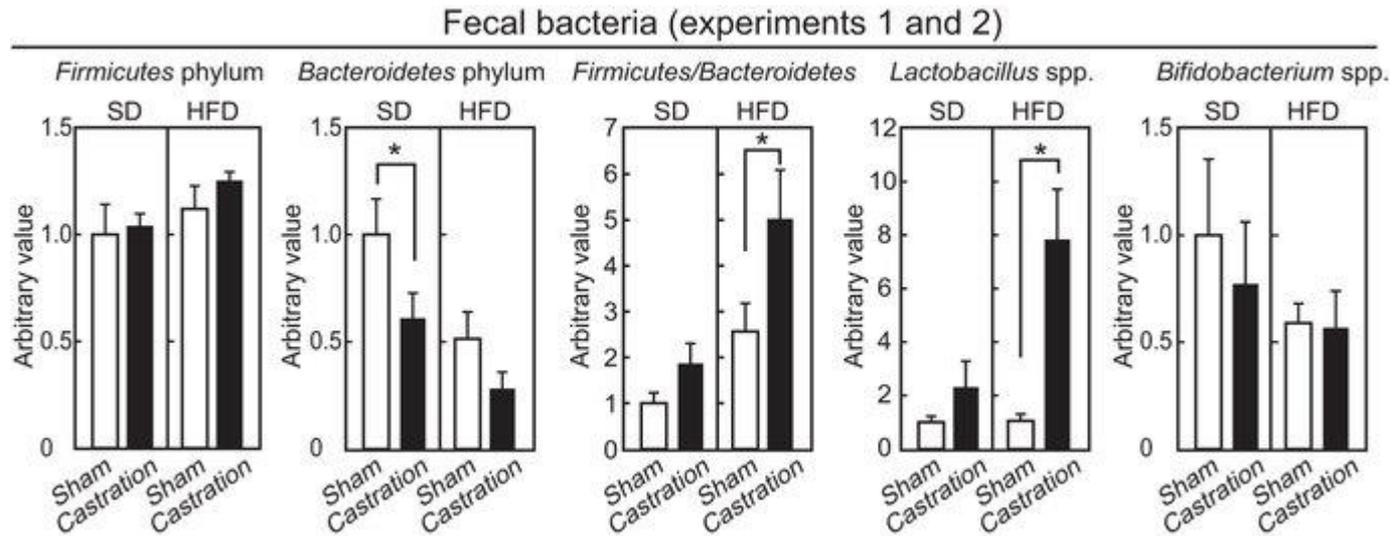
## Exemple d'amorces ciblant le phylum Bacteroidetes

Capacité d'appariement testée à l'aide <https://rdp.cme.msu.edu/probematch/search.jsp>

référence	Séquence des amorces (5' -> 3')	% Spécificité (Nbre appariements au sein Bacteroidetes / Nbre appariements totaux)	% Couverture (Nbre appariements au sein Bacteroidetes / Nbre total de séquences apparentées au phylum Bacteroidetes)
Armougom et al 2009 PLoS ONE 4(9): e7125	FP: AGCAGCCGCGGTAAT/ RP: CTAHGCATTTACCGCTA	16,0	74,8
Luu et al 2018, d'après Bacchetti de Gregoris et al 2011 et Guo et al 2008	cfb967F: ATACGCGAGGAACCTTACC / Bact1060R : AGCTGACGACAACCATGCAG	88,7	52,0

# qPCR : exemple

Harada et al 2016 Scientific Reports 6:23001



Analysis of microbiota in feces by real-time PCR (experiments 1 and 2).: Relative abundances of Firmicutes phylum, Bacteroidetes phylum, *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. in the feces of 13-weeks old mice (n = 6, SD sham; n = 6, SD castration; n = 6, HFD sham; n = 5, HFD castration).

- Pas de traitement immédiat
- Quantifications relative/absolue
- Utilisable pour différentes cibles (selon amorces)

- Biais liés à extraction
  - Biais liés à PCR
- Affectée par nbre copies ADN16s
  - Comparabilité <-> Spécificité
  - Peu sensible ( $10^4$  à  $10^5$  bact.g<sup>-1</sup>)

## Les méthodes moléculaires « bas-débit » : bilan

méthode	cible	Extraction préalable ?	PCR préalable ?	Quantitative ?	Exhaustive ?	Applicabilité ?
FISH	ARN	NON	NON	OUI (Absolue ou relative/bact totales)	Selon nbre et choix sondes	Lourde (traitement extemporané, analyse images)
Dot-Blot	ARN	OUI	NON	OUI (Relative/ARN total)	Selon nbre et choix sondes	OK (sondes le + svt radioactives)
Clonage + séquençage	ADN	OUI	OUI	OUI (Relative/Nbre séquences)	OUI ? selon choix amorces	Lourde couteuse
DGGE/ TGGE	ADN ARN	OUI	OUI	NON	OUI ? ( $\mu$ biote dominant)	OK
qPCR	ADN	OUI	OUI	OUI (Absolue ou relative)	Selon nbre et choix amorces	OK

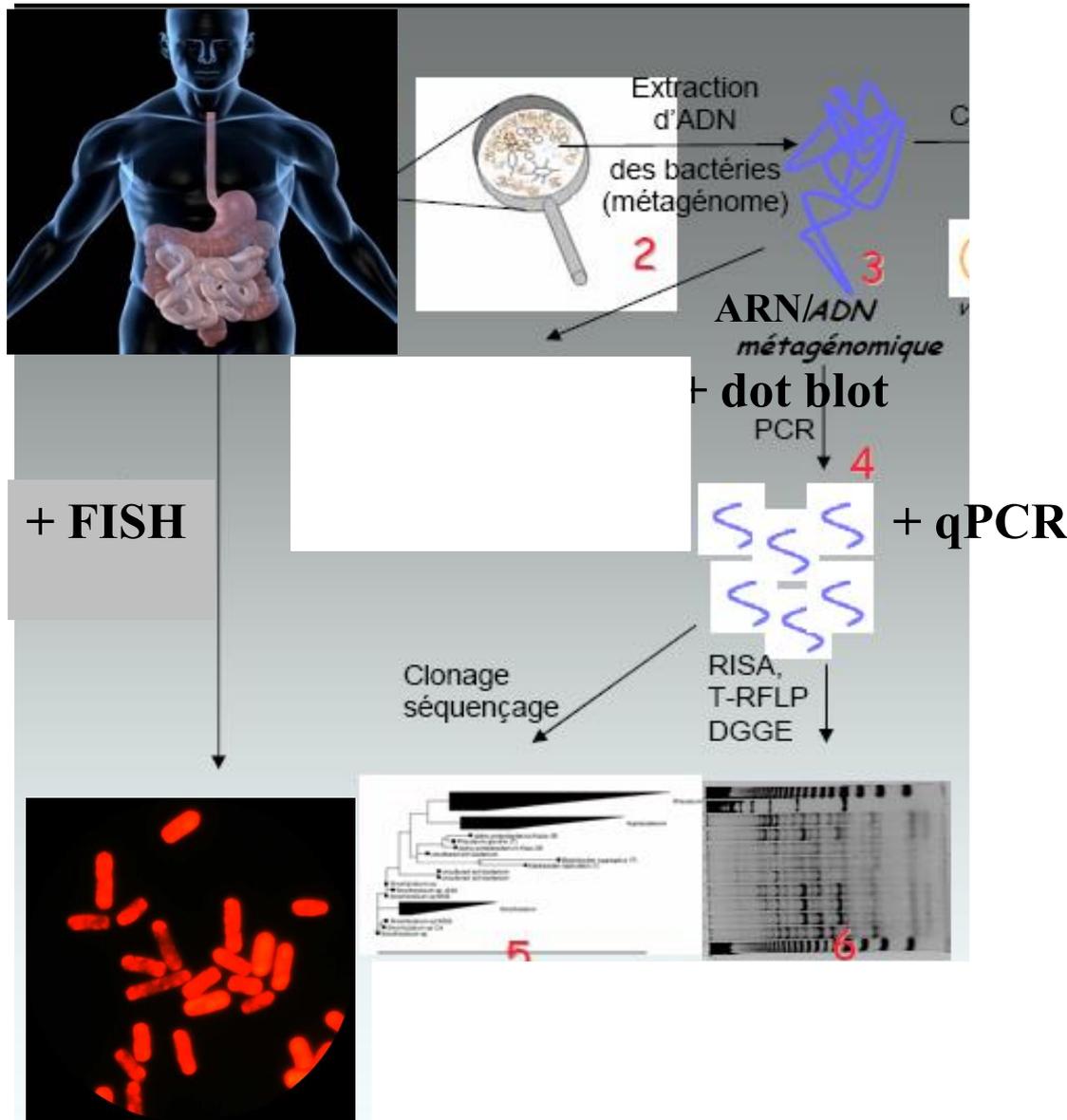
- ✓ La plupart applicable à échantillons congelés, indépendantes de la culture
- ✓ Peu sensibles, la plupart sujette aux biais liés à nbre rrm, extraction et/ou PCR
- ✓ Comparabilité des résultats = f(méthode extraction ADN & choix oligonucléotides)



Développement méthodes « haut-débit »

# Une grande diversité de méthodes d'études du microbiote digestif coexistent :

D'après <http://www.inra.fr/internet/Projets/agroBI/PHYLO/Simonet.pdf>



# Détails des méthodes « haut-débit » appliquées au microbiote

Échan-  
tillonnage

*Isolement  
bactéries*

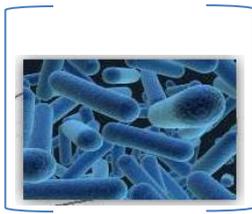
Extraction  
ADN

Ampli-  
fication

Séquen-  
çage

Bio  
info

Stat



**16s –(pyro)sequencing  
(métagénétique)**



ADN 16s

Tri séquences  
Homologie /RDP

actuelle

Ex Andersson et al  
PLoS One 2008

Taxons

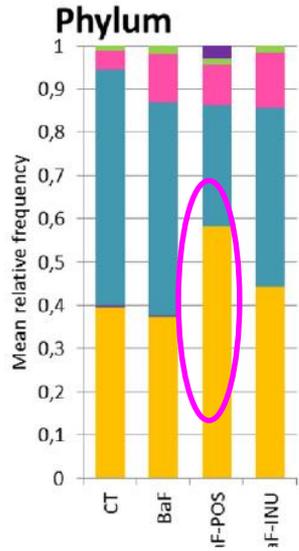
**Richesse**

**Diversité**

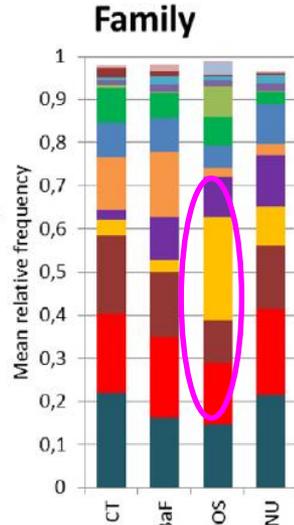
**Similarité**

Adapté de Doré J, 19ème Colloque sur le Contrôle Epidémiologique des Maladies Infectieuses, 2016

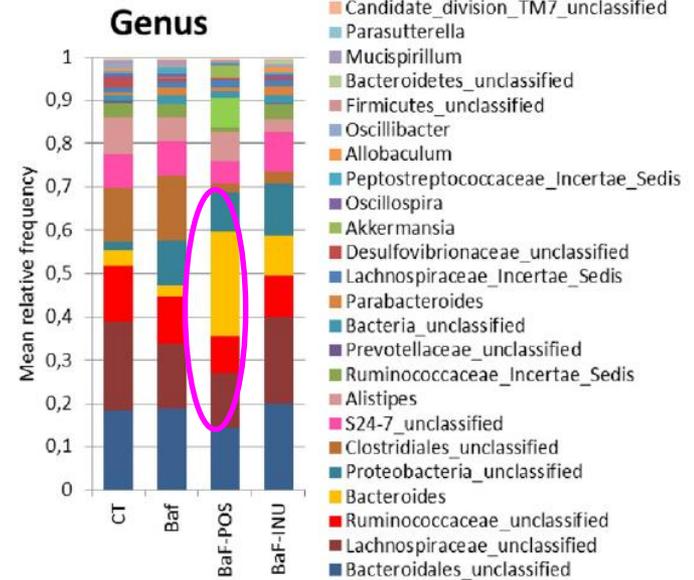
# 16s –(pyro)sequencing (métagénétique) : exemples cz la souris



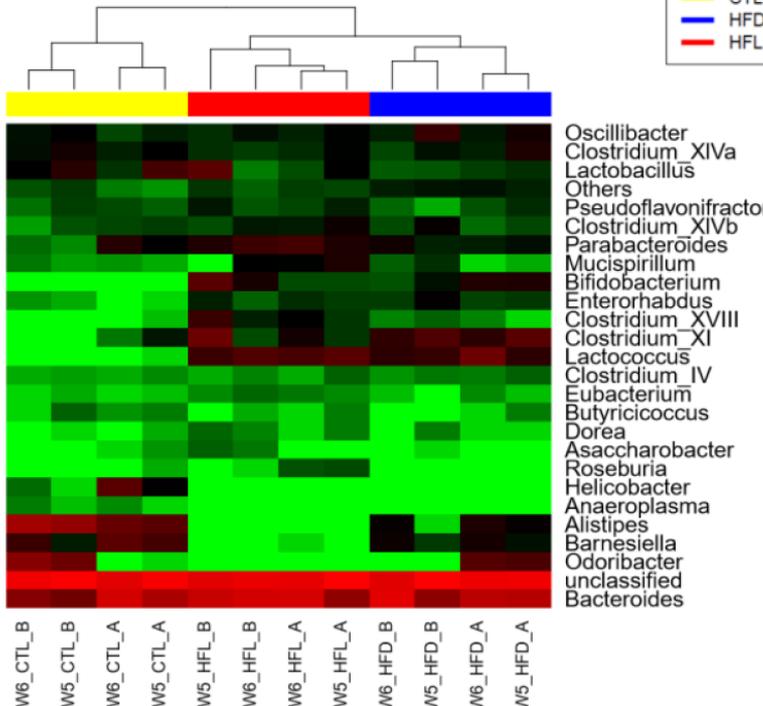
- Verrucomicrobia
- Unclassified
- Proteobacteria
- Firmicutes
- Deferribacteres
- Candidate\_division\_TM7
- Bacteroidetes
- Actinobacteria



- Peptostreptococcaceae
- Verrucomicrobiaceae
- Desulfovibrionaceae
- Porphyromonadaceae
- Bacteria\_unclassified
- Prevotellaceae
- Rikenellaceae
- S24-7
- Clostridiales\_unclassified
- Proteobacteria\_unclassified
- Bacteroidaceae
- Ruminococcaceae
- Bacteroidales\_unclassified
- Lachnospiraceae



- Candidate\_division\_TM7\_unclassified
- Parasutterella
- Mucispirillum
- Bacteroidetes\_unclassified
- Firmicutes\_unclassified
- Oscillibacter
- Allobaculum
- Peptostreptococcaceae\_Incertae\_Sedis
- Oscillospira
- Akkermansia
- Desulfovibrionaceae\_unclassified
- Lachnospiraceae\_Incertae\_Sedis
- Parabacteroides
- Bacteria\_unclassified
- Prevotellaceae\_unclassified
- Ruminococcaceae\_Incertae\_Sedis
- Alistipes
- S24-7\_unclassified
- Clostridiales\_unclassified
- Proteobacteria\_unclassified
- Bacteroides
- Ruminococcaceae\_unclassified
- Lachnospiraceae\_unclassified
- Bacteroidales\_unclassified



Bindels et al PLoS One. 2015;10(6):e0131009

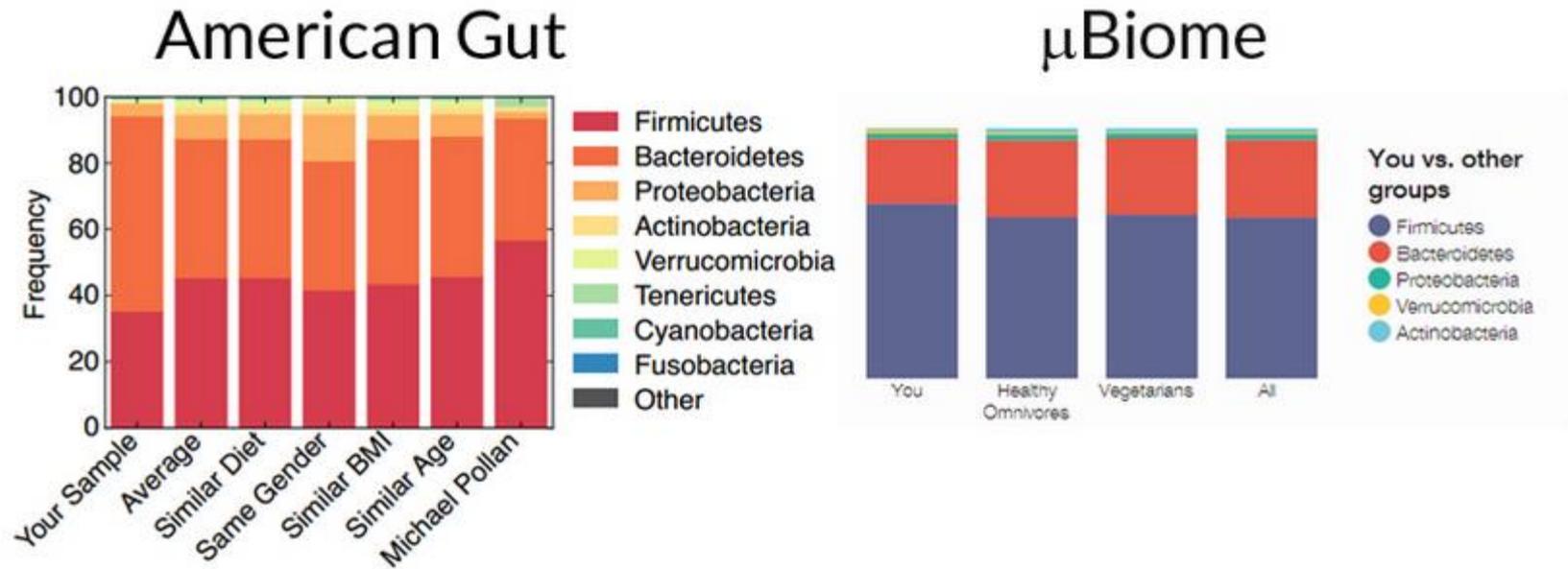


# 16s –(pyro)sequencing (métagénétique) : reproductibilité

GORY DETAILS MICROBIOLOGY, GENETICS

## Here's the poop on getting your gut microbiome analyzed

BY SCIENCE NEWS STAFF 4:38PM, JUNE 17, 2014



I asked two different companies to analyze my gut microbiome. American Gut (left) gave nearly opposite results to those from uBiome (right) with respect to the major phyla of bacteria in a duplicate sample.

<https://www.sciencenews.org/blog/gory-details/here%E2%80%99s-poop-getting-your-gut-microbiome-analyzed>

# Attention : à nouveau, le choix des amorces affecte la comparabilité des résultats !

Wu et al. *BMC Microbiology* 2010, 10:206  
<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/206>

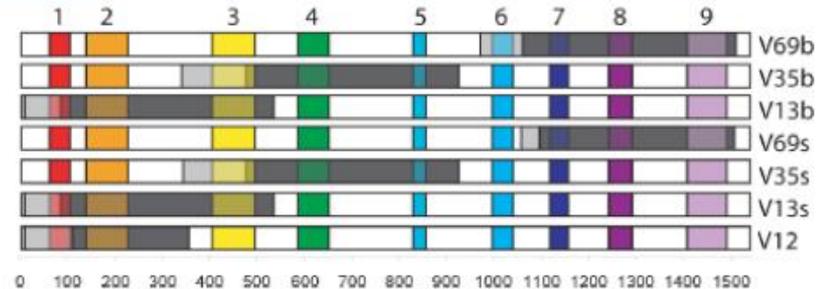


METHODOLOGY ARTICLE

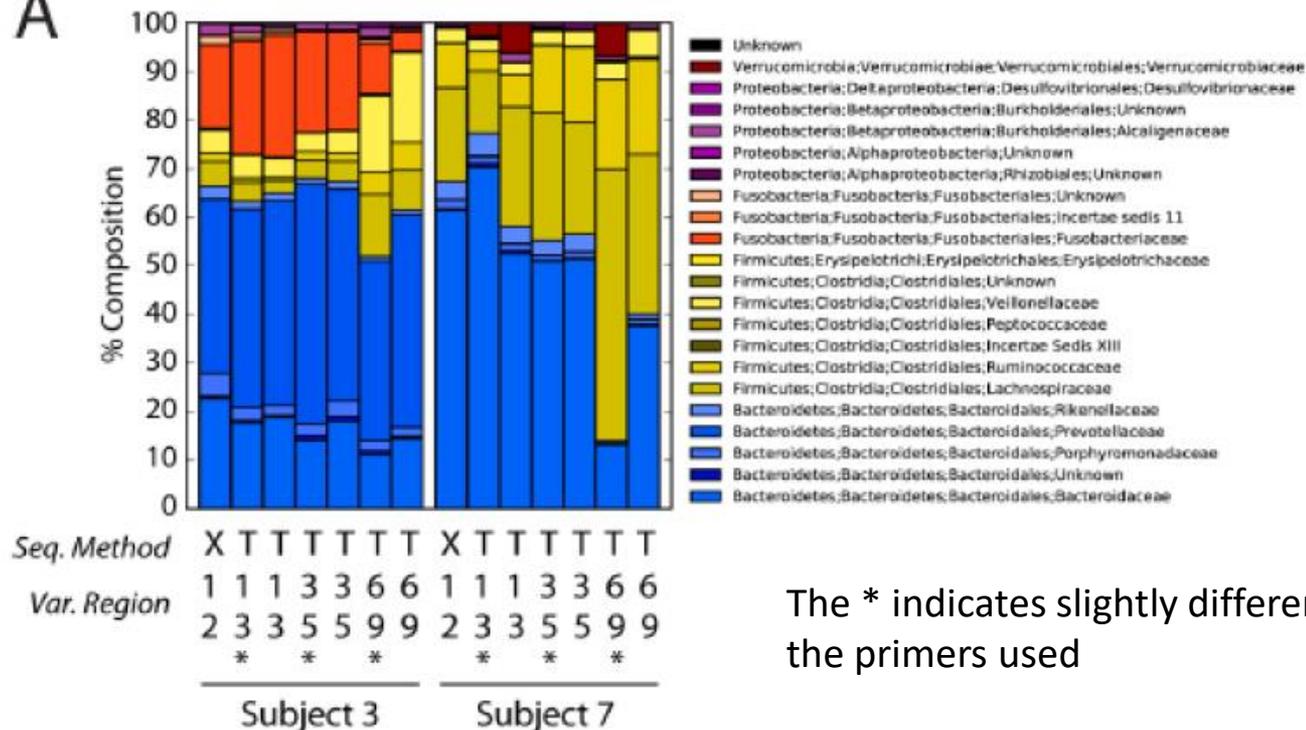
Open Access

## Sampling and pyrosequencing methods for characterizing bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags

Gary D Wu<sup>2\*1</sup>, James D Lewis<sup>2,3,1</sup>, Christian Hoffmann<sup>1,6</sup>, Ying-Yu Chen<sup>2</sup>, Rob Knight<sup>2,7</sup>, Kyle Bittinger<sup>1</sup>, Jennifer Hwang<sup>1</sup>, Jun Chen<sup>3,4</sup>, Ronald Berkowsky<sup>2</sup>, Lisa Nessel<sup>2,3</sup>, Hongzhe Li<sup>3,4</sup>, Frederic D Bushman

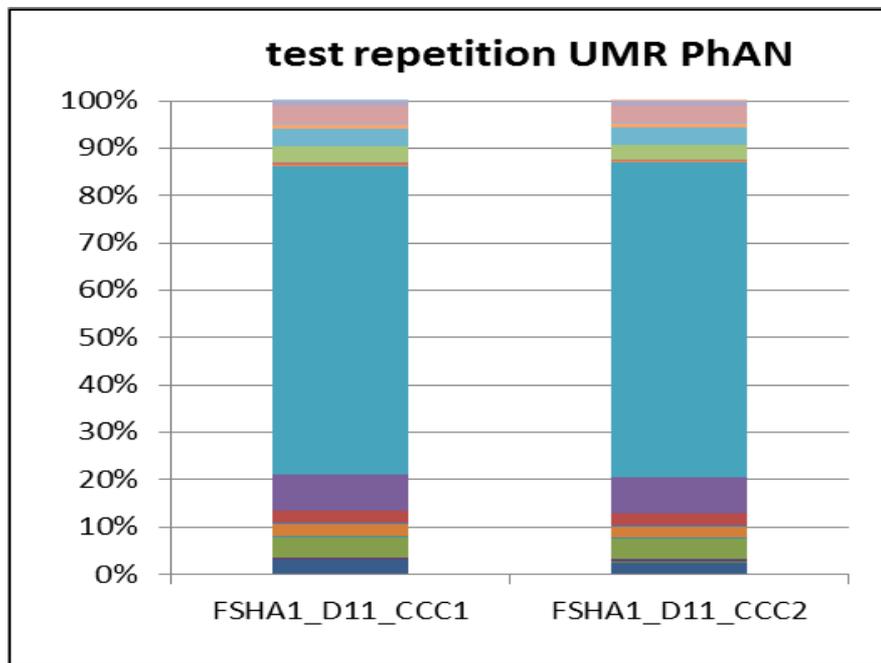


A



The \* indicates slightly different versions of the primers used

# 16s –(pyro)sequencing (métagénétique) : répétabilité



- unknown family
- Tannerellaceae
- Streptococcaceae
- Staphylococcaceae
- Ruminococcaceae
- Rikenellaceae
- Prevotellaceae
- Peptostreptococcaceae
- Peptococcaceae
- Pasteurellaceae
- Muribaculaceae
- Multi-affiliation
- Micrococcaceae
- Lactobacillaceae
- Lachnospiraceae
- Family XIII
- Erysipelotrichaceae
- Enterococcaceae
- Enterobacteriaceae
- Eggerthellaceae
- Desulfovibrionaceae
- Clostridiaceae 1
- Christensenellaceae
- Burkholderiaceae
- Bifidobacteriaceae
- Bacteroidaceae
- Atopobiaceae
- Anaeroplasmataceae
- Akkermansiaceae

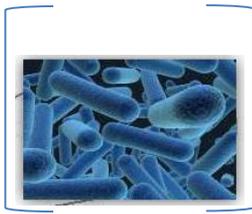
*Abondances relatives à l'échelle de la famille pour 2 replicats*

famille	FSHA1_D11_CCC1	FSHA1_D11_CCC2	moy	cv%
Lactobacillaceae	65,117	66,328	<b>65,722</b>	1,3
Lachnospiraceae	7,577	7,746	<b>7,661</b>	1,6
Clostridiaceae 1	4,107	4,241	<b>4,174</b>	2,3
Peptostreptococcaceae	3,657	3,815	<b>3,736</b>	3,0
Ruminococcaceae	3,730	3,266	<b>3,498</b>	9,4
Pasteurellaceae	3,333	3,002	<b>3,167</b>	7,4
Akkermansiaceae	2,953	2,551	<b>2,752</b>	10,3
Erysipelotrichaceae	2,513	2,534	<b>2,523</b>	0,6
Enterobacteriaceae	2,502	2,340	<b>2,421</b>	4,7
Streptococcaceae	1,024	1,014	<b>1,019</b>	0,7
Prevotellaceae	0,799	0,785	<b>0,792</b>	1,3
Bacteroidaceae	0,633	0,577	<b>0,605</b>	6,6
Muribaculaceae	0,419	0,348	<b>0,384</b>	13,0
Micrococcaceae	0,384	0,334	<b>0,359</b>	9,7
Rikenellaceae	0,331	0,345	<b>0,338</b>	2,9
Eggerthellaceae	0,324	0,257	<b>0,290</b>	16,3
Enterococcaceae	0,208	0,197	<b>0,202</b>	3,7
Staphylococcaceae	0,113	0,088	<b>0,100</b>	17,4
Family XIII	<b>0,067</b>	<b>0,042</b>	<b>0,055</b>	<b>31,9</b>
Bifidobacteriaceae	0,046	0,046	<b>0,046</b>	0,0
Atopobiaceae	0,032	0,042	<b>0,037</b>	20,2
Multi-affiliation	<b>0,049</b>	<b>0,021</b>	<b>0,035</b>	<b>56,6</b>
Peptococcaceae	<b>0,021</b>	<b>0,035</b>	<b>0,028</b>	<b>35,4</b>
Tannerellaceae	0,025	0,018	<b>0,021</b>	23,6
Christensenellaceae	<b>0,021</b>	<b>0,014</b>	<b>0,018</b>	<b>28,3</b>
Burkholderiaceae	<b>0,014</b>	<b>0,007</b>	<b>0,011</b>	<b>47,1</b>
Anaeroplasmataceae	<b>0,000</b>	<b>0,004</b>	<b>0,002</b>	<b>141,4</b>
Desulfovibrionaceae	<b>0,004</b>	<b>0,000</b>	<b>0,002</b>	<b>141,4</b>
unknown family	<b>0,000</b>	<b>0,004</b>	<b>0,002</b>	<b>141,4</b>

# 16s –(pyro)sequencing (métagénétique) : bilan

- Pas de traitement immédiat
  - Rapide
- Non ciblée (= sans *a priori*)
  - Biais liés à extraction
    - Biais liés à PCR
  - Affectée par nbre copies ADN16s
    - Peu sensible ( $> 10^8$  bact.g<sup>-1</sup>)
  - Quantification relative seulement
    - Comparabilité : ???

# Détails des méthodes « haut-débit » appliquées au microbiote



## 16s –(pyro)sequencing (métagénétique)



ADN 16s

Tri séquences  
Homologie /RDP

actuelle

Ex Andersson et al  
PLoS One 2008

Taxons

Richesse

Diversité

Similarité

## Métagénomique



Totalité  
génomique

Tri séquences  
Homologie/  
« catalogues  
de référence »

En plein essor

\*Gènes  
bactériens  
\*Méta-  
espèces

Ex: Gill et al  
Science 2006  
Qin et al Nature 2010

-> aperçu du potentiel fonctionnel.

<http://fr.wikipedia.org/wiki/M%C3%A9tag%C3%A9nomique>

Adapté de Doré J, 19ème Colloque sur le Contrôle  
Epidémiologique des Maladies Infectieuses, 2016

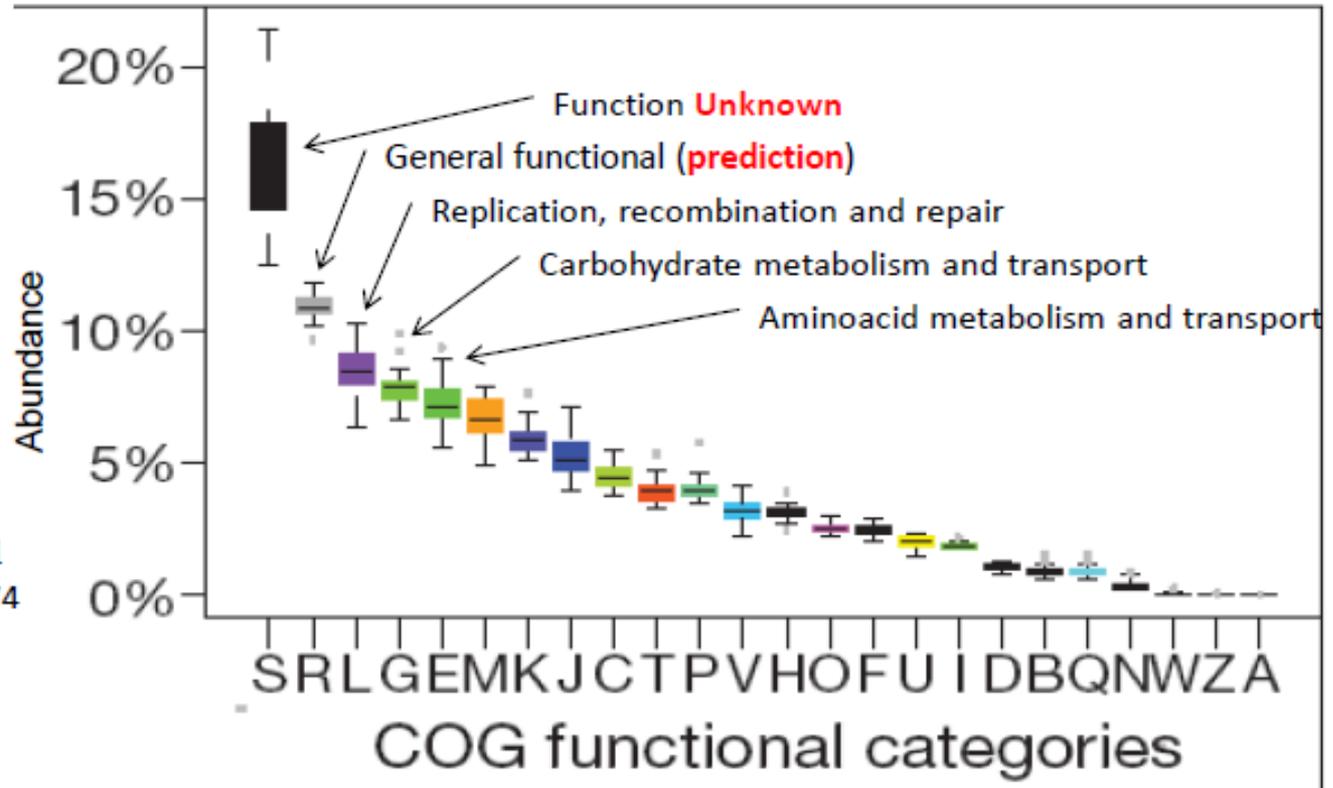
# La métagénomique : accès au potentiel métabolique du $\mu$ biote ?

- ✓ Env 500000 gènes bact/ individu (/10 millions potentiels)
- ✓ 19000 fonctions (dt 6000 communes à tous)

Li et al Nat Biotechnol 2014;32:834  
Qin et al Nature 2010;464:59



**Largement méconnues !**



Arumugan et al 2011  
Nature 473(7346):174

- ➔
- ✓ Env 25 fois plus de gènes bactériens que de gènes de l'hôte !
  - ✓ Un potentiel métabolique comparable à celui du foie !

# Métagénomique : exemples

## Exploitation du nombre de gènes

Nbre individus	LCG	HCG	Total
non obèses (BMI>30)	18 (14,6%)	105 (85,4%)	123
obèses (BMI>=30)	50 (29,6%)	119 (70,4%)	169

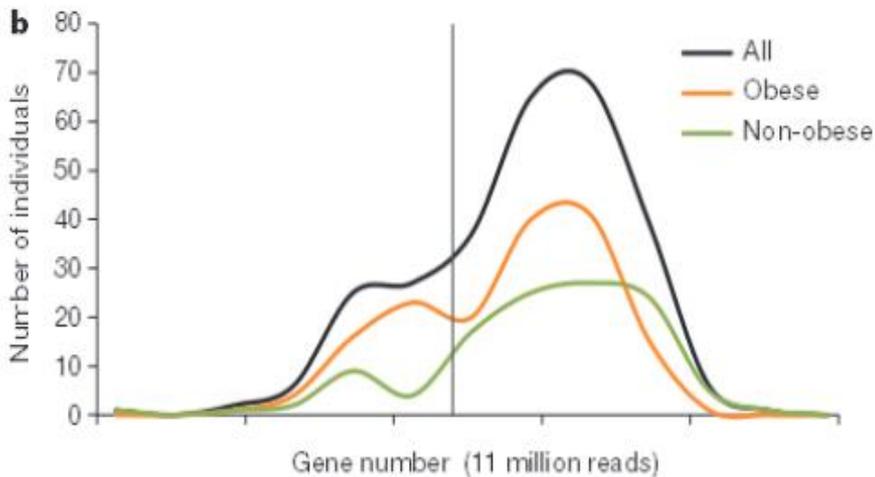
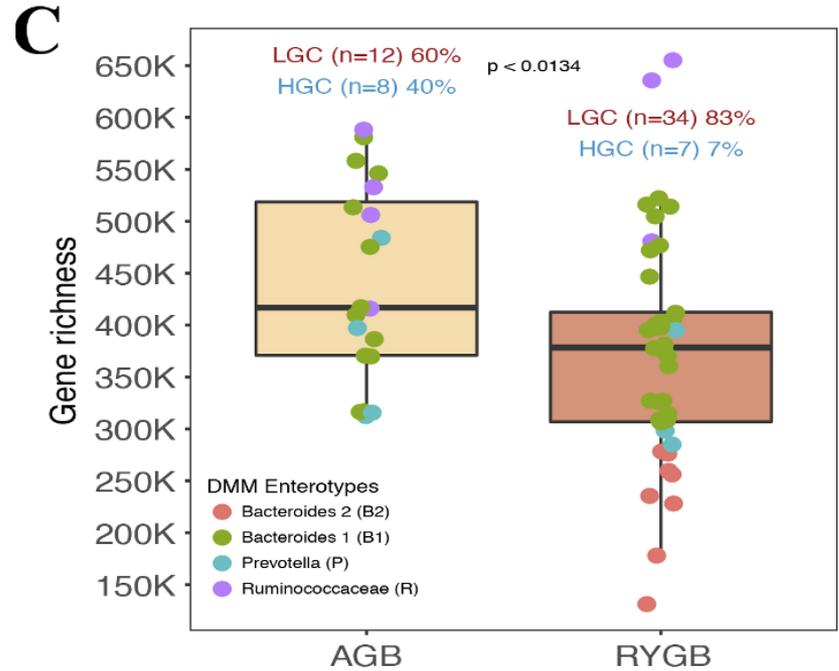


Figure 1 | Distribution of low and high gene count individuals (n = 292).

Le Chatelier et al, Nature 2013;500(7464):541

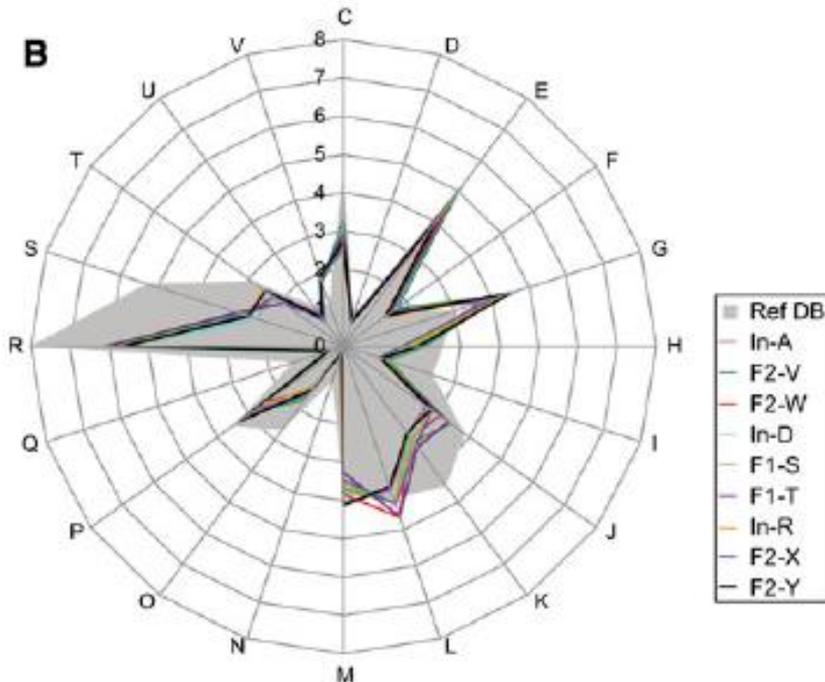


C) Baseline microbial gene richness in obese patients with adjustable gastric banding (AGB, n=20) or Roux-en-Y-gastric bypass (RYGB, n=41) [HGC, high gene count; LGC, low gene count]

Aron-Wisnewsky J, et al. Gut 2018

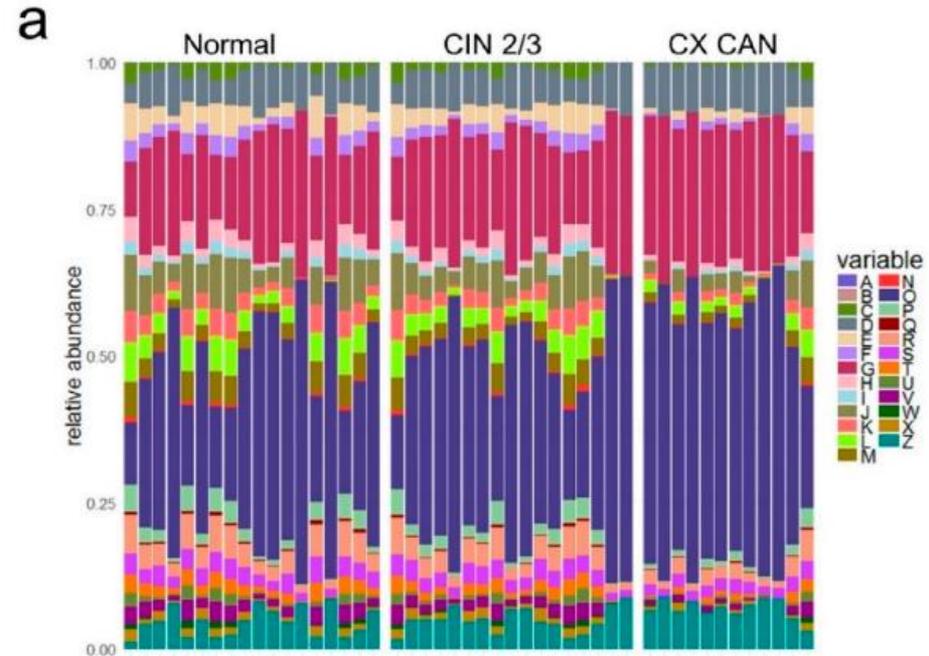
# Métagénomique : exemples

Exploitation selon catégories de gènes  
(en référence à une « banque de gènes »)



Comparison of the distribution patterns of COG-assigned genes in the nine microbiomes from adults and children as compared to Ref-DB (mix of ca 250 genomes from non-intestinal bacteria)

Kurokawa et al DNA Res, 2007, 14: 169.



Distribution of relative abundances of COG categories  
For subjects suffering cervical intraepithelial neoplasia 2/3 (n = 17),  
cervical cancer (n = 12), and normal controls (n = 18)

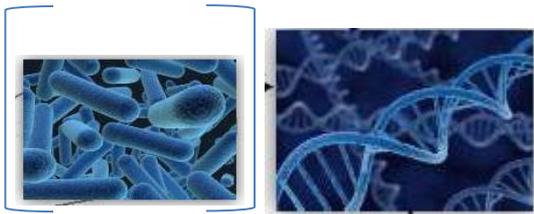
Kwon et al Cancers 2019, 11, 309

# Métagénomique : bilan

(Pas de traitement immédiat)  
Caractérisation du potentiel fonctionnel  
(+ taxonomie)  
*Sans a priori*

Semi quantitative  
Exploitation suppose catalogue de référence  
Comparabilité traitement bioinfo  
Très coûteuse  
Sensibilité ???

# Détails des méthodes « haut-débit » appliquées au microbiote



## 16s –(pyro)sequencing (métagénétique)



ADN 16s

Tri séquences  
Homologie /RDP

Ex Andersson et al  
PLoS One 2008

Taxons

Richesse

Diversité

Similarité

actuelle

## Métagénomique fonctionnelle

Clonage &  
transformation

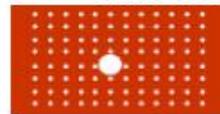
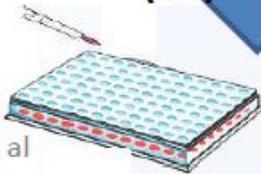


*E. coli* DH10B

(co)-culture

Substrat  
d'intérêt

Cellules avec gène  
rapporteur



Ex Lakhdari et al  
PLoS One 2010

Ex Tasse et al  
GenomRes 2010

Genes bactériens (puis protéines)  
responsables fonction spécifique

## Métagénomique



Totalité  
génom

Tri séquences  
Homologie/  
« catalogues  
de référence »

\*Gènes  
bactériens  
\*Méta-  
espèces

En plein essor

Ex: Gill et al  
Science 2006

Qin et al Nature 2010

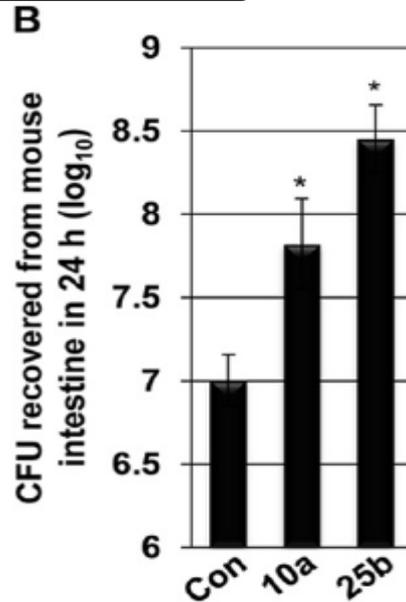
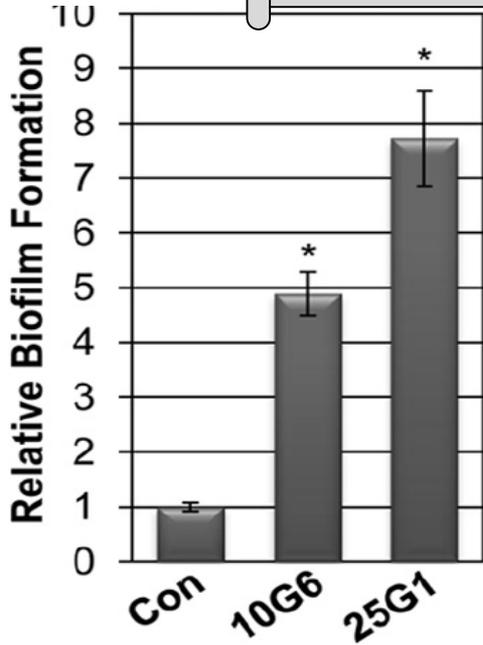
-> aperçu du potentiel fonctionnel.

<http://fr.wikipedia.org/wiki/M%C3%A9tag%C3%A9nomique>

Adapté de Doré J, 19ème Colloque sur le Contrôle  
Epidémiologique des Maladies Infectieuses, 2016

# 1. Méthodes d'études du microbiote bactérien digestif : métagénomique fonctionnelle

Approche  
« clones seuls »



Yoon et al AEM 2013;79(12):3829

➤ Idéale ?

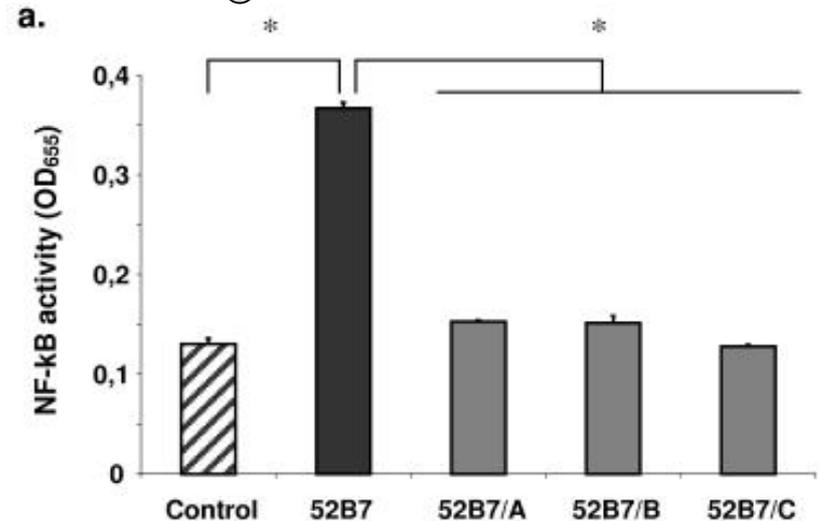
➤ Coûteuse

➤ Suppose que gènes bactériens s'expriment ds bactérie clônée

➤ Suppose développement tests fonctionnels simples

➤ Pertinence / *in vivo* ?

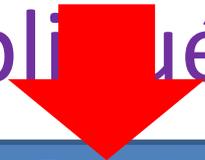
Approche  
« co-culture clones & cellules transformées »



Exemple de criblage biologique

(Lakhdari et al PLoS One 2010 ;5(9). pii: e13092)

# Limites des méthodes « haut-débit » appliquées au microbiote



OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

BMC Microbiology

Open Access

## Evaluation of 16S rDNA-Based Community Profiling for Human Microbiome Research

Jumpstart Consortium Human Microbiome Project Data Generation Working Group\*<sup>1</sup>

Wesolowska-Andersen et al. *Microbiome* 2014, 2:19  
<http://www.microbiomejournal.com/content/2/1/19>

**RESEARCH** **Open Access**

Choice of bacterial DNA extraction method from fecal material influences community structure as evaluated by metagenomic analysis

Agata Wesolowska-Andersen<sup>1</sup>, Martin Jain Bahi<sup>2</sup>, Vera Carvalho<sup>2</sup>, Karsten Kristiansen<sup>3</sup>, Thomas Scheitz-Pontén<sup>1</sup>, Ramneek Gupta<sup>1\*</sup> and Tine Rask Licht<sup>2\*</sup>

Cardona et al. *BMC Microbiology* 2012, 12:158  
<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/12/158>

Wu et al. *BMC Microbiology* 2014,  
<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/14/71-2180/12/158>

**METHODOLOGY ARTICLE** **Open Access**

Sampling and pyrosequencing methods for characterizing bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags

Gary D Wu<sup>2,1\*</sup>, James D Lewis<sup>2,3,1</sup>, Christian Hoffmann<sup>1,6</sup>, Ying-Yu Chen<sup>7</sup>, Rob Knight<sup>5,7</sup>, Kyle Bittinger<sup>1</sup>, Jennifer Hwang<sup>1</sup>, Jun Chen<sup>3,4</sup>, Ronald Berkowsky<sup>2</sup>, Lisa Nessel<sup>1</sup>, Hongzhe Li<sup>3,4</sup>, Frederic D Bushman<sup>1</sup>

BMC Microbiology

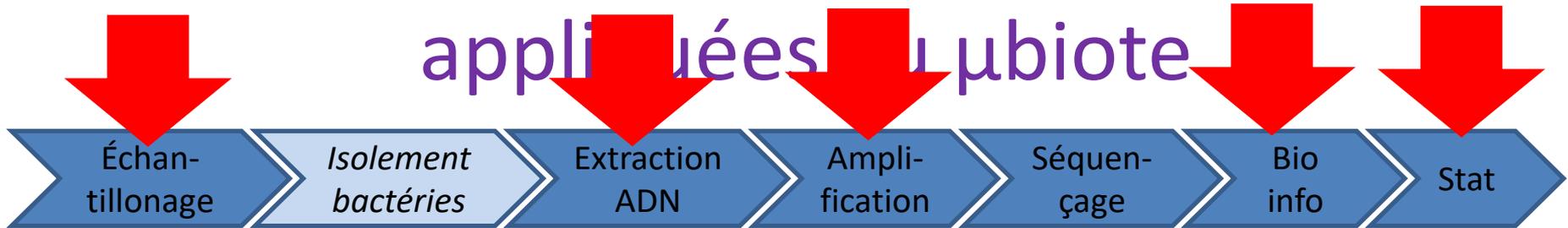
**RESEARCH ARTICLE**

**Open Access**

## Storage conditions of intestinal microbiota matter in metagenomic analysis

Silvia Cardona<sup>1</sup>, Anat Eck<sup>1</sup>, Montserrat Cassellas<sup>1</sup>, Milagros Gallart<sup>1</sup>, Carmen Alastrue<sup>1</sup>, Joel Dore<sup>2</sup>, Fernando Azpiroz<sup>1</sup>, Joaquim Roca<sup>3</sup>, Francisco Guarner<sup>1</sup> and Chaysavanh Manichanh<sup>1\*</sup>

# Limites des méthodes « haut-débit » appliquées au microbiote



The ISME Journal (2011) 5, 1303–1313  
© 2011 International Society for Microbial Ecology All rights reserved 1751-7362/11  
www.nature.com/ismej



## ORIGINAL ARTICLE

### Reproducibility and quantitation of amplicon sequencing-based detection

Jizhong Zhou<sup>1,2,3,4</sup>, Liyou Wu<sup>2,4</sup>, Ye Deng<sup>2</sup>, Xiaoyang Zhi<sup>2</sup>, Yi-Huei Jiang<sup>2</sup>, Qichao Tu<sup>2</sup>, Jianping Xie<sup>2</sup>, Joy D Van Nostrand<sup>2</sup>, Zhili He<sup>2</sup> and Yunfeng Yang<sup>1</sup>

non-warming, or between clipping and non-clipping. Taken together, these results suggest that amplicon sequencing-based detection is useful in analyzing microbial community structure even though it is not reproducible and quantitative. However, great caution should be taken in experimental design and data interpretation when the amplicon sequencing-based detection approach is used for quantitative analysis of the  $\beta$ -diversity of microbial communities.

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS COMPUTATIONAL BIOLOGY

## Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible

Paul J. McMurdie, Susan Holmes\*

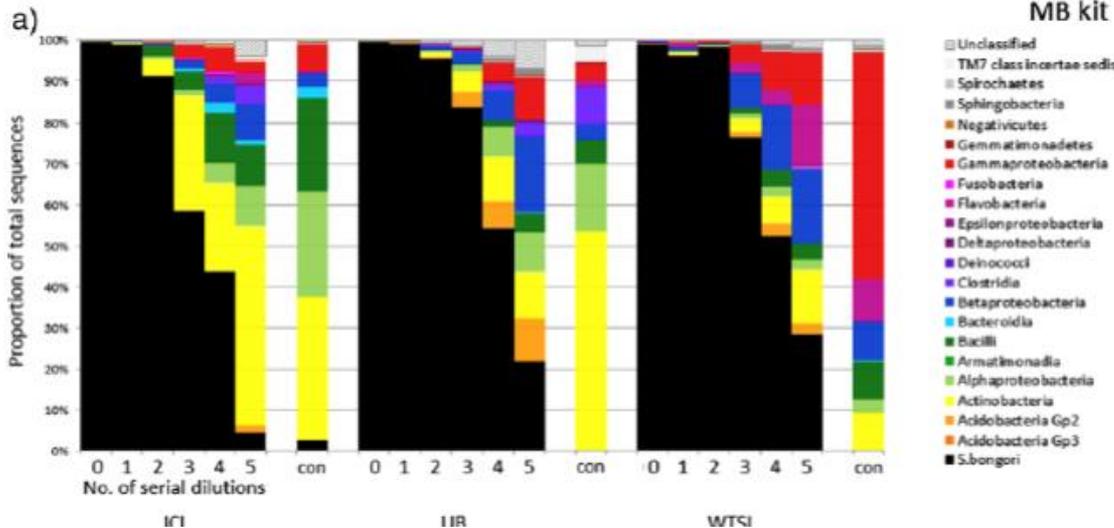
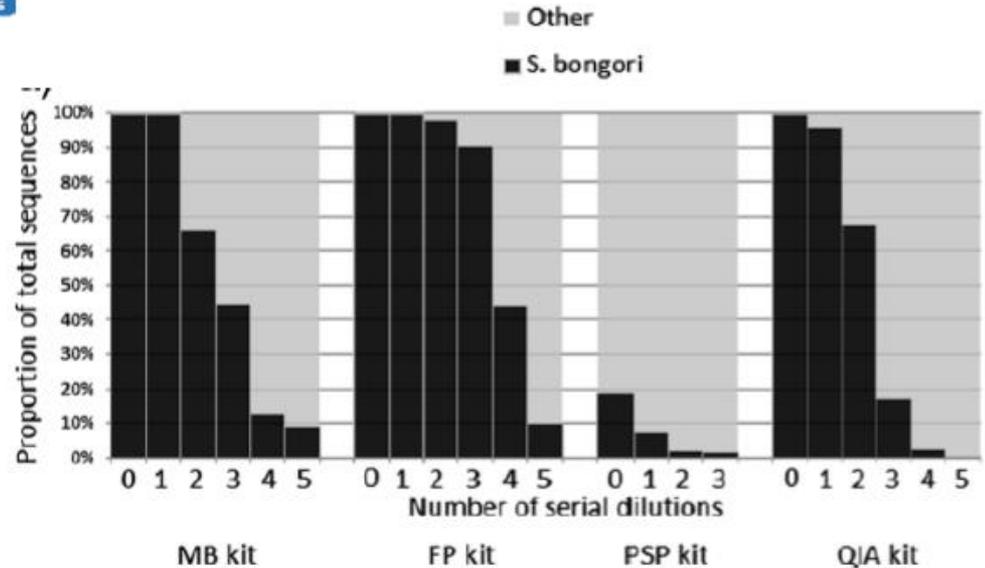
Statistics Department, Stanford University, Stanford, California, United States of America

# Illustration de biais potentiels

## Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses

Susannah J Salter<sup>1\*</sup>, Michael J Cox<sup>2</sup>, Elena M Turek<sup>2</sup>, Szymon T Calus<sup>3</sup>, William O Cookson<sup>2</sup>, Miriam F Moffatt<sup>2</sup>, Paul Turner<sup>4,5</sup>, Julian Parkhill<sup>1</sup>, Nicholas J Loman<sup>3</sup> and Alan W Walker<sup>1,6\*</sup>

### Impact du kit d'extraction



### Impact de l'environnement de travail

# Au final quelles évolutions en 30 ans ?

<1990  
culture  
pasteurienne

Milieus  
sélectifs  
+/- pré-  
traitements  
+/-  
Identification  
phénotypique

1990-2004  
Développement  
méthodes BioMol  
(ADN / ARN 16s)

Clonage +  
sequençage

DotBlot  
/ FISH

DGGE/  
TGGE

Cytofluoro-  
metrie  
RFLP  
DHPLC

qPCR

> 2005  
Méthodes « haut débit »  
(ADN 16S, ADN total)

16s -  
pyrosequencing

Métagénomique

Métagénomique  
fonctionnelle

Avenir =  
Méta-  
Transcrip-  
tomique?



Quel % gènes  
exprimés ?  
Quelle régulation ?

- Germes anaérobies ultra-dominants
- Env 40 genres
- Env 300 espèces
- Clostridies = pathogènes, sous-dominants

- 6 à 8 phyla principaux (F et B ultra-dominants)
- Env 30 genres (surtout anaérobies)
- 150 à 400 espèces/ individu (/1000 potentielles)
- Env 500000 gènes bact/ individu (/10 M potentiels)
- 19000 fonctions (dt 6000 communes à tous)
- + des virus ! (10x/bactéries)

% élevé incultivables (30 à 80%)  
Révision taxonomie sur base 16s  
Clostridies = commensaux, ultra-dominants  
Spécificité d'hôte

Quantification absolue

Spécificité

Sensibilité

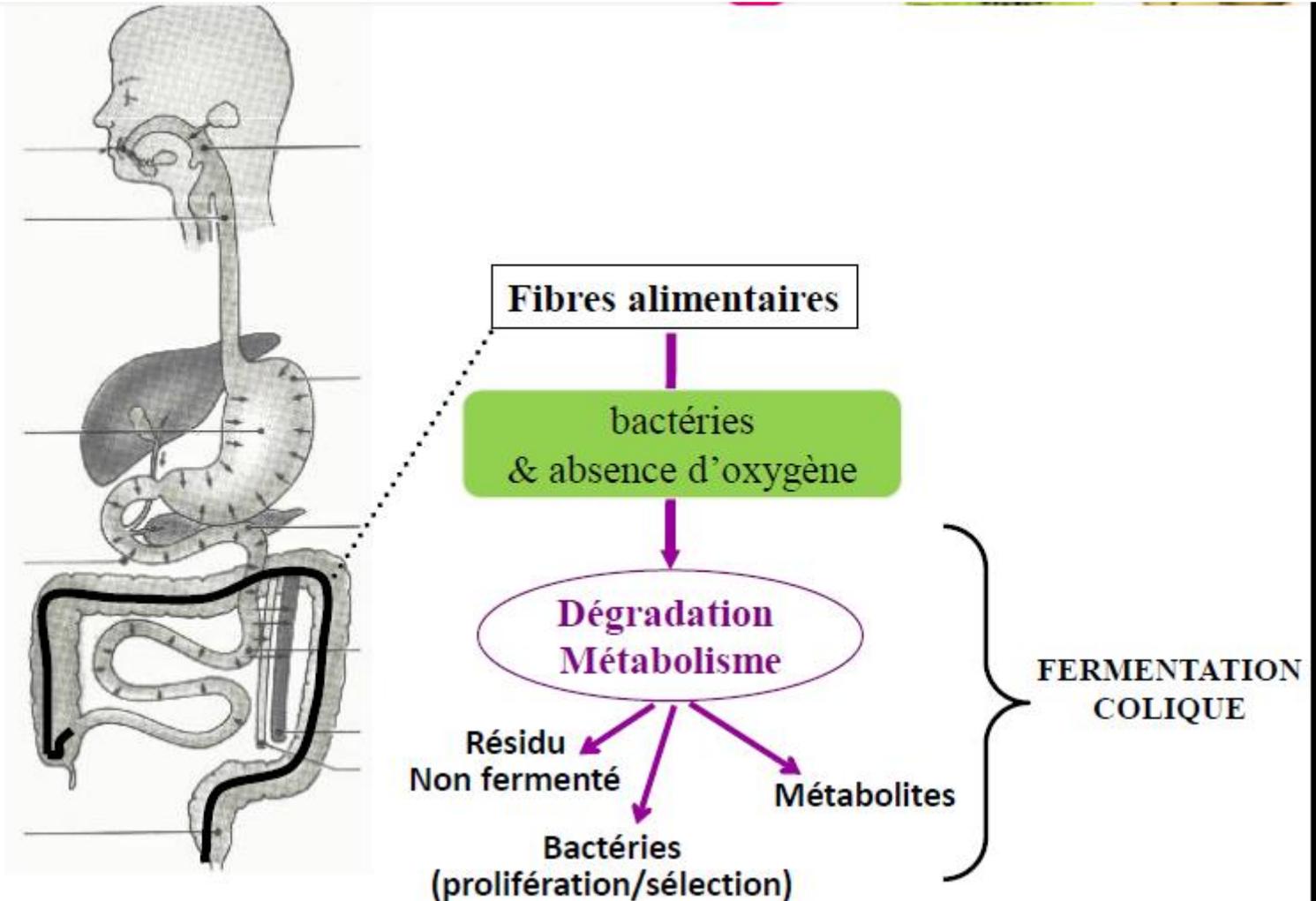
Évolution taxonomie  
+ diversité modalités d'analyses



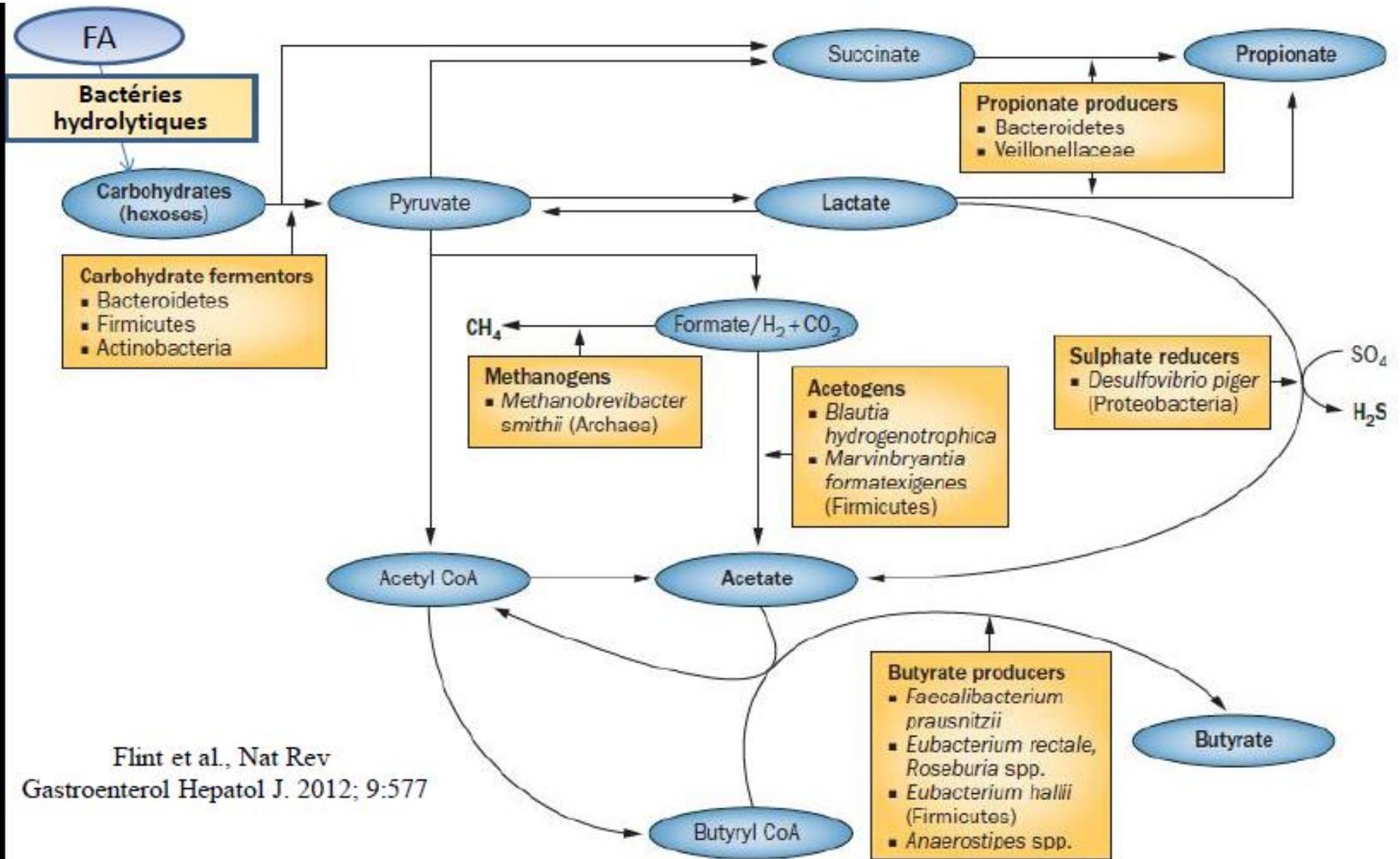
Comparabilité délicate !  
Restez critiques !

# **Méthodes d'exploration de l'activité du microbiote intestinal**

# Qu'appelle t-on « fermentation colique » ?



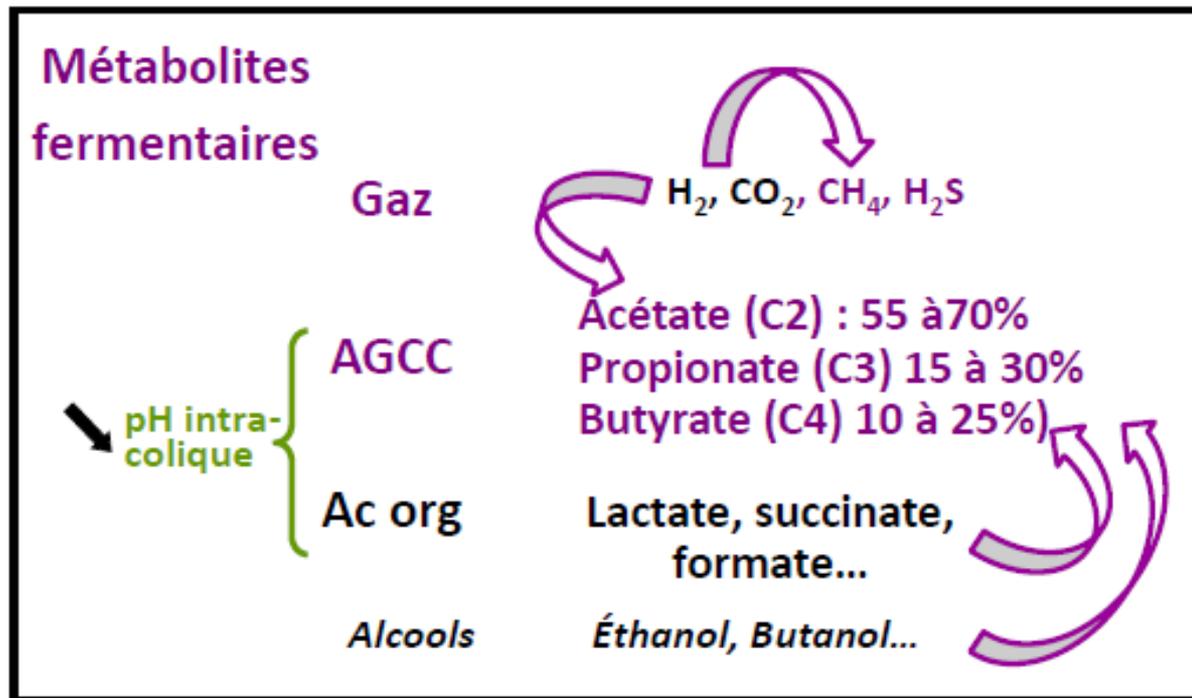
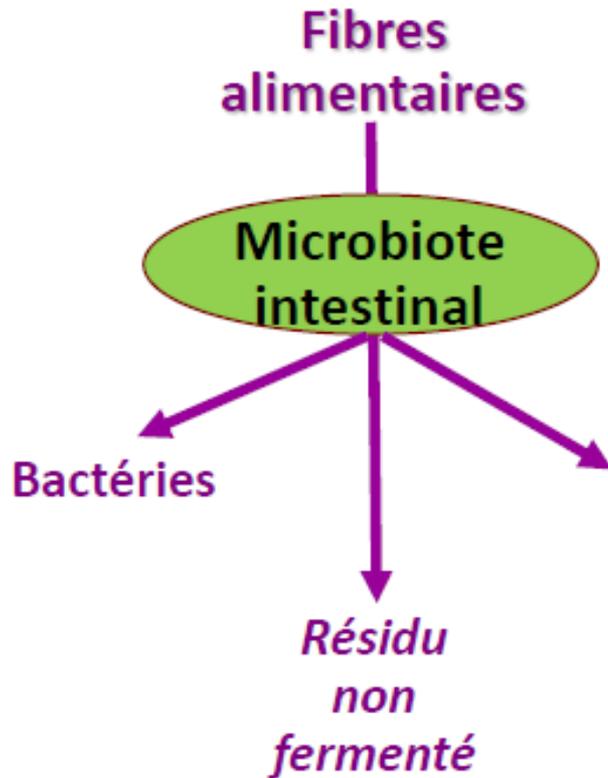
# NB: fermentation des FA requiert coopérations inter-bactériennes



Flint et al., Nat Rev Gastroenterol Hepatol J. 2012; 9:577

# Quels sont les produits des fermentations ?

## Cas de FA



# Une grande diversité de constituants peut servir de substrats pour les bactéries intestinales



**Paroi cellulaires Végétales**  
 ex : pectines, hemicelluloses, Cellulose, polysaccharides algaux, gommes

**Fibres alimentaires**

0 5 10 15 20 25 30 35  
 quantité (g.j-1)

Mucus, cellules, enzymes, sels biliaires

Graines, cellules entières

Légumes, tubercules, Produits transformés

Lactose, sucres-alcools, Sucres synthétiques

Féculets, Produits transformés

endogène

protéines

Oligo-saccharides

Sucres non absorbés

Amidon résistant

+ microcomposés (ex polyphénols), xénobiotiques...

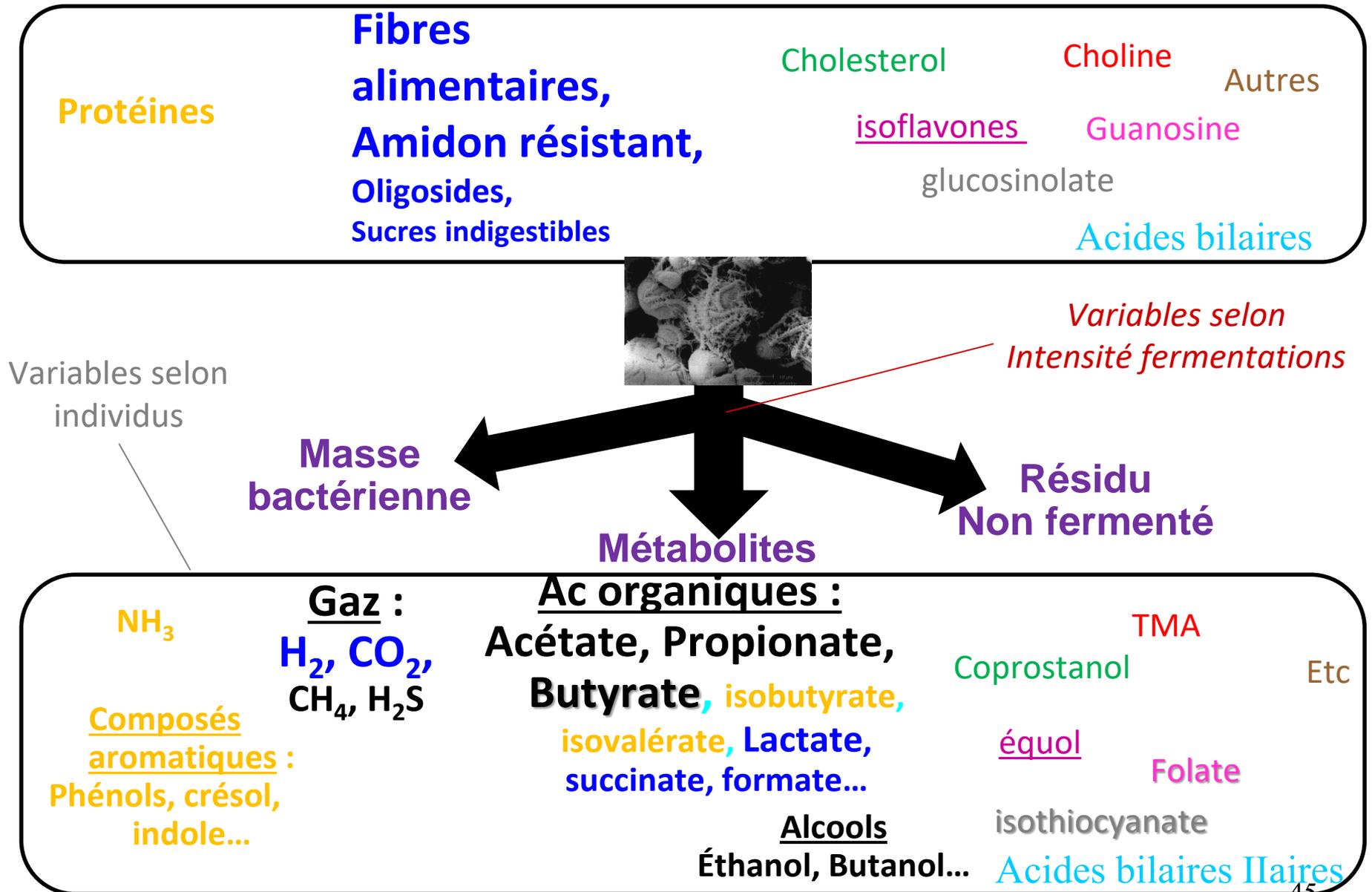
Quantitativement : essentiellement des glucides

Mais pas seulement ...

➡ « fermentations » au pluriel !

COST Action 92, 1992-1995  
 Cummings et Macfarlane, 1991  
 FLAIR - EURESTA, 1990-1994  
 Gerard & Bernalier 2007

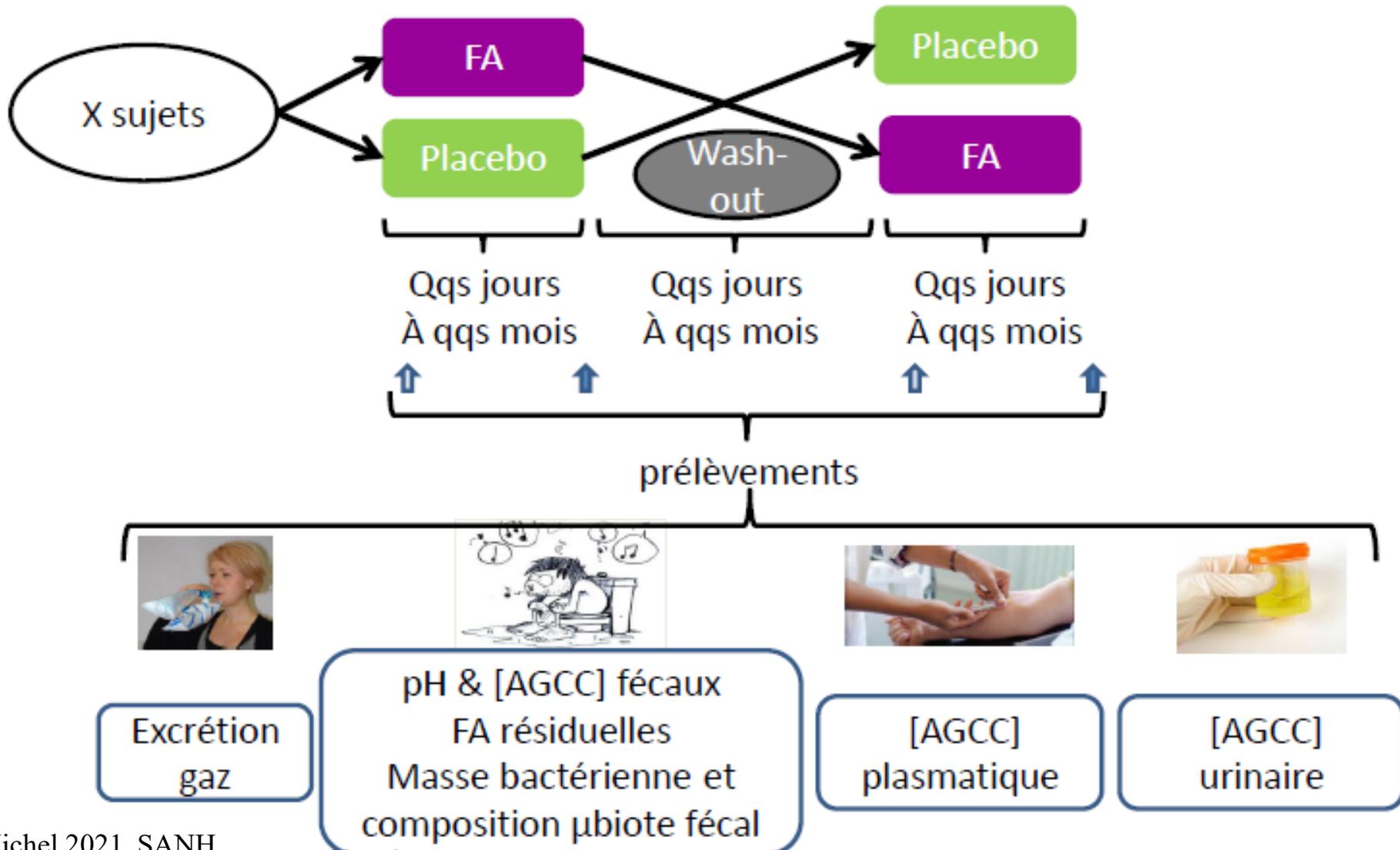
# Les fermentations génèrent une grande diversité de métabolites



# Exploration de la fermentation des FA *in vivo*:

## Homme

### Supplémentation régime avec FA vs Placebo



# Exploration de la fermentation des FA *in vivo* chez l'Homme :

## Utilisation des gaz expiratoires

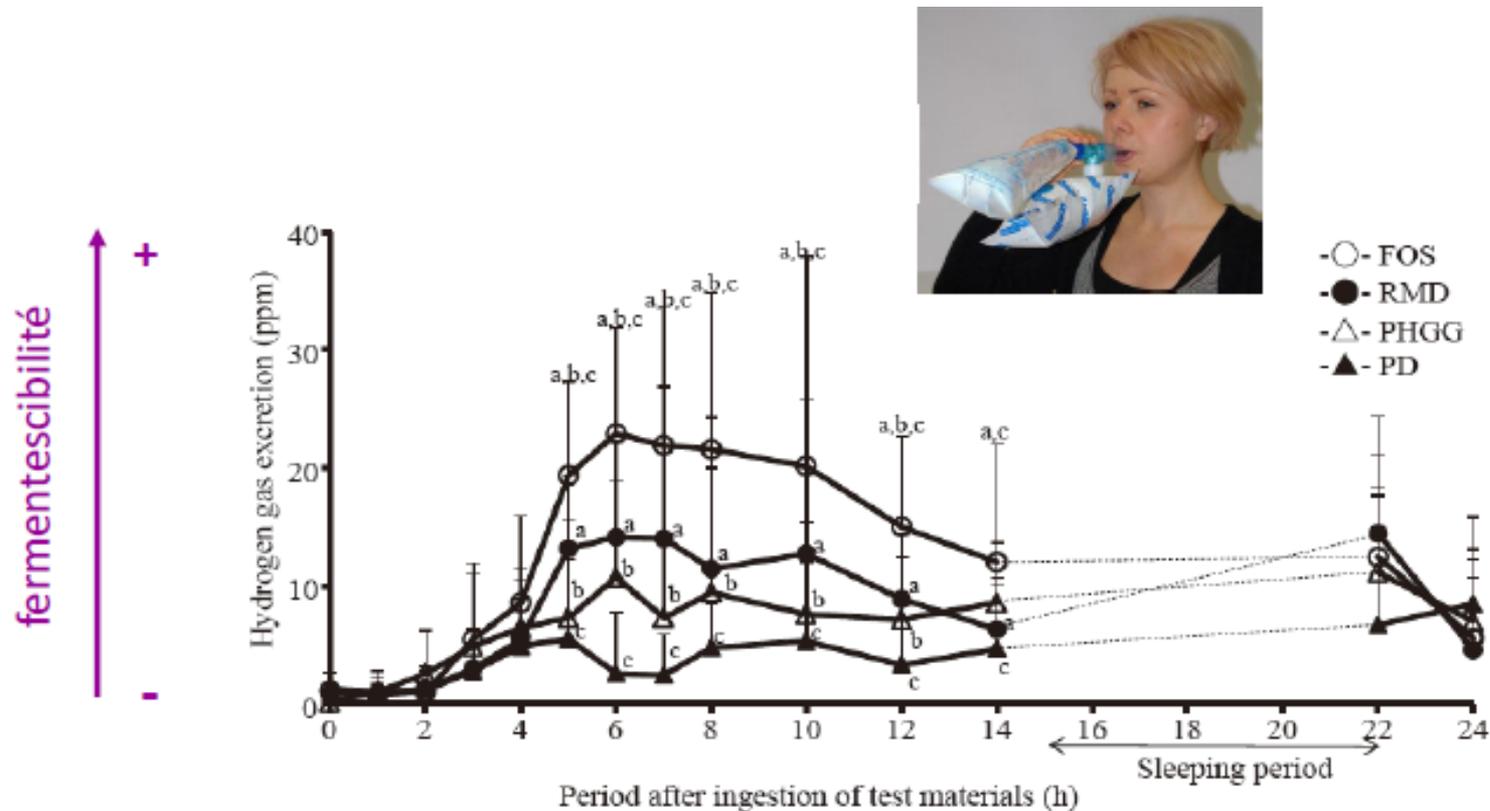
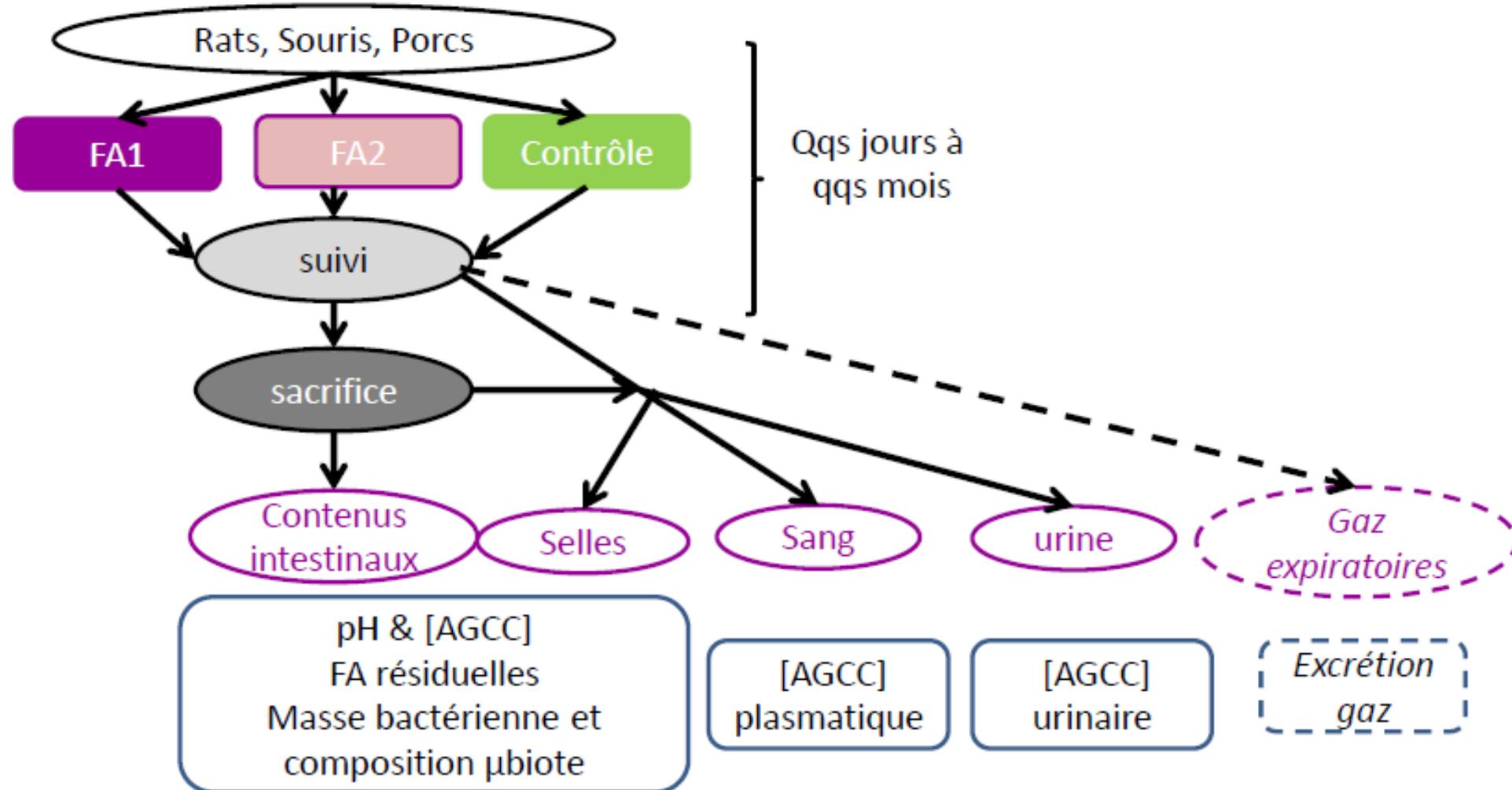


Fig. 2. Profiles of breath hydrogen excretion by oral ingestion of polydextrose (PD), resistant maltodextrin (RMD), and partially hydrolyzed guar gum (PHGG) in healthy subjects. Data are expressed as the mean and SD ( $n=9$ ). a-c: significantly different between the same letters at each time point, at  $p < 0.05$  by Dunnett's post hoc test. FOS: fructooligosaccharide used as a reference.

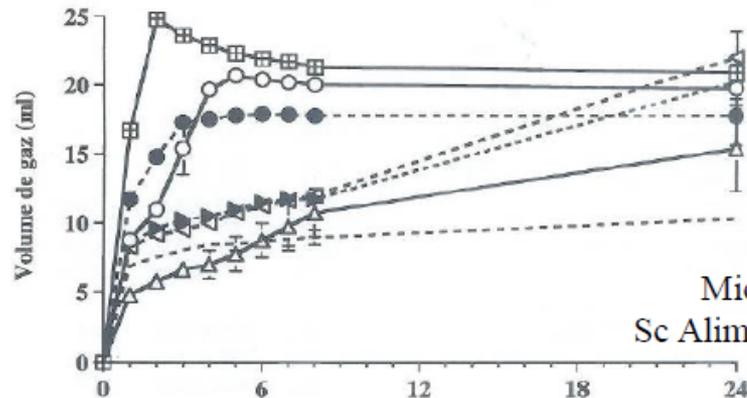
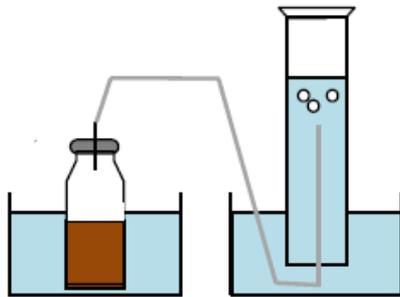
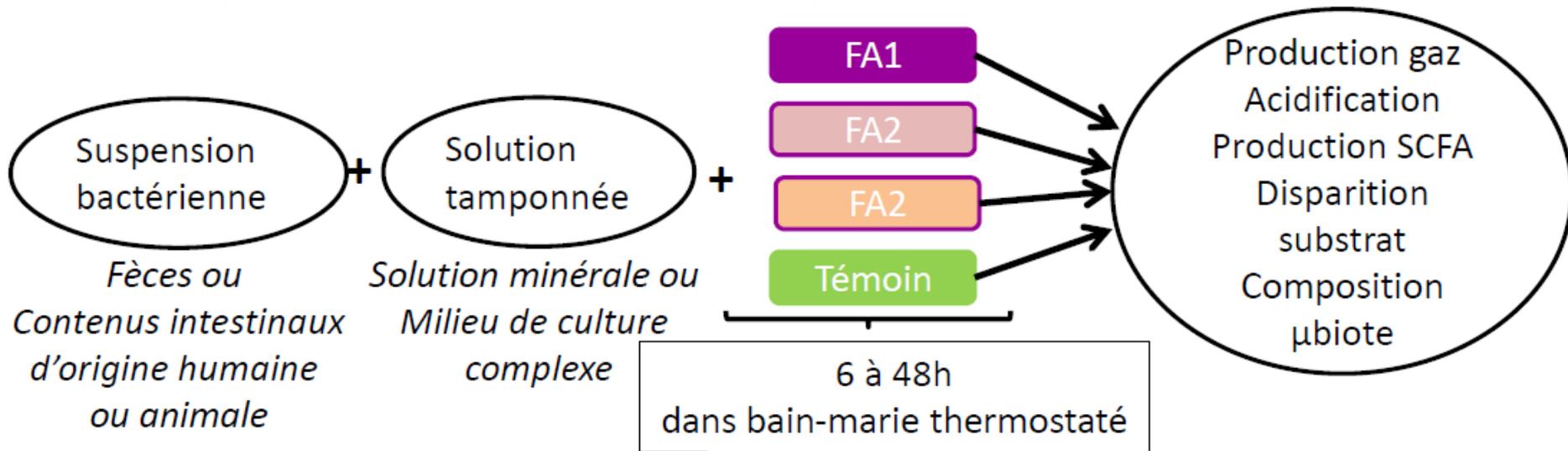
# Exploration de la fermentation des FA *in vivo*: Animal

Comparaison régime enrichi en FA vs régime contrôle



# Exploration de la fermentation des FA *in vitro* :

## Systemes clos (= « batch »)



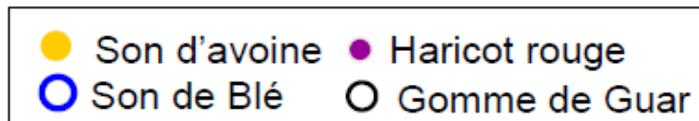
Michel et al  
Sc Alim 1999 19:311

Avec OAS (◁) : oligo-alginates obtenus par hydrolyse acide ; OAI (▲) : oligo-alginates obtenus par dégradation enzymatique ; OL (●) : oligo-laminaranes ; FOS (◻) : fructo-oligosides ; AN (△) : alginates natifs ; LN (○) : laminaranes natifs ; inoculum (- - -).

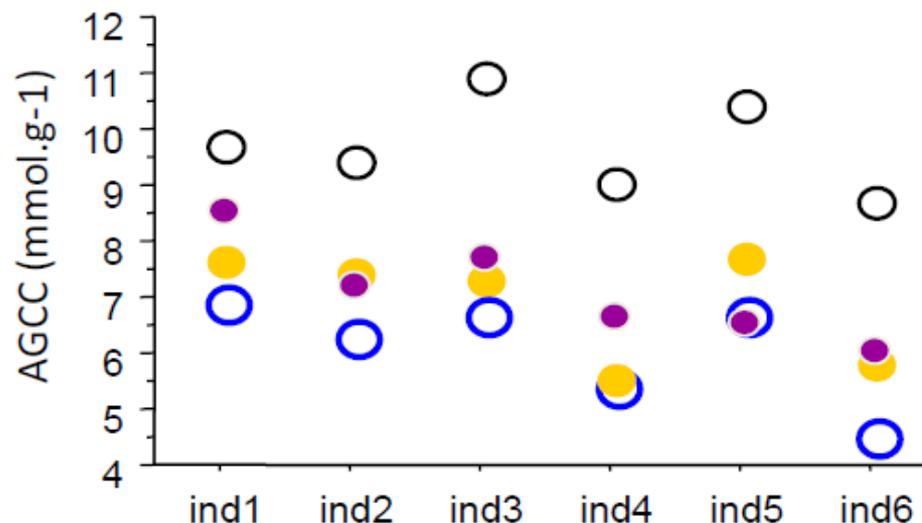
# Exemple d'exploration de la fermentation des FA en « batch » :

## Etude des variations inter-individuelles

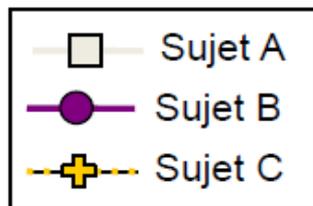
### Intensité fermentaire



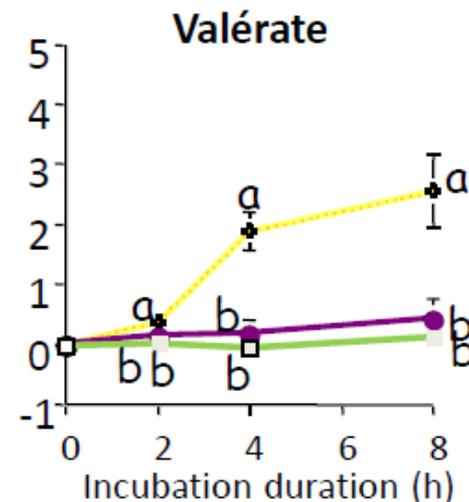
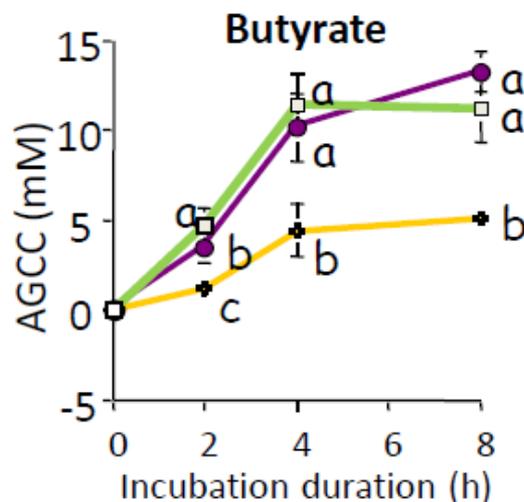
(McBurney & Thompson Scand  
J Gastroenterol 1989;24:359)



### Orientation métabolique

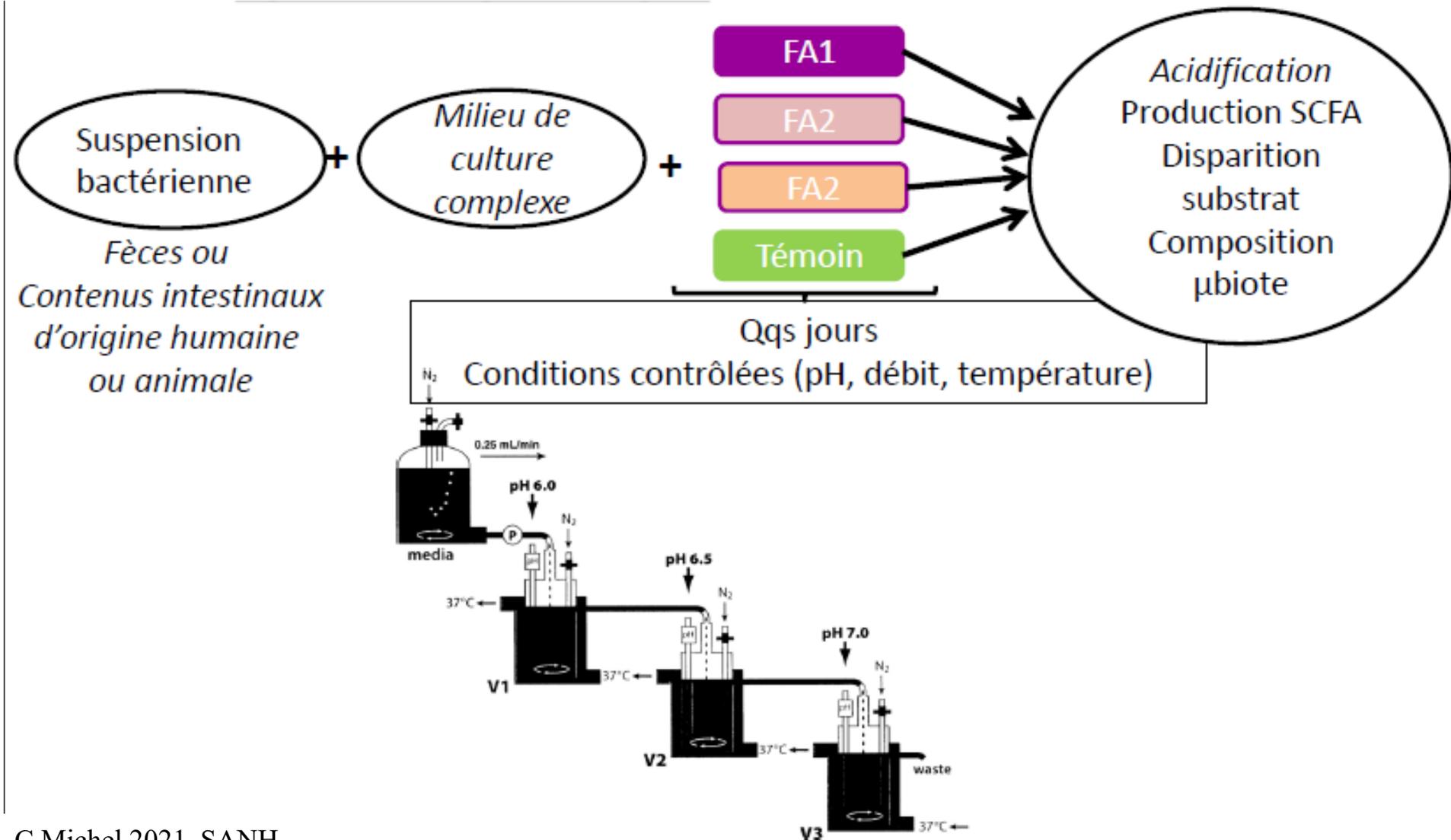


(Bourriaud et al JAM. 2005;99:201)



# Exploration de la fermentation des FA *in vitro* :

## Systemes dynamique (= « chémostat »)



# Exploration de la fermentation des FA :

## Bilan

	<i>In vivo</i>		<i>In vitro</i>	
	Homme	Animal	Batch	Chémostat
limites	Pas d'accès au site de fermentation Ne tient pas compte absorption des métabolites	Différences/H (microbiote, physiologie, ...)	Accumulation métabolites Microbiote humain = fécal	<i>Pas d'absorption</i> <i>Substrats solubles</i> Microbiote humain = fécal
avantages	Intègre spécificités microbiote & physiologie	Accès aux contenus Intègre physiologie	Multiples comparaisons	Contrôle pH, débits, ...



**Aucun système « parfait »!**

# Méthodes d'exploration de l'activité du microbiote intestinal

## QUE RETENIR ?

- ✓ Co-existence de différentes méthodes
- ✓ Aucune parfaite

## Les combiner !