



BACTÉRIES RARES

En une seule après-midi, distinguer simultanément les séquences d'ADN caractéristiques de milliers de bactéries et ainsi retracer les micro-organismes rares. C'est possible avec le pyroséquençage. Mais il y a encore des maladies de jeunesse. 'À cause du grand nombre de données, il est pratiquement impossible de détecter des erreurs.'

HIDDE BOERSMA

“**N**ous sommes intéressés par les habitants rares qui résident dans la bouche”, déclare Bart Keijser, chercheur en génomique microbienne à l'institut néerlandais de recherche TNO. Selon les estimations, il y a environ 600 à 800 bactéries qui se logent entre vos dents dans la bouche. Dix d'entre elles contiennent en réalité 99 pour cent de toutes les cellules. Si vous essayez de séquencer cette communauté microbienne par la méthode dite de Sanger selon laquelle le génome humain est également décrypté, vous obtenez uniquement des informations sur ces dix espèces. “Nous pouvons déjà en tirer beaucoup d'informations. Nous sommes

intéressés par les habitants rares. Il s'avère qu'ils sont très importants mais jusqu'à il y a peu, ils restaient encore invisibles.”

Par une nouvelle méthode pour détecter les séquences d'ADN, le pyroséquençage, il est possible de les trouver. La méthode est appelée ainsi en raison du pyrophosphate qui se libère pendant le séquençage et qui à son tour génère un

'Des bactéries buccales très rares aident à prévenir les caries'

signal lumineux. Contrairement à cette méthode bien établie de Sanger, il n'est plus nécessaire de mettre d'abord tous les

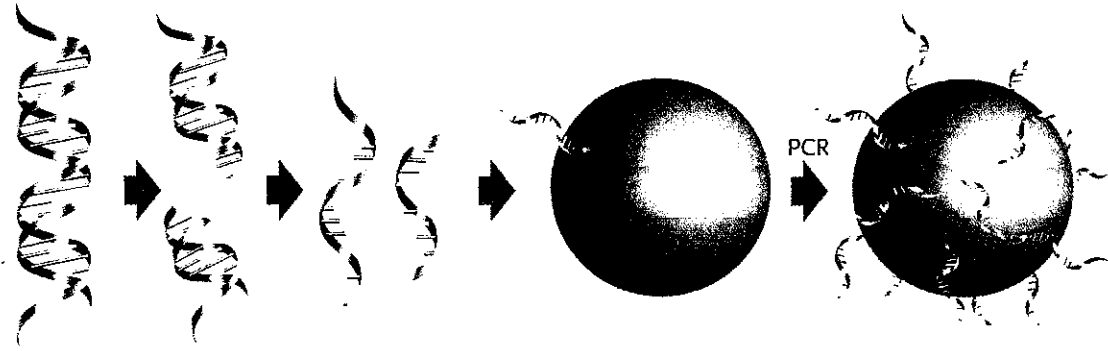
fragments d'ADN séparément dans leur propre bactérie et de les cultiver sur une plaque d'agar pour les scinder en particules d'ADN. Par cette méthode, il était pratiquement impossible de prélever l'ADN des bactéries rares. Plus de 99,9 pour cent des bactéries auxiliaires cultivées sur l'agar contiennent notamment les particules d'ADN des bactéries les plus courantes. Ensuite, pour trouver le 0,1 pour cent de bactérie rare souhaité, il faudrait analyser des millions de colonies de bactéries. Ce travail est beaucoup trop fastidieux.

Le pyroséquençage rend cette étape de scission superflue par la pose de toutes les particules d'ADN à séquencer sur une bille magnétique séparée. Elles se logent ensuite séparément dans une cavité d'une plaque picotiter (voir cadre). Un *passage*

COMMENT FONCTIONNE LE PYROSÉQUENÇAGE?

Étape 1

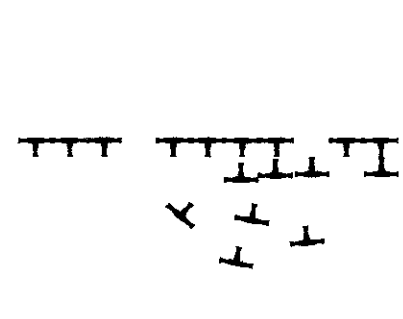
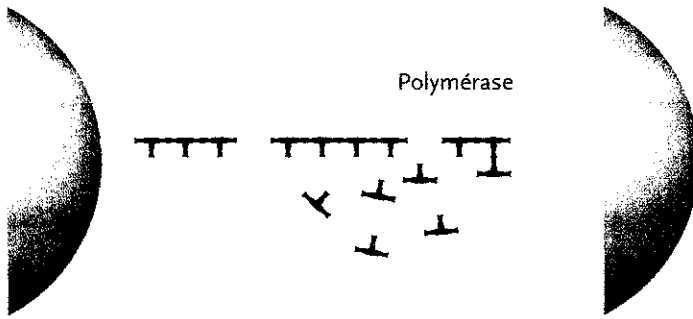
Fixez de l'ADN monofilaire sur une bille magnétique.



Ensuite, grâce à un aimant, chaque bille tombe dans une cavité unique et le séquençage peut avoir lieu à l'étape suivante. Ajoutez-y toujours l'un des quatre nucléotides A, C, G ou T. Si le nucléotide est complémentaire à l'ADN monofilaire à hauteur de la polymérase, il se lie. Lors de cette liaison, il y a une libération de pyrophosphate (PPi). L'enzyme ATP sulfurylase en a besoin pour fabriquer un vecteur d'énergie ATP, ce qui dégage à son tour de la luciférase. L'intensité de ce signal indique ensuite à quelle fréquence le même nucléotide se succède dans la séquence à déterminer.

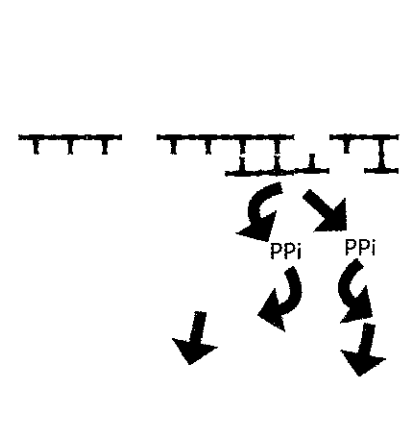
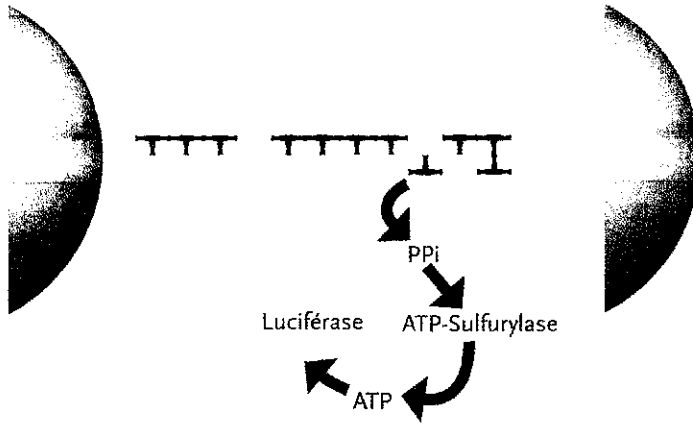
Étape 2a

Étape 3a



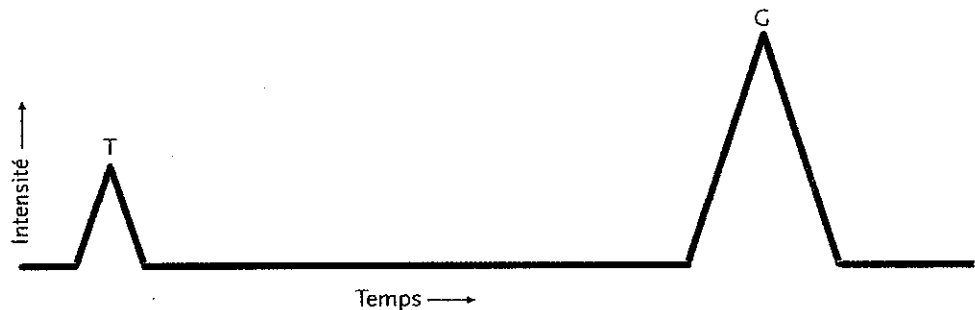
Étape 2b

Étape 3b



Légende

- T
- G
- A
- C





'Le pyroséquençage engendre une surestimation du nombre de espèces'

► au pyroséquençage fournit ainsi des centaines de millions de paires de base en une seule demi-journée, sans l'intervention d'un grand nombre d'analystes. Il s'agit cependant de particules d'une longueur limitée à un maximum d'environ 400 bases.

DE NOMBREUX PRÉJUGÉS

La microbiologie convient parfaitement pour des particules aussi petites. Les microbiologistes peuvent identifier des bactéries ou nommer les nouvelles sur base de quelques centaines de paires de base seulement. Pour la reconnaissance d'espèces, ils utilisent souvent des parties de signature spéciales d'ADN, le fameux gène ARN ribosomique 16 S (16S rRNA). Ce gène est responsable de la création de ribosomes; chaque bactérie en est donc dotée. Il est tellement essentiel qu'au sein d'une espèce, il n'y a que peu de changement génétique au fil du temps alors qu'il existe bien des différences évidentes entre les espèces. Ceci vous permet de déterminer à quelle bactérie il appartient avec une petite particule d'ADN. "Le pyroséquençage est donc idéal dans ce cas et son utilisation a augmenté de façon explosive au fil des ans", ajoute Keijser.

L'un de ces microbiologistes est Jan Dirk van Elsas, professeur en écologie microbienne à l'Université de Groningue. "Des 8.000 espèces bactériennes qui se trouvent dans 1 seul gramme de terre, nous n'en connaissons encore que fort peu", déclare-t-il.

"Auparavant, nous travaillions uniquement avec des bactéries cultivables que nous laissons se développer dans un médium dans une boîte de Pétri." C'était très limité: un seul pour cent de toutes

les bactéries du sol se laissent cultiver selon les estimations. "Par le séquençage avec l'ancienne méthode, nous atteignons le millier supérieur de la diversité des espèces, une avancée considérable. Mais cela signifie qu'encore une grande majorité des espèces de bactéries restent cachées. Selon les attentes, ces organismes non examinés devraient produire toutes sortes de matières intéressantes, comme des antibiotiques et des médicaments contre le cancer." C'est pourquoi Van Elsas est passé au pyroséquençage.

"Le pyroséquençage offre en outre une image moins distordue de la composition

'Si vous n'y prêtez pas garde, les erreurs s'accumulent dans la base de donnée des' espèces'

de l'espèce", ajoute-t-il. "Du fait qu'il faut moins d'étapes avant que l'ADN ne pénètre dans la machine, vous obtenez une meilleure vision des organismes réellement présents et de leur occurrence relative." En fait, toutes les particules d'ADN ne se laissent pas aussi facilement scinder et multiplier par une bactérie, le fameux clonage. "Avec ce type d'étapes de préparation, vous introduisiez donc auparavant une tendance déterminée."

L'étape de clonage peut être abandonnée en totalité dans le pyroséquençage, l'étape de copie (PCR) est cependant encore souvent nécessaire comme étape de prétraitement. "Si nous voulons séquencer tout l'ADN buccal, nous n'obtenons à nouveau qu'une vision des espèces les plus abondantes grâce au pyro-

séquençage", déclare Keijser. C'est pourquoi il copie d'abord le gène 16S rARN de toutes les bactéries avant de procéder au séquençage. "Dans le sol, il faut la même chose", ajoute Van Elsas.

UNE APPRÉHENSION MAL FONDÉE

Les études de diversité que les trois microbiologistes ont menées ces dernières années ont livré un trésor de nouvelles informations. L'heure est venue à présent de passer à l'étape suivante, indique Keijser. Une telle partie de signature ne dit encore rien sur la fonction éventuelle de l'organisme.

Ces informations sont en réalité déduites de l'enchevêtrement de séquences de gènes 16S rARN, selon lui. Keijser procède par exemple en comparant la diversité microbienne d'un nombre incroyablement important de bouches. "Lorsque vous réunissez toutes les conditions dans des analyses statistiques – par exemple avec ou sans plombages, ou encore pas de dents de lait – vous pouvez déterminer quelles bactéries sont importantes pour éviter les caries, sans d'ailleurs réellement mettre la main sur la bactérie."

Les chercheurs du TNO ont découvert qu'à cette fin, trois bactéries totalement inconnues – dont seulement quelques cellules par espèce se trouvent dans votre bouche – sont importantes. Ceci pave la voie vers une véritable dentisterie préventive. "Lorsqu'un dentiste constate par un simple test que ces bactéries ne sont plus présentes, il peut par exemple prescrire un aliment qui contient ces micro-organismes de façon à prévenir les caries. Sans pyroséquençage, nous ne serions jamais arrivés à cette conclusion."

La grande quantité de nouvelles paires de base présente cependant aussi un désavantage : il y a trop d'informations à analyser. "Non seulement ça ressemble parfois à rechercher une aiguille dans une botte de foin", déclare Herndl, "mais il est aussi pratiquement impossible de découvrir les erreurs." Auparavant, toutes les séquences étaient examinées à la main, ce qui n'est pratiquement pas réalisable.

"Par exemple, récemment, nous avons trouvé dans les eaux profondes une grande quantité de bactéries qui dépendent de la lumière du soleil. Vous savez alors qu'il y a une erreur", explique Herndl. "Il vous arrivera pourtant souvent de ne pas vous en apercevoir." Si vous n'y prêtez pas garde, des erreurs de ce genre s'accumulent dans la base de données des espèces, déclare-t-il.