

Séquençage d'amplicon ciblé bactérien et fongique combiné d'échantillons respiratoires: la méthode d'extraction d'ADN est-elle importante?

Cécile Angebault, Mathilde Payen, Paul-Louis Woerther, Christophe Rodriguez, Françoise Botterel

Publié: 28 avril 2020 • <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232215>

Abstrait

Contexte

Des techniques de séquençage à haut débit sont utilisées pour analyser la diversité du microbiote respiratoire dans la santé et la maladie. Bien que de nombreuses données soient disponibles sur le microbiote respiratoire bactérien, sa composante fongique reste mal étudiée. Cela est en partie dû aux problèmes techniques associés aux analyses de métagénomique fongique. Dans cette étude, nous avons comparé deux protocoles d'extraction d'ADN et deux cibles d'amplification fongique pour des analyses combinées de séquençage d'amplicon ciblé bactérien et fongique du microbiote respiratoire.

Méthodes

Six crachats, sélectionnés au hasard dans des échantillons de routine de l'hôpital Mondor (Créteil, France) et traités de manière anonyme, ont été testés après une culture de routine bactérienne et fongique. Dont deux ont été enrichis avec *Aspergillus Fumigati* et *Aspergillus Nigri* (10^5 conidies / mL). Après la lyse mécanique, l'ADN a été extrait en utilisant une extraction automatisée QIAAsymphony® (AQE) ou une extraction manuelle PowerSoil® MoBio (MPE). Le rendement et la pureté de l'ADN ont été comparés. L'ADN extrait de crachats enrichis a été soumis à (i) une PCR en temps réel pour *Aspergillus* Détection d'ADN et (ii) analyses métagénomiques combinées ciblant les amorces à code-barres pour les régions fongiques ITS1 et ITS2 et bactériennes V1-V2 et V3-V4 16S. Les bibliothèques d'amplicons ont été préparées à l'aide du kit MiSeq Reagent V3 sur la plate-forme Illumina. Les données ont été analysées à l'aide des logiciels PyroMIC © et SHAMAN, et comparées aux résultats de culture.

Résultats

L'extraction AQE a fourni un rendement d'ADN plus élevé (rapport ADN AQE / MPE = 4,5 [1,3–11]) en un temps plus court. Le rendement d'ADN d'*Aspergillus* détecté par qPCR était similaire pour les crachats enrichis quel que soit le protocole d'extraction. L'extraction a eu un impact modéré sur la diversité ou les abondances relatives des communautés bactériennes en utilisant le séquençage ciblé des amplicons (2/43 taxons impactés). Pour les champignons, les abondances relatives des principaux taxons 4/11 ont été affectées et les résultats de l'AQE étaient plus proches des résultats de culture. Les cibles V1-V2 ou V3-V4 et ITS1 ou ITS2 ont évalué de la même manière la diversité des taxons majeurs bactériens et fongiques, mais ITS2 et V3-V4 ont détecté plus de taxons mineurs.

Conclusion

Nos résultats ont montré l'importance de l'extraction d'ADN pour la métagénomique ciblée bactérienne et fongique des échantillons respiratoires. Le protocole d'extraction peut affecter le rendement d'ADN et les abondances relatives de quelques taxons bactériens mais plus fongiques. Pour l'analyse fongique, ITS2 a permis la détection d'un plus grand nombre de taxons mineurs par rapport à ITS1.

Citation: Angebault C, Payen M, Woerther PL, Rodriguez C, Botterel F (2020) Séquençage d'amplicon ciblé bactérien et fongique combiné d'échantillons respiratoires: la méthode d'extraction d'ADN est-elle importante? PLoS ONE 15 (4): e0232215. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232215>

Editeur: Joy Sturtevant, Louisiana State University, ÉTATS-UNIS

Reçu: 8 novembre 2019; **Accepté:** 9 avril 2020; **Publié:** 28 avril 2020

Copyright: © 2020 Angebault et al. Il s'agit d'un article en libre accès distribué sous les termes de la [licence d'attribution Creative Commons](#), qui permet une utilisation, une distribution et une reproduction sans restriction sur n'importe quel support, à condition que l'auteur original et la source soient crédités.

Disponibilité des données: Les données brutes sont disponibles sur Genbank NCBI NIH (numéro d'accès SRA: PRJNA548447; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA548447>). Toutes les autres données pertinentes se trouvent dans le manuscrit et ses fichiers d'informations complémentaires.

Financement: Ce travail est un projet accessoire d'une étude plus large intitulée "Ecologie et dynamique des communautés bactériennes et fongiques des voies aériennes supérieures des patients atteints de mucoviscidose: Exploration prospective des discordances clinico-biologiques lors des traitements anti-infectieux par pyroséquençage à haut débit", Qui a reçu une subvention de la Fondation « Vaincre La Mucoviscidose » (Numéro de subvention attribué à FB: 2013 / 2013-047 / 03, <https://www.vaincrelamuco.org/>). Les bailleurs de fonds n'ont joué aucun rôle dans la conception de l'étude, les données collectées et analysées, décision de publication ou préparation du manuscrit.

Intérêts concurrents: J'ai lu la politique de la revue et les auteurs de ce manuscrit ont les intérêts concurrents suivants: FB a reçu des subventions d'Astellas et le paiement des conférences de Merck. CA a reçu une bourse de voyage de MSD France en 2017. MP, PLW, CR ne déclarent aucun conflit d'intérêts. Cela ne modifie pas notre adhésion aux politiques de

introduction

Le microbiote respiratoire humain est un écosystème complexe s'étendant des cavités nasopharyngées aux alvéoles. Il comprend une vaste communauté de microorganismes répartis avec des gradients relativement variables selon les sites [1]. Dans cet écosystème, les bactéries (par exemple *Streptococcus*, *Veillonella* ou *Prevotella*) sont les plus représentées en dehors des champignons, des virus et des archées. Avec le développement du séquençage à haut débit permettant le séquençage et la métagénomique à haut débit des amplicons ciblés 16S / ITS, la composante bactérienne du microbiote respiratoire humain est de plus en plus étudiée pour comprendre son rôle dans la santé et la maladie [1 - 5]. Dernièrement, il est devenu évident que le microbiote fongique (mycobiote) devrait être étudié de manière concomitante pour mieux comprendre les interactions trans-royaumes et le rôle des champignons dans la pathogenèse respiratoire. Une condition préalable pour obtenir des représentations comparables des communautés microbiennes à l'aide de méthodes de séquençage à haut débit est l'utilisation de protocoles appropriés, en particulier pour l'extraction d'ADN. L'impact de l'extraction sur le rendement ou la qualité de l'ADN et sur la composition de la communauté a été évalué dans plusieurs études portant principalement sur le microbiote bactérien digestif [6 - 11]. Cependant, on sait peu de choses sur les protocoles d'extraction appropriés pour l'analyse fongique ou les analyses bactériennes et fongiques combinées, en particulier en cas de microbiote respiratoire [6, 8, 12 - 15]. Les problèmes techniques associés à l'analyse de séquençage fongique à haut débit proviennent de la faible présence de champignons dans la biosphère et de la nature complexe de leur paroi cellulaire [16]. Ce dernier est composé d'une épaisse couche de chitine, de bêta-glucanes, de lipides et de peptides avec parfois de la mélanine supplémentaire [16], qui protège la cellule fongique de la lyse enzymatique ou chimique (étape essentielle dans l'extraction de l'ADN) [17]. Un autre problème concerne le choix de la cible d'amplification de l'ADN. La plupart des études sur le mycobiote ont ciblé la région de l'espaceur transcrit interne (ITS), comme recommandé par le Fungal Barcoding Consortium [18], et la plupart des auteurs ont choisi ITS1 [14, 15, 19 - 21] plutôt que dans la région ITS2 [2, 3]. Le choix de la meilleure solution reste incertain, bien que la base de données ITS1 soit plus large que celle de ITS2 [14, 22]. Dans la présente étude, nous avons comparé l'impact de deux protocoles d'extraction récents: l'extraction manuelle PowerSoil® MoBio (MPE) couramment utilisée et l'extraction automatisée QIAAsymphony (AQE) à l'aide du kit DSP DNA Midi, sur la diversité fongique et bactérienne où les deux communautés ont été évalués de manière concomitante par séquençage d'amplicon ciblé 16S / ITS dans des échantillons respiratoires. Nous avons également comparé la diversité de (i) communauté fongique en utilisant l'amplification avec les régions ITS1 ou ITS2 et de (ii) la communauté bactérienne en utilisant les régions V1-V2 ou V3-V4 16S. Comme le séquençage d'amplicon ciblé 16S / ITS et les analyses de culture sont rarement effectués de manière concomitante, bien que cela semble essentiel dans un contexte de laboratoire médical, nous avons également comparé le séquençage aux résultats de culture.

matériaux et méthodes

Prélèvement d'échantillons, culture

Six crachats de patients (P1, P2, P3, P4, P5 et P6) hospitalisés au CHU *Henri Mondor* (Créteil, France) ont été sélectionnés au hasard parmi les crachats adressés au laboratoire microbiologique après évaluation de leur qualité selon les critères de Murray et Washington [23]. Dans le cadre de l'analyse bactérienne de routine, ils ont été inoculés sur gélose chocolat + PolyViteX, gélose Columbia + 5% sang de cheval, gélose Columbia ANC + 5% sang de mouton, gélose Trypticase Soy et gélose Drigalski (*bioMérieux*, Marcy L'Etoile, France) pour 48h à 5 jours à 35 ° C. Après inclusion dans notre étude, deux crachats (P1 et P2) ont été enrichis de 10⁵ conidies de *Aspergillus* section *Fumigati* et 10⁵ conidies d' *Aspergillus* section *Nigri*. Dix microlitres des deux crachats dopés (P1 et P2) ont été inoculés sur deux inclinaisons Sabouraud-Chloramphenicol-Gentamicin (*Bio-rad*, Marnes-la-Coquette, France) et sur une plaque BBL™ CHROMagar™ *Candida* (*Beckton Dickinson*, Le Pont de Claix, France). Les inclinaisons de Sabouraud ont été incubées pendant 21 jours à 30 ° C ou 35 ° C et CHROMagar™ *Candida* plaque pendant 72h à 35 ° C. Tous les crachats ont été divisés en aliquotes de 250 mg chacun et stockés à -20 ° C pour l'extraction d'ADN (figure 1). Ces travaux s'inscrivaient dans le cadre du projet MucoBacMyco, qui a été approuvé par un comité d'éthique *ad hoc* nommé Comité de Protection des Personnes d'Ile de France IX (N ° CPP-IDF IX-12-011).

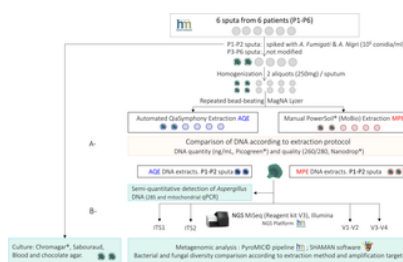


Fig 1. Flux de travail de l'étude.

A- Comparaison de deux protocoles d'extraction d'ADN (extraction QIAAsymphonie automatisée [AQE] à l'aide du kit midi DSP DNA et extraction manuelle PowerSoil® MoBio [MPE]) en termes de quantité et de qualité d'ADN extrait de 6 crachats (6 patients, P1, P2, P3, P4, P5, P6). B- Comparaison de la diversité bactérienne et fongique détectée dans deux crachats (2 patients, P1, P2) enrichis de 10⁵ conidies d' *Aspergillus* section *Fumigati* et *Aspergillus* section *Nigri* en utilisant (i) la méthode de culture et (ii) le séquençage d'amplicon ciblé 16S / ITS (ADN extrait à l'aide des protocoles AQE ou MPE; cibles d'amplification V1-V2 et V3-V4 16S pour les bactéries et ITS2 et ITS2 pour les champignons; MiSeq® Illumina, kit 2x300 v3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232215.g001>

Protocoles d'extraction d'ADN

Tous les échantillons (aliquotes de 250 mg) conservés à -20 ° C ont été soumis à deux protocoles d'extraction d'ADN génomique différents (extraction manuelle Powersoil® -MPE- et extraction automatisée QIAAsymphony -AQE, voir ci-dessous). Les contrôles d'extraction négatifs (250 µL d'eau sans ADN) ont été traités de la même manière que les échantillons.

Extraction manuelle Powersoil® (MPE), kit d'isolation d'ADN MoBio PowerLyzer PowerSoil® (QIAGEN, Carlsbad, USA).

Les aliquotes ont été pipetées dans des tubes de billes de verre PowerLyzer® 0,1 mm et soumises à une lyse mécanique: deux cycles de 60 secondes à 6400 tr / min sur l'instrument MagNA Lyser (Roche, Mannheim, Allemagne) et 1 minute de repos sur de la glace entre les cycles. Nous avons ensuite procédé selon les instructions du fabricant avec des ajustements mineurs: centrifugation des Glass Bead Tubes pendant 5 min au lieu de 30 s (étape 7 du protocole, après lyse mécanique) et 5 min d'attente à température ambiante (au lieu de 30 s) avant essorage à 10 000 g pendant 1 min (étape 22) [6].

Extraction automatisée de QIAAsymphony (AQE), kit midi DSP DNA (QIAGEN, Carlsbad, USA).

Les aliquotes ont été diluées dans 450 µL de tampon ATL (QIAGEN, Carlsbad, USA) et mélangées avec des billes vertes en céramique MagNA Lyser de 1,4 mm avant lyse mécanique (comme décrit ci-dessus). Ils ont été centrifugés 3 min à 10 000 g, et 450 µL de surnageant ont été transférés dans un nouveau tube de lyse enzymatique (25 µL de Protéinase K (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France), pendant 45 minutes, à 56 ° C). Les aliquotes ont été soumises à une extraction automatisée sur le QIAAsymphony en utilisant le kit midi DSP DNA comme recommandé par le fabricant.

Quantification des acides nucléiques

L'évaluation de la qualité de l'ADN, et en particulier de la contamination significative par l'ARN, a été réalisée par électrophorèse sur gélose d'échantillons d'ADN (gel d'agarose 1%, migration 100V 30 minutes). Extrait ont été quantifiés en utilisant ADNs Thermo Scientific™ Nanodrop™ 2000 spectrophotomètre (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France), et PicoGreen-iT Quant ADNdb Kit de dosage (Invitrogen, Carlsbad, États - Unis).

Détection d'ADN d' *Aspergillus* par PCR en temps réel dans les crachats enrichis

Les extraits d'ADN de crachats à pointes ont été analysés pour *Aspergillus* détection de l'ADN en utilisant une PCR en temps réel ciblant la région 28S de *A. fumigatus* [24] et l'ADN mitochondrial d' *Aspergillus* sp [25]. La PCR a été réalisée sur un système StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Amplification et séquençage par PCR

Des bibliothèques d'amplicons ciblant les régions hyper-variables V1-V2 ou V3-V4 16S pour les bactéries et les régions ITS1 ou ITS2 pour les champignons ont été préparées. Les amorces 16S utilisées (pour V1-V2: amorces 27 et 338; pour V3-V4: amorces 341 et 785 sans nucléotides dégénérés [Z, 26]) étaient celles recommandées dans le guide de préparation de la bibliothèque de séquençage métagénomique 16S [27] (<http://emea.support.illumina.com>). Les amorces ITS1 étaient ITS1F [28, 29] et ITS2; les amorces ITS2 étaient ITS3 et ITS4 [30], le tout après inclusion des adaptateurs de séquençage Illumina [27]. Les amplicons PCR ont été générés à l'aide de Veriti™ Thermocycleur (Applied Biosystems, Foster City, USA) dans les conditions suivantes: 3 min à 95 ° C dénaturation; 35 cycles (94 ° C pendant 30 secondes, 53 ° C pendant 30 secondes et 72 ° C pendant 30 secondes) et 5 minutes à 72 ° C d'allongement final avant refroidissement à 4 ° C. Des contrôles positifs constitués d'ADN d' *Escherichia* et de *Candida* et des contrôles négatifs ont été utilisés pour les amplifications V1-V2 et V3-V4 16S, ITS1 et ITS2, respectivement. Chaque échantillon a été purifié avec Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Villepinte, France) comme décrit dans le guide de préparation de la bibliothèque de séquençage métagénomique 16S [27]. Chaque échantillon a été analysé sur le bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent, Santa Clara, USA) en utilisant le kit Agilent High Sensitivity DNA (Agilent, Santa Clara, USA) en suivant les instructions du fabricant. Les produits PCR ont été codés à l'aide du kit d'index Nextera XT (Illumina, Evry, France). Les PCR d'index ont été réalisées comme recommandé dans le guide de préparation de la bibliothèque de séquençage métagénomique 16S: 3 minutes à une dénaturation à 95 ° C; 8 cycles (94 ° C pendant 30 secondes, 53 ° C pendant 30 secondes et 72 ° C pendant 30 secondes), et 5 minutes à 72 ° C d'allongement final avant refroidissement à 4 ° C. Les produits de PCR à code-barres ont été purifiés en utilisant Agencourt AMPure XP, analysés sur le bioanalyseur Agilent 2100 et quantifiés avec le kit de test Quant-iT PicoGreen dsDNA. Les échantillons ont été normalisés à 4 nM et regroupés (5 pi de chaque échantillon normalisé) dans une bibliothèque. Un contrôle de séquençage PhiX (Illumina, Evry, France) a été préparé en suivant les instructions du fabricant. Les bibliothèques ont été séquençées à l'aide du kit de réactifs MiSeq V3 (2 x 300 pb avec le kit de 600 cycles, Illumina, Evry, France) sur la plateforme Illumina MiSeq (Illumina, Evry, France), et a abouti à 115 286; 392.274; Les séquences 68044 et 196230 lisent respectivement V1-V2, V3-V4 16S, ITS1 et ITS2. Les données brutes sont disponibles sur Genbank NCBI NIH (numéro d'accès SRA: PRJNA548447; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA548447>).

Affectation taxonomique, diversité et analyses statistiques

Les données générées ont été analysées avec PyroMIC © (logiciel protégé, IDDN FR.001.400018.000.SP2014.000.31230) qui contient une base de données fongique et bactérienne nettoyée créée à partir de séquences NCBI. En fin de compte, seules les séquences > 100 pb pour les lectures ITS et > 150 pb pour les lectures 16S, avec une homologie ≥ 98,7% et ≥ 94,5%, respectivement, et une valeur e de 0,0 ont été prises en compte pour l'identification au niveau de l'espèce et du genre [31]. Par conséquent, nous n'avons retenu que 93 451; 276.475; 65.112 et 191.349 lectures de séquence pour V1-V2, V3-V4 16S, ITS1 et ITS2, respectivement ([Tableau 1](#)).

	Control	P1 Reads (%)		P2 Reads (%)	
		MPE	AQE	MPE	AQE
Bacteria					
16S	46,812 (47.11)	20,379 (17.71)	10,811 (196.71)	3,812 (212.41)	3,760 (212.21)
ITS1-2	48,111 (116.91)	381 (1.41)	212 (2.21)	26,707 (176.41)	21,211 (176.41)
Unidentified bacteria	688 (1.1)	238 (1.1)	139 (1.1)	488 (1.2)	171 (0.1)
Not read*	0	0	0	0	0
Fungi					
ITS1-2	276,475	41,112	11,111	111,111	48,111
16S	276,475 (74.1)	41,111 (18.1)	11,111 (17.1)	76,111 (18.1)	36,111 (17.1)
ITS1-2	48,111 (17.1)	188 (1.1)	712 (1.1)	11,111 (17.1)	16,111 (17.1)
Unidentified fungi	488 (1.1)	101 (0.1)	238 (1.1)	187 (1.1)	281 (1.1)
Not read*	0	0	0	0	0
Reads assigned on target					
16S	41,111	36,111	11,111	4,111	14,111
ITS1-2	41,111 (17.1)	20,111 (18.1)	11,111 (17.1)	4,111 (17.1)	14,111 (17.1)
ITS1-2	4,111 (1.1)	711 (1.1)	188 (1.1)	4,111 (1.1)	16,111 (1.1)
Unidentified target	11 (0.1)	11 (0.1)	11 (0.1)	11 (0.1)	11 (0.1)
Not read*	0	0	0	0	0
Reads assigned on host					
16S	11,111	11,111	11,111	11,111	11,111
ITS1-2	11,111 (17.1)	11,111 (17.1)	11,111 (17.1)	11,111 (17.1)	11,111 (17.1)
ITS1-2	11,111 (1.1)	11,111 (1.1)	11,111 (1.1)	11,111 (1.1)	11,111 (1.1)
Unidentified host	11 (0.1)	11 (0.1)	11 (0.1)	11 (0.1)	11 (0.1)
Not read*	0	0	0	0	0

* Methods used the same starting quantities of sample and final volumes were equal.

† In genus level.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232215.t001>

Tableau 1. Les résultats du séquençage à haut débit (lit et affectation) des bactéries (cibles V1-V2 et V3-V4 16S) et fongiques (ITS1 et ITS2) cibles de 2 expectorations de 2 patients (P1, P2) extraite en utilisant 2 protocoles^a (Extraction QIAAsymphonie automatisée [AQE] avec kit midi DSP DNA et extraction manuelle PowerSoil® [MPE]).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232215.t001>

Des courbes de raréfaction ont été calculées pour évaluer la qualité de l'évaluation de la diversité taxonomique. Les modèles de diversité fongique et bactérienne des échantillons ont été comparés, au niveau du genre, avec les modèles de diversité des contrôles négatifs pour chaque cible d'amplification. Dans le cas de profils similaires, la contamination des échantillons par des sources environnementales a été suspectée et les échantillons ont été analysés une nouvelle fois. Des indices de diversité (Shannon, Shannon uniformité, Simpson, Inverse Simpson et Chao1) ont été calculés pour comparer l'homogénéité des échantillons en termes de composition microbiote bactérienne et fongique. La structure communautaire et les abondances relatives des taxons bactériens et fongiques ont été comparées selon le protocole d'extraction et les cibles d'amplification à l'aide du logiciel SHAMAN (<http://shaman.pasteur.fr/>) [32]. Les analyses des diversités bactériennes et fongiques ont été effectuées au niveau du genre, le séquençage de l'amplicon 16S / ITS n'étant pas assez sensible pour obtenir une identification précise de tous les micro-organismes au niveau des espèces. La normalisation des comptages de lecture a été effectuée à l'aide de la méthode de normalisation DESeq2 [33]. Le modèle linéaire généralisé (GLM) implémenté dans le package DESeq2 R a été utilisé pour détecter les différences d'abondance des taxons entre les protocoles d'extraction (MPE vs AQE), le 16S (V1-V2 vs V3-V4) et l'ITS (ITS1 vs ITS2). Le GLM a été calculé pour inclure le patient, le protocole d'extraction et la cible d'amplification comme effets principaux, en plus de l'interaction entre l'extraction et la cible d'amplification. Cette interaction a été utile pour modéliser l'appariement entre des mesures successives provenant d'un même individu. Les valeurs *P* résultantes ont été ajustées selon la procédure de Benjamini et Hochberg. Le test de la somme des rangs de Wilcoxon ($\alpha = 0,05$) a été utilisé pour comparer le rendement d'ADN par type de protocole d'extraction.

Résultats

Influence du protocole d'extraction sur la quantité et la qualité de l'ADN

En partant de la même quantité (250 ± 10 mg) d'échantillons respiratoires, nous avons obtenu des rendements d'ADN allant de 0 à 37 ng / ml avec MPE et de 15 à 411 ng / ml avec AQE. Pour deux échantillons (P4 et P5), aucun ADN n'a été extrait avec la méthode MPE. En moyenne, la méthode AQE a donné un ADN double brin 4,5 fois (multiplicateur [1,3–11]) plus élevé que le MPE (valeur $p = 0,03$), dans un délai technique plus court (~ 30 min pour AQE contre ~ 90 min pour MPE), et un coût équivalent. Concernant la qualité et la pureté de l'ADN, nous n'avons pas observé de contamination ARN significative par électrophorèse sur gélose d'échantillons d'ADN. La méthode AQE a produit des taux plus élevés d'ADN simple brin que MPE. Cependant, le rapport d'absorbance de 260/280 nm était similaire pour les deux protocoles d'extraction (valeur $p = 0,40$, [tableau S1](#)).

Culture bactérienne et fongique des deux crachats à pointes

La culture bactérienne des deux crachats enrichis a été réalisée au cours de l'analyse de routine. Pour les deux patients, la culture a révélé une flore commensale sans pathogènes significatifs (c'est-à-dire des agents pathogènes $\geq 10^7$ UFC / ml tels que définis dans REMIC [34]).

La culture fongique des deux crachats dopés (P1 et P2) a révélé la présence de six champignons pour P1 ([Fig. 2](#)): 10^4 CFU / ml de *Candida krusei* (nom téléomorphe: *Pichia kudriavzevii*); 7×10^3 UFC / ml de *Candida albicans*; 7×10^3 de *Candida glabrata* (du genre *Nakaseomyces*); 5×10^2 CFU / ml de *Saccharomyces cerevisiae*; 6×10^2 CFU / ml de section *Aspergillus Fumigati*, et 4×10^2 CFU / ml de section *Aspergillus Nigri*. Seuls trois champignons ont été identifiés pour P2: 2×10^4 UFC / ml de *C. albicans*; 2×10^2 UFC / ml de coupe d' *Aspergillus Fumigati* et 3×10^2 UFC / ml d' *Aspergillus* section de *Nigri* ([Fig. 2](#)).

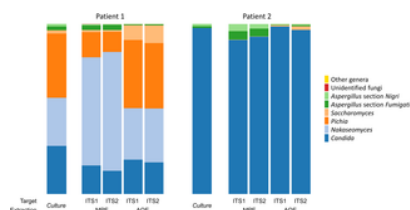


Fig 2. Diagrammes de taxons résumant les abondances relatives des genres ou coupes fongiques identifiés dans les échantillons respiratoires de 2 patients (P1 et P2) en utilisant la culture et le séquençage d'amplicon ciblé par ITS.

Les crachats de P1 et P2 ont été enrichis avec 10^5 CFU / ml d' *Aspergillus* section *Nigri* et *Aspergillus* section *Fumigati*.

Pour l'analyse de séquençage d'amplicon ciblé ITS, l'ADN a été extrait des échantillons respiratoires en utilisant 2 protocoles: l'extraction automatisée QIAasympphony [AQE] avec DSP DNA midi kit et l'extraction manuelle PowerSoil® MoBio [MPE]; et amplifié par séquençage ultra-profond (MiSeq®, Illumina) à l'aide de deux cibles ITS (ITS1 et ITS2). Les méthodes utilisaient les mêmes quantités de départ d'échantillons et les volumes finaux étaient égaux. L'analyse métagénomique a révélé 5 genres extrêmement peu représentés (abondance relative globale $< 0,1\%$ pour chaque taxon) qui ont été regroupés dans la catégorie «autres genres»: *Rhizophlyctis*, *Schizophyllum*, *Hanseniaspora*, *Penicillium* et *Inocutis*.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232215.g002>

Détection d'ADN d' *Aspergillus* à l'aide de qPCR

Pour les deux crachats enrichis (P1 et P2), la quantité d'ADN d' *Aspergillus* détectée par 28S- et mt-qPCR était comparable ([tableau S2](#)) quel que soit le protocole d'extraction.

Diversité bactérienne et structure de la communauté détectées à l'aide du séquençage d'amplicon ciblé V1-V2 et V4-V3 16S

Pour les crachats dopés P1, nous avons analysé 31274 lectures appariées en utilisant la région V1-V2 (20908 et 10366 lectures en utilisant MPE et AQE, respectivement) et 94221 lectures en utilisant V3-V4 (61552 et 32669 avec MPE et AQE, respectivement) ([Tableau 1](#)). Pour P2 spiked-sputum, nous avons analysé 62177 lectures en utilisant V1-V2 (35 055 et 27 122 lectures en utilisant MPE et AQE, respectivement), et 182 254 lectures avec V3-V4 (113 963 et 68 291 avec MPE et AQE, respectivement) ([Tableau 1](#)). Pour chaque événement (2 patients x 2 protocoles d'extraction x 2 cibles d'amplification), les courbes ont atteint un plateau, indiquant que la diversité bactérienne avait été détectée de manière satisfaisante ([S1 Fig](#)). Les modèles de diversité observés pour chaque condition étaient différents des témoins négatifs et aucun échantillon n'avait souffert de contamination environnementale ([tableau S3](#)). Dans l'ensemble, 43 taxons ont été identifiés au niveau du genre et un taxon supplémentaire («bactéries non identifiées») a recueilli des lectures non classifiées. Même si un plus grand nombre de taxons ont été détectés

dans les échantillons de P1 (37 taxons contre 21 dans les échantillons de P2), le microbiote des voies respiratoires P1 était moins homogène que P2. De plus, P1 avait un taxon largement prédominant (*Lactobacillus*, l'abondance relative globale et par échantillon est > 95%), six taxons mineurs (*Streptococcus*, *Prevotella*, *Phocaeicola*, *Olsenella*, *Mycoplasma*, *Capnocytophaga*; les abondances relatives globales varient de 0,1% à 1%), et 30 taxons extrêmement peu représentés (abondance relative globale < 0,1%) (figure 3). En revanche, P2 avait un microbiote des voies respiratoires plus uniforme de six taxons majeurs (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Rothia*, *Prevotella*, *Enterococcus*; l'abondance relative globale et par échantillon est > 1%), trois taxons mineurs (*Haemophilus*, *Fusobacterium*, *Campylobacter*; dans l'ensemble l'abondance relative varie de 0,1% à 1%), et 12 taxons extrêmement peu représentés (abondance relative globale < 0,1%) (Fig 3). Au total, 16 taxons bactériens ont été trouvés dans les deux P1 et P2. Parmi ceux-ci, *Lactobacillus* a été identifié comme le seul taxon «de base» (abondance > 1% dans chaque échantillon testé), et cinq taxons majeurs dominaient dans P2 (*Streptococcus*, *Veillonella*, *Rothia*, *Prevotella*, *Enterococcus*). Si les deux méthodes étaient capables de détecter 6/6 taxons majeurs et 7/9 mineurs, nous avons remarqué qu'avec V3-V4 un plus grand nombre de taxons extrêmement peu représentés ont été détectés (15 pour P1 et 9 pour P2). En revanche, seuls 2 taxons extrêmement peu représentés ont été détectés avec V1-V2 exclusivement. Nous avons également observé que 11 genres ont été détectés avec des abondances relatives significativement plus élevées en utilisant V3-V4 que V1-V2 (*Prevotella*, *Phocaeicola*, *Lactobacillus* et *Mycoplasma*, valeurs $p < 0,001$; *Streptococcus* et *Campylobacter*, $0,001 < \text{valeurs } p < 0,01$; *Fusobacterium*, *Pseudomonas*, *Olsenella*, *Treponema*, *Rothia*, $0,01 < \text{valeurs } p < 0,05$; S2 Fig; Tableau S4). L'indice Chao1 groupé était plus élevé pour V3-V4 (50,7) que pour V1-V2 (29,7).

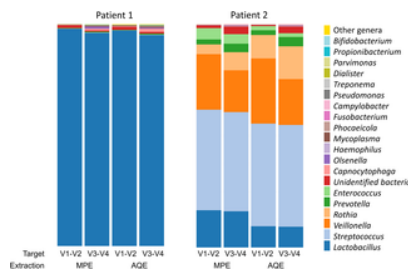


Fig 3. Diagrammes de taxons résumant les abondances relatives des genres bactériens identifiés dans les échantillons respiratoires de 2 patients (P1 et P2) en utilisant le séquençage d'amplicon ciblé 16S.

L'ADN a été extrait en utilisant 2 protocoles: l'extraction automatisée QIAAsymphony [AQE] avec le kit midi DSP DNA, et l'extraction manuelle PowerSoil® MoBio [MPE]; et amplifié par séquençage ultra-profond (MiSeq®, Illumina) à l'aide de deux cibles 16S (V1-V2 et V3-V4).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232215.g003>

Les méthodes utilisaient les mêmes quantités de départ d'échantillons et les volumes finaux étaient égaux. La catégorie « Autres genres » a réuni 23 taxons bactériens associés à très faibles abondances relatives (abondance globale relative < 0,1% pour chaque taxon): *Parascardovia*, *Anaeroglobus*, *Actinomyces*, *Howardella*, *Staphylococcus*, *Alloprevotella*, *Pseudoramibacter*, *Melissococcus*, *Corynebacterium*, *Fretibacterium*, *Stenotrophomonas*, *Atopobium*, *Sphingomonas*, *Acinetobacter*, *Shuttleworthia*, *Acidaminococcus*, *Moraxella*, *Oribacterium*, *Delftia*, *Eubacterium*, *Lactococcus*, *Mogibacterium*, *Chelativorans* et *Vagococcus*.

Diversité fongique et structure de la communauté détectées à l'aide du séquençage d'amplicon ciblé ITS1 et ITS2

Pour P1, nous avons analysé 43 758 lectures appariées en utilisant la région ITS1 (20 926 et 22 832 lectures en utilisant MPE et AQE, respectivement), et 90 239 lectures en utilisant ITS2 (34 033 et 56 206 avec MPE et AQE, respectivement) (Tableau 1). Pour P2, nous avons analysé 21 354 lectures en utilisant ITS1 (6 940 et 14 414 lectures en utilisant MPE et AQE, respectivement) et 101110 lectures avec ITS2 (23 279 et 77 831 MPE et AQE, respectivement) (Tableau 1). Pour chaque événement (2 patients x 2 protocoles d'extraction x 2 cibles), les courbes de raréfaction ont atteint un plateau, indiquant que la diversité fongique avait été détectée de manière satisfaisante (S1 Fig). Les schémas de diversité observés pour chaque condition différaient complètement des témoins négatifs et aucun échantillon n'avait souffert de contamination environnementale (tableau S3). Dans l'ensemble, dix taxons ont été identifiés au niveau du genre et un taxon a recueilli des lectures fongiques non classifiées («champignons non identifiés»). Quant aux taxons d'*Aspergillus*, nous avons pu distinguer les sections d'*Aspergillus Fumigati* et d'*Aspergillus Nigri*. Nous avons détecté 9/10 et 8/10 des genres fongiques dans P1 et P2, respectivement, et les 2 coupes d'*Aspergillus* ont été détectées chez les deux patients (Fig 2). En mettant de côté les taxons d'*Aspergillus* enrichis, nous avons observé que P1 abritait un mycobiote respiratoire plus diversifié avec quatre grands genres de champignons (*Candida*, *Pichia*, *Nakaseomyces* et *Saccharomyces*; abondance relative de > 1% pour chaque événement), et quatre genres extrêmement faiblement représentés (*Rhizophlyctis*, *Schizophyllum*, *Hanseniaspora*, *Inocutis*; abondance relative de < 0,1% pour chaque événement). P2 avait un mycobiote moins uniforme avec un seul taxon fongique largement prédominant (*Candida*, abondance relative > 90% pour chaque événement), 1 taxon mineur (*Saccharomyces*, abondance relative globale entre 0,1 et 1%) et 4 genres extrêmement peu représentés (*Nakaseomyces*, *Pichia*, *Penicillium* et *Inocutis*; abondance relative < 0,1%). Nous avons observé que 7/11 genres ou sections ont été détectés avec des abondances relatives significativement plus élevées en utilisant ITS2 par rapport à ITS1 (*Aspergillus* section *Fumigati* et *Saccharomyces*, valeurs $p < 0,01$; *Aspergillus* section *Nigri*, *Candida*, *Pichia*, *Nakaseomyces*, *Saccharomyces*, *Inocutis*, $0,01 < \text{valeurs } p < 0,05$; S3 Fig, S5 Table). Il est à noter que 41% des lectures fongiques ont été attribuées au niveau de l'espèce. En particulier, 79,8% et 100% de *Candidales* lectures de P1 et P2, respectivement, ont été identifiées avec une bonne homologie de séquence (> 97%) comme *Candida albicans*; 89,2% des lectures de *Pichia* à partir de P1 étaient *Candida krusei*; 61,5% des lectures de *Nakaseomyces* à partir de P1 étaient *Candida glabrata*, et 99,9% et 100% des lectures de *Saccharomyces* à partir de P1 et P2, respectivement, étaient des *Saccharomyces cerevisiae*. L'indice Chao1 groupé était deux fois plus élevé pour ITS2 (15,4) que pour ITS1 (7).

Comparaison des diversités bactériennes et fongiques telles que détectées par les protocoles d'extraction et comparaison de la diversité fongique telle que détectée par le séquençage et la culture d'amplicon ciblés par ITS

La diversité de la communauté bactérienne analysée au niveau du genre et estimée par les indices de diversité alpha de Shannon et Simpson était comparable pour P1 et P2 pour les quatre événements analysés (tableau S6). Les indices Chao1 regroupés comparant les résultats des méthodes MPE et AQE étaient similaires pour les bactéries (61,9 contre 61,3, respectivement). La

diversité fongique au niveau du genre ou de la section estimée par les indices de Shannon et Simpson était également comparable pour les quatre événements analysés ([tableau S6](#)). Les indices Chao1 regroupés comparant les résultats globaux des méthodes MPE et AQE étaient similaires pour les champignons (14,4 contre 11,5, respectivement).

En ce qui concerne la diversité taxonomique, les deux protocoles d'extraction, MPE et AQE, ont échoué à détecter respectivement 3 et 9/43 taxons bactériens mineurs et 1 et 2/11 taxons fongiques mineurs. En ce qui concerne les abondances relatives des taxons, la quantité détectée a été significativement impactée par l'extraction pour 2 grands genres bactériens (*Lactobacillus* , valeur $p = 0,008$ et *Rothia* , valeur $p = 0,049$) et 4 grands genres ou coupes fongiques (*Aspergillus* section *Fumigati* et *Saccharomyces* , valeurs $p < 0,001$; *Candida* , valeur $p = 0,001$; *Nakaseomyces* , valeur $p = 0,045$) ([Fig 4](#) , [tableau S7](#)). L'abondance de la moitié de ces taxons (*Lactobacillus* , *Aspergillus* section *Fumigati* et *Nakaseomyces*) était plus élevée avec AQE, tandis que l'autre moitié (*Rothia* , *Candida* et *Pichia*) ont vu leur abondance diminuer avec AQE ([Fig 4](#) , [S7 Table](#)).

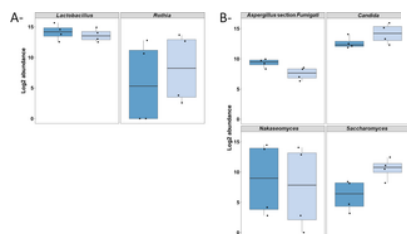


Fig 4.

Boxplot des abondances log₂ de taxons bactériens (A) et fongiques (B) au niveau du genre ou de la section détectés avec des abondances significativement différentes (valeur $P < 0,05$) selon le protocole d'extraction utilisé. L'ADN a été extrait soit par extraction manuelle PowerSoil® MoBio -MPE- [bleu foncé] soit par extraction automatisée QIAasympmony -AQE- en utilisant le kit midi DSP DNA [bleu clair].

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232215.g004>

En ce qui concerne la diversité fongique détectée par le séquençage et la culture d'amplicon ciblés par ITS ([Fig 2](#)), nous avons observé un accord global concernant les taxons majeurs puisque les deux méthodes détectaient 6/6 et 3/4 taxons majeurs pour P1 et P2, respectivement. Un seul taxon majeur, *Saccharomyces* , a été détecté dans les échantillons P2 par séquençage d'amplicon ITS, mais pas par culture. Tous les taxons mineurs (*Rhizophlyctis* , *Schizophyllum* , *Hanseniaspora* , *Penicillium* , *Inocutis*) ont été détectés uniquement par séquençage. Les abondances relatives des principaux taxons détectés par culture ou séquençage d'amplicon ITS après AQE ou MPE variaient considérablement. Pour P1, la culture et l'AQE ont détecté des proportions similaires de trois principaux taxons de levure (*Candida* , *Nakaseomyces* et *Pichia*). Cependant, les abondances relatives de *Saccharomyces* et d' *Aspergillus* étaient proches en culture et en MPE. Pour P2, les abondances relatives de *Candida* et d' *Aspergillus* détectées par AQE étaient plus proches de celles observées en culture que MPE. Mais AQE a détecté une proportion plus élevée de *Saccharomyces* par rapport au MPE ou à la culture.

Discussion

Dans la présente étude, nous avons comparé, simultanément et dans les mêmes conditions, l'impact de deux protocoles d'extraction d'ADN (manuel PowerSoil MoBio® [[12](#)] et extraction automatisée QIAasympmony) sur la diversité du microbiote respiratoire bactérien et fongique évalué par 16S / ITS ciblé séquençage d'amplicon à l'aide de 2 cibles d'amplification bactériennes (V1-V2 et V3-V4 16S) et 2 fongiques (ITS1 et ITS2). Les données de cultures bactériennes et fongiques étaient disponibles et utilisées pour comparer avec les résultats du séquençage d'amplicon ciblé 16S / ITS et d' *Aspergillus* qPCR. Dans notre travail, l'utilisation de l'extraction automatisée a amélioré le rendement et la qualité de l'ADN avec une meilleure fiabilité et un temps technique plus court que le protocole manuel. La diversité taxonomique bactérienne et fongique détectée dans les échantillons respiratoires n'a pas été fortement influencée par le protocole d'extraction (effet faible et modéré, respectivement), alors que les cibles d'amplification ont eu une influence significative. Un plus grand nombre de communautés microbiennes de faible densité ont été détectées par les cibles V3-V4 16S et ITS2.

L'extraction avait une influence significative sur le rendement de l'ADN total collecté. L'AQE a donné un rendement plus élevé (~ 4,5 fois) d'ADN double brin avec des résultats moins hétérogènes, un temps technique plus court (~ 30 min) et un coût équivalent par rapport au MPE. Nous n'avons pas différencié, comme la plupart des auteurs, le rendement en ADN humain du rendement en ADN du microbiote. Cependant, il a été démontré que l'obtention de rendements d'ADN totaux élevés est essentielle pour le séquençage des amplicons ciblés bactériens, et encore plus pour le séquençage fongique en raison de la faible charge de gènes fongiques dans le microbiote humain [[8](#) , [13](#) , [35](#)]. Costea *et al* [[8](#)] a comparé 21 protocoles d'extraction pour l'analyse métagénomique intestinale bactérienne et a constaté que la lyse mécanique et le battage des billes étaient positivement associés à l'évaluation de la diversité bactérienne, ce qui était particulièrement important pour une extraction efficace de l'ADN à partir de bactéries Gram-positives. De même, dans notre étude, nous avons pu détecter des bactéries Gram-positives, par exemple *Streptococcus* , après AQE ou MPE, indiquant une lyse mécanique suffisante. En ce qui concerne les champignons, Huseyin *et al* [[13](#)] ont comparé cinq protocoles d'extraction pour l'analyse du mycobiote intestinal et ont observé que seules les méthodes impliquant des étapes de battage de billes leur permettaient d'extraire l'ADN en quantités adéquates pour fournir d'autres produits ITS-PCR à subir un séquençage ultra-profond. De plus, Vesty *et al* [[14](#)] ont comparé quatre protocoles d'extraction pour le séquençage d'amplicon ciblé par voie orale 16S / ITS fongique et bactérienne et ont rapporté, comme Sohrabi ou Lazarevic [[36](#) , [37](#)], que des protocoles comprenant des étapes de lyse enzymatique amélioreraient l'extraction de l'ADN de la salive. En revanche, Rosenbaum *et al* [[15](#)] a comparé huit protocoles d'extraction d'échantillons de rinçage buccal pour le séquençage d'amplicons ciblés 16S / ITS fongiques et bactériens et a constaté que les méthodes d'extraction d'ADN avaient une influence importante sur le rendement global d'ADN, mais pas d'impact significatif sur la composition du microbiome oral. Dans leur étude, comme dans la nôtre, les auteurs ont démontré que la variabilité interindividuelle entraînait des variations de diversité fongique et bactérienne plus importantes que les protocoles d'extraction [[15](#)].

Nous avons remarqué que le choix du protocole MPE ou AQE n'avait qu'un impact modéré sur la diversité et l'abondance relative des taxons bactériens détectés dans les échantillons respiratoires (2/43 taxons impactés en termes d'abondance relative). D'autres auteurs [[14](#) , [37](#) , [38](#)] ont comparé des protocoles d'extraction pour l'évaluation de la diversité bactérienne dans le microbiote des voies respiratoires supérieures et ont rapporté un degré élevé de congruence de la structure de la communauté bactérienne quel

que soit le protocole d'extraction utilisé. Cependant, ils ont remarqué des différences significatives dans la détection (présence / absence) de taxons de très faible abondance et également dans les abondances relatives de quelques taxons majeurs. Par exemple, Lazarevic *et al* [37] et Biesbroek *et al* [38] ont montré que les abondances relatives de *Firmicutes* et *Actinobacteria* étaient modifiées en fonction de la méthode d'extraction. De plus, Lazarevic *et al* [37] ont observé que les taxons *Firmicutes* étaient plus fortement représentés dans les échantillons traités mécaniquement, alors que les taxons *Actinobacteria* étaient plus fortement représentés dans les échantillons traités enzymatiquement. Dans notre étude, les deux taxons bactériens significativement impactés en termes d'abondance relative étaient *Lactobacillus* (*Firmicutes*), qui a montré une abondance réduite après AQE (malgré la lyse mécanique), et *Rothia* (*Actinobacteria*) dont l'abondance a augmenté après AQE (avec une étape de lyse enzymatique). Dans l'ensemble, l'impact modéré des protocoles d'extraction sur la diversité bactérienne dans les échantillons respiratoires contraste avec les résultats sur les échantillons de microbiote intestinal. Dans l'intestin, l'extraction semble fortement influencer la diversité et l'abondance relative des taxons bactériens [6 , 8]. Ce contraste pourrait s'expliquer par la moindre diversité du microbiote respiratoire par rapport au microbiote intestinal, avec peut-être moins de taxons bactériens difficiles à extraire des échantillons respiratoires. Fait intéressant, dans notre étude, l'utilisation de l'AQE ou du MPE a eu un impact plus significatif sur les communautés fongiques (4/11 taxons impactés en terme d'abondance relative). De plus, nous n'avons pas pu observer un modèle récurrent d'abondances relatives diminuées ou augmentées pour ces quatre taxons en relation avec le protocole. À notre connaissance, seuls Vesty *et al* [14] ont mené une étude similaire comparant la diversité fongique des voies respiratoires supérieures et de la plaque dentaire en relation avec le protocole d'extraction. Dans leurs travaux, ils n'ont pas documenté de différences significatives dans les communautés fongiques de la plaque dentaire mais le microbiote de la plaque présentait une très faible diversité (> 99% de *Candida*). Dans la salive, 3/4 des protocoles d'extraction n'ont pas réussi à donner un nombre adéquat de lectures pour évaluer correctement la diversité fongique. Dans notre travail, nous avons également comparé la diversité fongique évaluée par séquençage d'amplicon ciblé ITS en utilisant AQE ou MPE par rapport aux résultats de culture. Dans la littérature, peu d'études ont réalisé une telle comparaison pour le microbiote respiratoire fongique [2]. Nous confirmons que le séquençage d'amplicon a détecté plus de taxons fongiques que la culture. Les taxons non détectés par la culture étaient principalement des taxons très peu représentés en plus d'un taxon majeur, *Saccharomyces*. En ce qui concerne les abondances relatives des principaux taxons fongiques détectés dans nos échantillons (*Aspergillus*, *Candida*, *Pichia*, *Nakaseomyces*, et *Saccharomyces*), les proportions détectées par séquençage après AQE étaient plus proches des résultats de la culture, en particulier pour *Candida*, *Pichia*, et *Nakaseomyces* genres. Cependant, nous ne savons pas si les résultats des cultures reflètent l'image exacte de la composition / abondance du microbiote fongique respiratoire (ou bactérien).

Le choix des ensembles d'amorces 16S ou ITS utilisés pour le séquençage ciblé des amplicons a une influence significative sur l'évaluation de la diversité taxonomique bactérienne et fongique. Ceci est particulièrement visible pour les communautés microbiennes de faible densité. Nous avons détecté plus de diversité bactérienne, et en particulier plus de taxons extrêmement peu représentés en utilisant le 16S V3-V4 par rapport à V1-V2. De plus, les abondances relatives de 11/43 taxons bactériens étaient plus élevées avec la cible 16S V3-V4 qu'avec V1-V2. De tels résultats étaient en quelque sorte attendus puisque les amorces V3-V4 avaient déjà été décrites par Klindworth *et al* comme appropriées pour le séquençage Illumina grâce à leur couverture globale élevée associée à une bonne spécificité de domaine [26]. Rooney *et coll.* [7], dans une étude comparant trois technologies différentes de séquençage à haut débit et deux cibles de région 16S (V1-V2 et V4-V5), ont déjà observé que les amorces qu'ils (comme nous) utilisaient pour V1-V2 sur Illumina MiSeq® étaient associées au détecté d'un plus petit nombre d'espèces par rapport aux autres amorces. Pour les champignons, nous avons détecté plus de taxons fongiques de très faible abondance avec ITS2 qu'avec ITS1, avec une augmentation des abondances relatives chez 7/11 taxons fongiques en utilisant ITS2 par rapport à ITS1. Le choix entre ITS1 et ITS2 pour étudier la diversité fongique dans divers microbiotes reste à ce jour indéterminé. Différentes études ont comparé les deux cibles [22 , 39 - 42] mais leurs résultats ne sont pas concordants. Wang *et coll.* [41] a mené une méta-analyse comparant les deux cibles pour l'analyse eucaryote et a découvert que ITS1 était supérieur à ITS2. Ils ont montré que l'ITS1 fonctionnait mieux en termes de taux d'amplification réussis pour un grand nombre d'espèces eucaryotes (en raison d'une teneur plus faible en GC) et que le taux de réussite global de l'identification était plus élevé (en particulier pour les fougères, les gymnospermes et les ascomycètes). À l'inverse, d'autres auteurs [22 , 39 , 40 , 43], qui ont discuté de cette question spécifiquement pour l'analyse fongique, n'ont pas démontré une nette supériorité d'une cible sur l'autre. Balaalid *et coll.* [39] ont remarqué une composition taxinomique comparable au niveau du phylum et de l'ordre et quelques divergences des deux côtés (ITS1 et ITS2) au niveau du genre. Bellemain *et al* [43] ont rapporté des biais d'amplification sélectifs associés aux amorces: l'amorce ITS1-F était biaisée vers les basidiomycètes, tandis que les amorces ITS2, ITS3 ou ITS4 étaient biaisées vers les ascomycètes [43]. Usyk *et al* [44] ont suggéré que les amorces ITS1-F et ITS2 pourraient ne pas être appropriées pour le séquençage d'amplicon ciblé et ont proposé de nouvelles amorces personnalisées pour la région ITS1. Ali *et coll.* [42], qui a travaillé spécifiquement sur des échantillons respiratoires, a constaté que l'amplification de la région ITS2 était plus précise que celle de l'ITS1. Enfin, les deux cibles ITS ayant leurs avantages, plusieurs auteurs suggèrent de les utiliser de manière concomitante puis de collecter des informations complémentaires [22 , 40 , 43]. De Filippis *et al* [45] ont même émis l'hypothèse que le ciblage de la région ITS uniquement peut conduire à une évaluation incorrecte des communautés fongiques. Il a suggéré d'utiliser d'autres cibles situées sur différentes régions du génome dans les études sur le microbiote basées sur le séquençage.

Les profils microbiologiques observés chez nos deux patients étaient remarquablement différents, comme souvent dans les analyses de microbiote basées sur le séquençage. P1 présentait un profil de diversité bactérienne très faible (un taxon largement prédominant, *Lactobacillus*) associé à un profil fongique plus diversifié (quatre taxons majeurs de levure, *Candida*, *Pichia*, *Nakaseomyces* et *Saccharomyces*). P2 avait le modèle inverse: plus de diversité bactérienne (six taxons majeurs, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Rothia*, *Prevotella*, *Lactobacillus* et *Enterococcus*) et un seul taxon fongique prédominant (*Candida*). Les principaux taxons bactériens identifiés dans P2 (en particulier *Streptococcus*, *Veillonella* et *Prevotella*) sont connus pour être des habitants habituels des voies respiratoires supérieures des humains en bonne santé [1 , 14 , 46 , 47], ce qui concorde avec le statut P2 en tant que patient hospitalisé pour une chirurgie sans comorbidités. Au contraire, le profil de diversité bactérienne très faible de P1 était moins habituel, mais cela peut être dû au statut immunodéprimé et aux médicaments antibactériens à large spectre reçus par ce patient. Similaire aux conclusions d'autres auteurs travaillant sur des échantillons des voies respiratoires supérieures [14 , 19 , 48 , 49], nous avons détecté chez les deux patients une prédominance de levures: *Candida* (principalement *Candida albicans*), *Pichia* (principalement *Candida krusei*), *Nakaseomyces* (principalement *Candida glabrata*) et *Saccharomyces* (principalement *Saccharomyces cerevisiae*). Cependant, et contrairement aux données de la littérature [14 , 48 , 49], nous n'avons pas trouvé de lectures attribuées comme *Malassezia*. Cela pourrait être lié aux protocoles d'extraction que nous avons testés. Dupuy *et al* [49] ont expliqué que *Malasseziales* espèces sont connues pour avoir des parois cellulaires épaisses, d'où la nécessité d'un protocole d'extraction sévère. La mécanique (avec lyse enzymatique ou chimique) utilisée dans AQE ou MPE peut ne pas être assez forte pour détecter les lectures de *Malassezia*. En ce qui concerne les taxons de moisissures, nous n'avons pas trouvé de genres significatifs autres qu'*Aspergillus*, qui ont été enrichis dans les crachats P1 et P2.

La principale limite de notre étude était le petit nombre d'échantillons analysés et le fait que nous n'avons pas effectué de répliques techniques pour les différentes conditions testées. Cependant, dans le domaine émergent de l'analyse combinée du microbiote bactérien et fongique des voies aériennes, les données concernant les problèmes techniques associés aux protocoles

d'extraction ou au choix des jeux d'amorces sont encore rares [14 , 15] et nos résultats pourraient encore fournir des informations précieuses pour d'autres auteurs.

Une autre difficulté rencontrée dans notre étude était que nous ne pouvions pas extraire, quantifier ou purifier l'ADN spécifiquement humain par rapport à l'ADN bactérien ou fongique. Ce fait peut introduire un biais potentiel dans la quantification de nos bibliothèques avant le séquençage. La présence d'ADN hôte pourrait ainsi diminuer la profondeur du séquençage des lectures bactériennes ou fongiques. Cependant, à notre connaissance, aucune méthode satisfaisante n'est encore disponible pour extraire, purifier ou même quantifier spécifiquement l'ADN microbien par rapport à l'ADN hôte avec une bonne fiabilité. Pour surmonter les défis potentiels associés à ce problème, différentes stratégies ont été mises en œuvre dans les études sur le microbiote. Tout d'abord, lors de la conception d'une analyse de séquençage d'amplicon ciblé, il est important d'adapter le nombre d'échantillons séquencés à chaque analyse afin d'obtenir une bonne profondeur de séquençage pour chaque échantillon et en particulier pour les lectures microbiennes. Deuxièmement, les pipelines de bioinformatique appliqués aux données brutes obtenues après séquençage comportent un processus de filtrage consistant en la suppression de la quasi-totalité des lectures attribuées comme ADN humain. Au cours des dernières années, ces pipelines bioinformatiques se sont considérablement améliorés et le processus de filtrage est maintenant très efficace et rigoureux pour éliminer l'ADN de l'hôte. Les données filtrées sont ensuite regroupées et attribuées aux taxons microbiens et enfin les abondances relatives des taxons microbiens sont comparées entre les échantillons. Ces procédures bioinformatiques permettent de limiter les biais potentiels associés à la présence de lectures de contaminants hôtes en quantité variable d'un échantillon à l'autre. Aussi, 8 , 13] .

Étant donné que les problèmes techniques peuvent influencer la compréhension des communautés microbiennes, la sélection de protocoles adaptés à la caractérisation du microbiote des crachats est nécessaire pour permettre des comparaisons inter-études. Bien que notre étude ait inclus un petit nombre de sujets, nous avons observé que l'utilisation d'un protocole automatisé (tel que QIA Symphony) comprenant à la fois la lyse mécanique et enzymatique améliorerait le rendement d'extraction de l'ADN avec plus de fiabilité et moins de temps technique. Sinon, le choix de l'extraction n'a pas fortement influencé la diversité taxonomique bactérienne ou fongique détectée dans les échantillons respiratoires (effet faible et modéré, respectivement). En revanche, le choix des ensembles d'amorces pour le séquençage d'amplicon ciblé a considérablement influencé la diversité bactérienne et fongique détectée. En particulier, nous avons observé que V3-V4, Les cibles 16S et ITS2 ont permis de détecter un nombre accru de communautés microbiennes de faible densité. Enfin, pour un séquençage d'amplicon ciblé 16S / ITS supplémentaire sur le microbiote bactérien et fongique respiratoire, nous choisissons d'utiliser le protocole automatisé décrit ci-dessus et préférons la cible ITS2 ou, si possible, combinerons ITS1 et ITS2.

Renseignements à l'appui

S1 Fig.

Courbes de raréfaction de la diversité bactérienne (A) et fongique (B) identifiées à partir de l'ADN total extrait des échantillons respiratoires de 2 patients (P1, P2) en utilisant deux protocoles d'extraction (Automatic QIA Symphony Extraction [AQE, blue] with DSP DNA midi kit and Manual PowerSoil® Extraction [MPE, rouge]) et ciblage de 2 régions 16S pour l'analyse bactérienne (V1-V2, trait plein; V3-V4, pointillé) et 2 régions ITS pour l'analyse fongique (ITS1, trait plein; ITS2, pointillé).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232215.s001>

(TIF)

S2 Fig.

Boîte à moustaches des abondances log₂ de genres bactériens détectés avec des abondances significativement différentes (valeur $P < 0,05$) lorsqu'ils sont amplifiés à l'aide de la cible V1-V2 16S [bleu foncé] ou de la cible V3-V4 16S [bleu clair].

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232215.s002>

(TIF)

S3 Fig.

Boîte à moustaches des abondances log₂ de genres ou de sections de champignons détectés avec des abondances significativement différentes (valeur $P < 0,05$) lorsqu'ils sont amplifiés en utilisant soit la cible ITS1 [bleu foncé], soit la cible ITS2 [bleu clair].

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232215.s003>

(TIF)

Tableau S1. Résultats des extractions d'ADN de 6 échantillons respiratoires (prélevés sur 6 patients, P1 à P6) à l'aide de deux protocoles d'extraction (Automated QIA Symphony Extraction [AQE] with DSP DNA midi kit et Manual PowerSoil® Extraction [MPE]).

L'ADN a été quantifié (ng / ml) en utilisant un dosage de Picogreen® et sa qualité a été déterminée en utilisant un rapport de pureté de 260/280 (Nanodrop®).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232215.s004>

(DOCX)

Tableau S2. Détection semi-quantitative de l'ADN d'*Aspergillus* extrait à l'aide de deux protocoles d'extraction d'échantillons respiratoires de 2 patients (P1, P2).

Les protocoles d'extraction utilisés étaient l'extraction automatisée QIA Symphony [AQE] avec le kit midi DSP DNA et l'extraction manuelle PowerSoil® [MPE]. Les deux crachats ont été mélangés avec 10⁵ conidies / ml d'*Aspergillus* section *Fumigati* et *Aspergillus* section *Nigri*.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232215.s005>

(DOCX)

Tableau S3. Profils de diversité (exprimés en abondance relative au niveau du genre) des contrôles négatifs en fonction des cibles d'amplification de séquençage (16S V1-V2, 16S V3-V4, ITS1 et ITS2).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232215.s006>

(DOCX)

Tableau S4. Changement de pli d'abondance (exprimé en changement de pli log₂) des genres bactériens significativement différents (valeur $P < 0,05$) par rapport à la cible d'amplification 16S utilisée (V1-V2 vs V3-V4).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232215.s007>

(DOCX)

Tableau S5. Changement de pli d'abondance (exprimé sous forme de changement de pli log₂) de genres ou de sections fongiques significativement différents (valeur $P < 0,05$) par rapport à la cible d'amplification ITS utilisée (ITS1 vs ITS2).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232215.s008>
(DOCX)

Tableau S6.

Mesures de diversité alpha (indices de Shannon, Simpson et Chao1) pour des analyses de séquençage d'amplicon ciblé bactérien (A) et fongique (B) réalisées sur des échantillons respiratoires de 2 patients (P1 et P2). L'ADN a été extrait en utilisant deux protocoles d'extraction (Automated QIASymphony Extraction [AQE] with DSP DNA midi kit et Manual PowerSoil® Extraction [MPE]). Les cibles d'amplification utilisées étaient V1-V2 et V3-V4 pour l'analyse bactérienne et ITS1 et ITS2 pour l'analyse fongique.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232215.s009>
(DOCX)

Tableau S7.

Changement de pli d'abondance (exprimé sous forme de changement de pli log2) des taxons bactériens (A) et fongiques (B) significativement différents (valeur $P < 0,05$) en ce qui concerne le protocole d'extraction utilisé (extraction manuelle PowerSoil® MoBio [MPE] vs QIASymphony automatisée extraction [AQE]).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232215.s010>
(DOCX)

Remerciements

Nous remercions Vanessa Demontant pour son aide précieuse sur toutes les étapes techniques du séquençage haut débit et Guillaume Gricourt pour son aide dans l'analyse des données. Nous remercions Stephanie Ferreira de Genoscreen et Laurence Delhaes pour leurs conseils sur les questions techniques et d'analyse. Nous remercions le Dr Suhad Assad pour sa critique linguistique.

Les références

1. Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, Freeman CM, Schmidt TM, Young VB, et al. Analyse des microbiotes des voies respiratoires supérieures comme source des microbiotes pulmonaires et gastriques chez les individus en bonne santé. *mBio*. 2015; 6. pmid: 25736890
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
2. Botterel F, Angebault C, Cabaret O, Stressmann FA, Costa JM, Wallet F, et al. Diversité fongique et bactérienne du microbiote des voies respiratoires chez les adultes atteints de fibrose kystique: concordance entre les méthodes conventionnelles et le séquençage ultra-profond, et leur utilisation pratique dans le laboratoire clinique. *Mycopathologie*. 2017. pmid: 28766039
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
3. Delhaes L, Monchy S, Frealle E, Hubans C, Salleron J, Leroy S, et al. Le microbiote des voies respiratoires dans la fibrose kystique: une communauté fongique et bactérienne complexe - Implications pour la gestion thérapeutique. *PLoS ONE*. 2012; 7. pmid: 22558432
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
4. Huang YJ et LiPuma JJ. Le microbiome dans la fibrose kystique. *Clin Chest Med*. 2016; 37: 59–67. pmid: 26857768
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
5. Tipton L, Ghedin E, Morris A. Le mycobiome pulmonaire à l'ère du séquençage de nouvelle génération. *Virulence*. 2016; 8: 334–341. pmid: 27687858
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
6. Angebault C, Ghozlane A, Volant S, Botterel F, d'Enfert C, Bougnoux ME. Analyses combinées du microbiote intestinal bactérien et fongique: impact des conditions de stockage et des protocoles d'extraction d'ADN. *PLoS ONE*. 2018; 13: e0201174. pmid: 30074988
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
7. Clooney AG, Fouhy F, Sleator RD, O'Driscoll A, Stanton C, Cotter PD, et al. Comparer les pommes et les oranges?: Séquençage de nouvelle génération et son impact sur l'analyse du microbiome. *PLoS One*. 2016; 11. pmid: 26849217
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
8. Costea PI, Zeller G, Sunagawa S, Pelletier E, Alberti A, Levenez F, et al. Vers des normes pour le traitement des échantillons fécaux humains dans les études métagénomiques. *Nat Biotechnol*. 2017; 35: 1069-1076. pmid: 28967887
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
9. Dominianni C, Wu J, Hayes RB, Ahn J. Comparaison des méthodes de collecte de biospécimens de microbiome fécal. *BMC Microbiol*. 2014; 14: 103. pmid: 24758293
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
- dix. Fouhy F, Deane J, Rea MC, O'Sullivan Ó, Ross RP, O'Callaghan G, et al. Les effets de la congélation sur le microbiote fécal tels que déterminés à l'aide du séquençage MiSeq et des enquêtes basées sur la culture. *PLoS One*. 2015; 10. pmid: 25748176
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
11. Wen Y, Xiao F, Wang C, Wang Z. L'impact de différentes méthodes d'extraction d'ADN sur les mesures de la communauté microbienne d'échantillons BALF sur la base de données métagénomiques. *Suis J Transl Res*. 2016; 8: 1412–1425. pmid: 27186268
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
12. Dollive S, Peterfreund GL, Sherrill-Mix S, Bittinger K, Sinha R, Hoffmann C, et al. Une trousse à outils pour quantifier les séquences génétiques d'ARNr eucaryotes à partir d'échantillons de microbiome humain. *Genome Biol*. 2012; 13: R60. pmid: 22759449
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)

13. Huseyin CE, Rubio RC, O'Sullivan O, Cotter PD, Scanlan PD. La frontière fongique: une analyse comparative des méthodes utilisées dans l'étude du mycobiome intestinal humain. *Microbiol avant.* 2017; 8. pmid: 28824566
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
14. Vesty A, Biswas K, Taylor MW, Gear K, Douglas RG. Évaluation de l'impact de la méthode d'extraction d'ADN sur la représentation des communautés bactériennes et fongiques orales humaines. *PLoS ONE.* 2017; 12. pmid: 28099455
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
15. Rosenbaum J, Usyk M, Chen Z, Zolnik CP, Jones HE, Waldron L, et al. Évaluation des méthodes d'extraction d'ADN de la cavité buccale sur le microbiote bactérien et fongique. *Sci Rep.* 2019; 9: 1531. pmid: 30728424
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
16. Gratuit SJ. Organisation et biosynthèse de la paroi cellulaire fongique. *Adv Genet.* 2013; 81: 33–82. pmid: 23419716
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
17. Karakousis A, Tan L, Ellis D, Alexiou H, Wormald PJ. Une évaluation de l'efficacité des méthodes d'extraction d'ADN fongique pour maximiser la détection de champignons médicalement importants à l'aide de la PCR. *J Méthodes Microbiol.* 2006; 65: 38–48. pmid: 16099520
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
18. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. Région de l'espaceur transcrit interne ribosomique nucléaire (ITS) comme marqueur de code-barres ADN universel pour les champignons. *Proc Natl Acad Sci US A.* 2012; 109: 6241–6246. pmid: 22454494
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
19. Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A, et al. Caractérisation du microbiome fongique oral (mycobiome) chez les individus sains. *PLoS Pathog.* 2010; 6: e1000713. pmid: 20072605
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
20. Findley K, Oh J, Yang J, Conlan S, Deming C, Meyer JA, et al. Diversité topographique des communautés fongiques et bactériennes de la peau humaine. *La nature.* 2013; 498: 367–370. pmid: 23698366
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
21. Iliev ID, Funari VA, Taylor KD, Nguyen Q, Reyes CN, Strom SP, et al. Les interactions entre les champignons commensaux et le récepteur de la lectine de type C Dectin-1 Influencent la colite. *Science.* 2012; 336: 1314–1317.
[Voir l'article](#) • [Google Scholar](#)
22. Hamad I, Sokhna C, Raoult D, Bittar F. Détection moléculaire des eucaryotes dans un seul échantillon de selles humaines du Sénégal. *PLoS One.* 2012; 7. pmid: 22808282
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
23. Murray PR, Washington JA. Analyse microscopique et bactériologique des expectorations expectorées. *Mayo Clin Proc.* 1975; 50: 339–344. pmid: 1127999
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
24. Challier S, Boyer S, Abachin E, Berche P. Développement d'un test de PCR en temps réel Taqman à base de sérum pour le diagnostic de l'aspergillose invasive. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 844–846. pmid: 14766869
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
25. Bretagne S, Costa JM, Marmorat-Khuong A, Poron F, Cordonnier C, Vidaud M, et al. Détection de l'ADN de l'espèce *Aspergillus* dans les échantillons de lavage bronchoalvéolaire par PCR compétitive. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 1164–1168. pmid: 7615723
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
26. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Évaluation des amorces générales de PCR du gène ARN ribosomique 16S pour les études de diversité classiques et de prochaine génération basées sur le séquençage. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41: e1. pmid: 22933715
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
27. Illumina. Préparation de la bibliothèque de séquençage métagénomique 16S. 2014. Disponible:
http://emea.support.illumina.com/downloads/16s_metagenomic_sequencing_library_preparation.html#
28. Cui L, Morris A, Ghedin E. Le mycobiome humain dans la santé et la maladie. *Genome Med.* 2013; 5: 63. pmid: 23899327
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
29. Gardes M, Bruns TD. Amorces ITS à spécificité accrue pour les basidiomycètes - application à l'identification des mycorhizes et des rouilles. *Écologie moléculaire.* 1993; 2: 113–118. pmid: 8180733
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
30. White TJ, Bruns L, Lee S, Taylor J. Amplification et séquençage direct des gènes d'ARN ribosomique fongique pour la phylogénétique. *Protocoles PCR: Guide des méthodes et des applications.* New York: Presse académique; 1990. pp. 315–322.
31. Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glöckner FO, Ludwig W, Schleifer KH, et al. Unification de la classification des bactéries et archées cultivées et non cultivées à l'aide de séquences génétiques d'ARNr 16S. *Nat Rev Microbiol.* 2014; 12: 635–645. pmid: 25118885
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)

32. Quereda JJ, Dussurget O, Nahori MA, Ghozlane A, Volant S, Dillies MA, et al. La bactériocine des souches épidémiques de *Listeria* modifie le microbiote intestinal de l'hôte pour favoriser l'infection. *Proc Natl Acad Sci US A*. 2016; 113: 5706-5711. pmid: 27140611
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
33. Love MI, Huber W, Anders S. Estimation modérée du changement de pli et de la dispersion pour les données RNA-seq avec DESeq2. *Genome Biol*. 2014; 15. pmid: 25516281
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
34. Infections broncho-pulmonaires. 5e édition. REMIC Référentiel en microbiologie médicale. 5e édition. Société Française de Microbiologie Ed .; 2015. Disponible: <https://www.decitre.fr/livres/remic-2015-9782878050325.html>
35. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. Un catalogue de gènes microbiens intestinaux humains établi par séquençage métagénomique. *La nature*. 2010; 464: 59–65. pmid: 20203603
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
36. Sohrabi M, Nair RG, Samaranyake LP, Zhang L, Zulfiker AHMd, Ahmetagic A, et al. Le rendement et la qualité des extraits d'ADN cellulaire et bactérien d'échantillons de rinçage oral humain sont affectés de manière variable par la méthodologie de lyse cellulaire. *Journal des méthodes microbiologiques*. 2016; 122: 64–72. pmid: 26812577
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
37. Lazarevic V, Gaña N, Girard M, François P, Schrenzel J. Comparaison des méthodes d'extraction d'ADN dans l'analyse des communautés bactériennes salivaires. *PLoS One*. 2013; 8. pmid: 23844068
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
38. Biesbroek G, Sanders EAM, Roeselers G, Wang X, Caspers MPM, Trzciński K, et al. Analyses de séquençage en profondeur des communautés microbiennes de faible densité: travailler à la frontière de la détection précise du microbiote. *PLoS One*. 2012; 7. pmid: 22412957
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
39. Balaalid R, Kumar S, Nilsson RH, Abarenkov K, Kirk PM, Kauserud H. ITS1 contre ITS2 comme métabarcodes d'ADN pour les champignons. *Ressources en écologie moléculaire*. 2013; 13: 218-224. pmid: 23350562
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
40. Monard C, Gantner S, Stenlid J. Utilisant ITS1 et ITS2 pour étudier la diversité fongique environnementale à l'aide du pyroséquençage. *FEMS Microbiol Ecol*. 2013; 84: 165-175. pmid: 23176677
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
41. Wang XC, Liu C, Huang L, Bengtsson-Palme J, Chen H, Zhang JH, et al. ITS1: un code-barres ADN meilleur que ITS2 chez les eucaryotes? *Mol Ecol Resour*. 2015; 15: 573-586. pmid: 25187125
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
42. Aii NABM, Mac Aogáin M, Morales RF, Tiew PY, Chotirmall SH. Optimisation et analyse comparative du séquençage d'amplicons ciblés pour l'analyse du mycobiome d'échantillons respiratoires. *Int J Mol Sci*. 2019; 20. pmid: 31601001
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
43. Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kauserud H. ITS comme code-barres ADN environnemental pour les champignons: une approche in silico révèle des biais potentiels de la PCR. *BMC Microbiol*. 2010; 10: 189. pmid: 20618939
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
44. Usyk M, Zolnik CP, Patel H, Levi MH, Burk RD. Nouvelles amorces fongiques ITS1 pour la caractérisation du mycobiome. *mSphere*. 2017; 2. pmid: 29242834
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
45. De Filippis F, Laiola M, Blaiotta G, Ercolini D. Différentes cibles d'amplicons pour les études basées sur le séquençage de la diversité fongique. *Appl Environ Microbiol*. 2017; 83. pmid: 28625991
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
46. Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, Fitzgerald AS, Frank I, Yadav A, et al. Continuité topographique des populations bactériennes dans les voies respiratoires humaines saines. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011; 184: 957–963. pmid: 21680950
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
47. Lim MY, Yoon HS, Rho M, Sung J, Song YM, Lee K, et al. Analyse de l'association entre la génétique de l'hôte, le tabagisme et le microbiote des expectorations chez les humains en bonne santé. *Rapports scientifiques*. 2016; 6. pmid: 27030383
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
48. Willger SD, Grim SL, Dolben EL, Shipunova A, Hampton TH, Morrison HG, et al. Caractérisation et quantification du microbiome fongique dans des échantillons en série d'individus atteints de fibrose kystique. *Microbiome*. 2014; 2: 40. pmid: 25408892
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
49. Dupuy AK, David MS, Li L, Heider TN, Peterson JD, Montano EA, et al. Redéfinir le mycobiome oral humain avec des pratiques améliorées dans la taxonomie basée sur l'amplicon: découverte de *Malassezia* en tant que commensal de premier plan. *PLoS One*. 2014; 9. pmid: 24614173
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)

