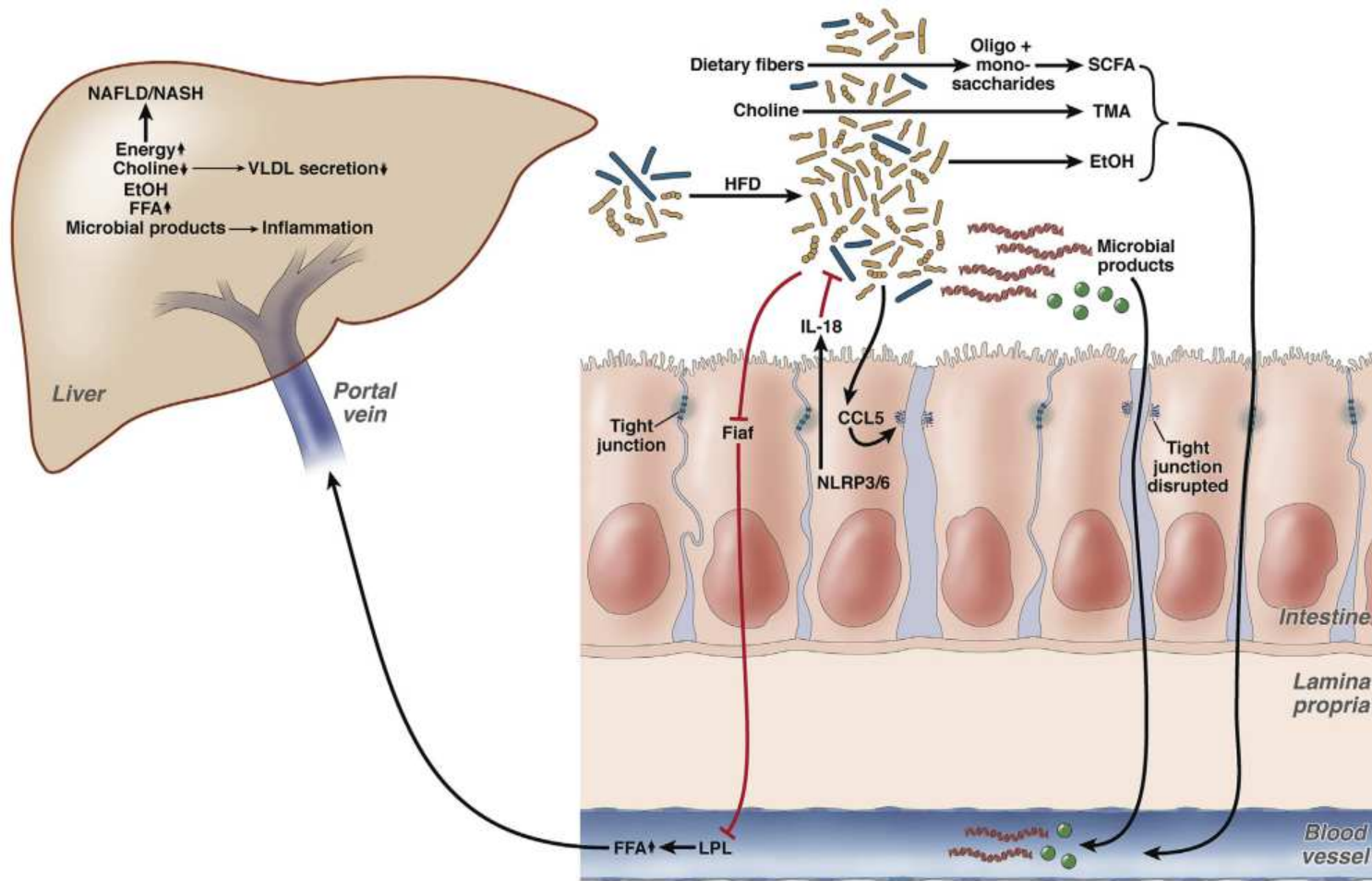


La métagénomique montre des modifications dans la composition taxonomique et fonctionnelle du microbiote intestinal chez les patients atteints de NASH

Jerome Boursier (1, 2), Matthieu Barret (3), Julien Mace (3), Gilles Hunault (2), Cytia Guy (4), Lionel Fizanne (2), Adrien Lannes (1), Frédéric Oberti (1,2), Isabelle Fouchard-Hubert (1,2), Paul Cales (1,2), Anne Mae Diehl (5)

1. Service d'Hépatogastroentérologie, Hôpital Universitaire, Angers, France
2. Laboratoire HIFIH, UPRES 3859, SFR 4208, Université LUNAM, Angers, France
3. INRA, UMR1345 Institut de Recherches en Horticulture et Semences, SFR4207 QUASAV, F-49071, Beaucouzé, France
4. Department of Pathology, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, United States of America
5. Division of Gastroenterology, Department of Medicine, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, United States of America

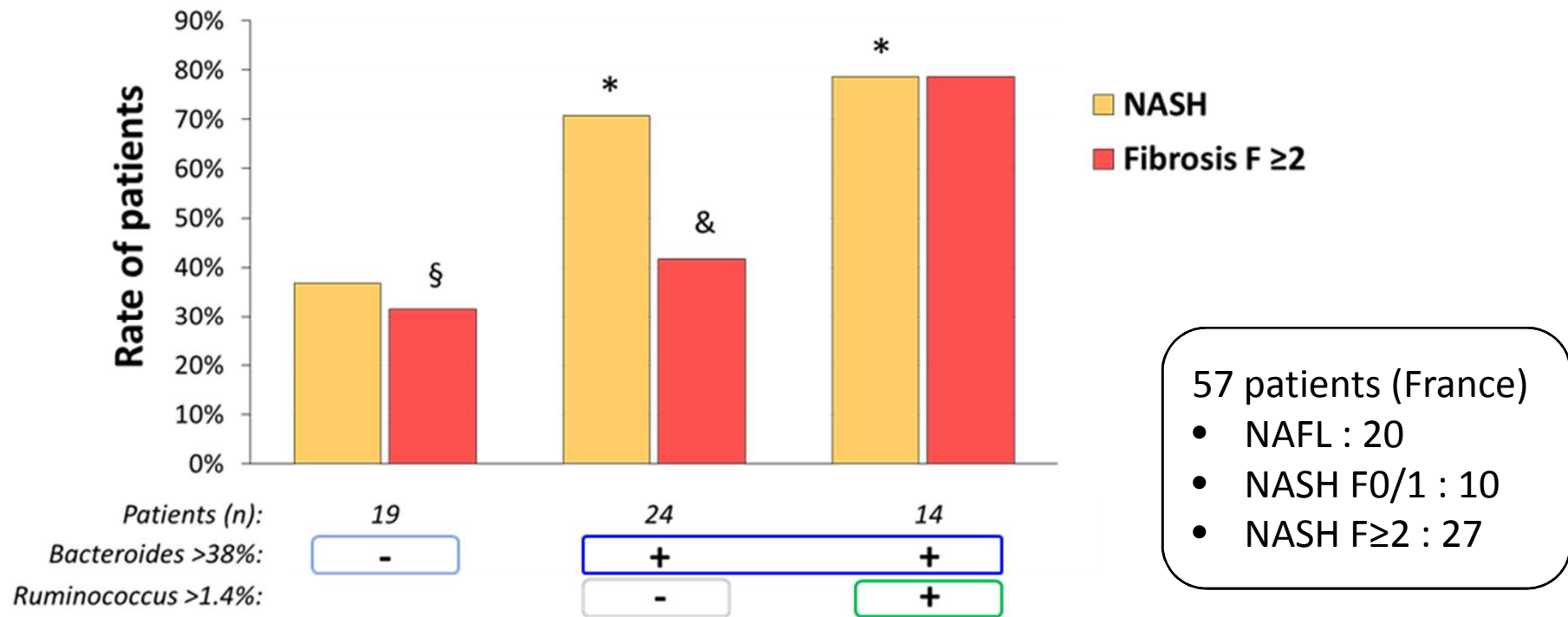
Introduction



Introduction

Reference	Patients	Sample size	Method	Results
Raman 2013	Adults (Canada)	30 healthy controls 30 NAFLD	16S ribosomal RNA pyrosequencing (Roche GS Junior platform)	In NAFLD vs controls: ↑ Kiloniellaceae, Pasteurellaceae, Lactobacillus, Veillonellaceae, Robinsoniella, Roseburia, Dorea ↓ Ruminococcaceae, Oscillibacter, Porphyromonadaceae
Mouzaki 2013	Adults (Canada)	17 healthy controls 11 simple steatosis* 22 NASH*	qPCR	In NASH vs simple steatosis: ↑ Clostridium coccoides In NASH patients vs both simple steatosis and controls: ↓ Bacteroidetes
Zhu 2013	Children (USA)	16 healthy controls 25 obeses 22 NASH*	16S ribosomal RNA pyrosequencing (454-FLX-Titanium Genome Sequencer)	In NASH vs obeses or controls ↑ Escherichia
Wong 2013	Adults (China)	22 healthy controls 16 NASH*	16S ribosomal RNA pyrosequencing (GS FLX system)	In NASH vs controls: ↑ Parabacteroides, Allisonella ↓ Faecalibacterium, Anaerospobacter
Munukka 2014	Adults (Finland)	21 low hepatic fat 10 high hepatic fat	Oligonucleotide probe targeting 16s RNA	In patients with high vs low hepatic fat content: ↓ Faecalibacterium prausnitzii
Del Chierico 2017	Children (Italy)	54 controls 8 obeses 27 NAFL 26 NASH	16S ribosomal RNA pyrosequencing (Roche 454 Life Sciences)	In patients with NAFL vs controls: ↑ Bradyrhizobium, Anaerococcus, Peptoniphilus, Propionibacterium acnes, Dorea, Ruminococcus ↓ Oscillospira, Rikenellaceae

Introduction



Introduction

KO functional categories		NASH vs no NASH		F \geq 2 vs F0/1	
Level 2	Level 3	LDA	p	LDA	p
Biosynthesis of Other Secondary Metabolites	Phenylpropanoid biosynthesis	2.34	0.03	-	-
Carbohydrate metabolism	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	2.28	0.03	2.28	0.02
Carbohydrate metabolism	Pentose and glucuronate interconversions	-	-	2.74	0.02
Carbohydrate metabolism	Pentose phosphate pathway	-	-	2.44	0.01
Carbohydrate metabolism	Starch and sucrose metabolism	2.68	0.01	-	-
Carbohydrate metabolism	Unclassified	2.22	0.02	2.27	0.01
Lipid Metabolism	Fatty acid biosynthesis	-	-	2.10	0.03
Lipid Metabolism	Lipid biosynthesis proteins	-	-	2.07	0.03
Lipid Metabolism	Sphingolipid metabolism	2.45	0.04	-	-
Metabolism of Other Amino Acids	Cyanoamino acid metabolism	2.27	0.03	-	-
Translation	Translation factors	-	-	-2.25	0.05
Replication and repair	DNA replication proteins	-	-	-2.55	0.04

Introduction

KO functional categories		NASH vs no NASH		F ≥2 vs F0/1	
Level 2	Level 3	LDA	p	LDA	p
Biosynthesis of Other Secondary Metabolites	Phenylpropanoid biosynthesis	2.34	0.03	-	-
Carbohydrate metabolism	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	2.28	0.03	2.28	0.02
Carbohydrate metabolism	Pentose and glucuronate interconversions	-	-	2.74	0.02
Carbohydrate metabolism	Pentose phosphate pathway	-	-	2.44	0.01
Carbohydrate metabolism	Starch and sucrose metabolism	2.68	0.01	-	-
Carbohydrate metabolism	Unclassified	2.22	0.02	2.27	0.01
Lipid Metabolism	Fatty acid biosynthesis	-	-	2.10	0.03
Lipid Metabolism	Lipid biosynthesis proteins	-	-	2.07	0.03
Lipid Metabolism	Sphingolipid metabolism	2.45	0.04	-	-
Metabolism of Other Amino Acids	Cyanoamino acid metabolism	2.27	0.03	-	-
Translation	Translation factors	-	-	-2.25	0.05
Replication and repair	DNA replication proteins	-	-	-2.55	0.04

Objectif

Utiliser une approche en **métagénomique** « shotgun »

Pour identifier les **taxons** et **fonctions bactériennes** du microbiote intestinal associés à la NASH

Patients et Méthodes

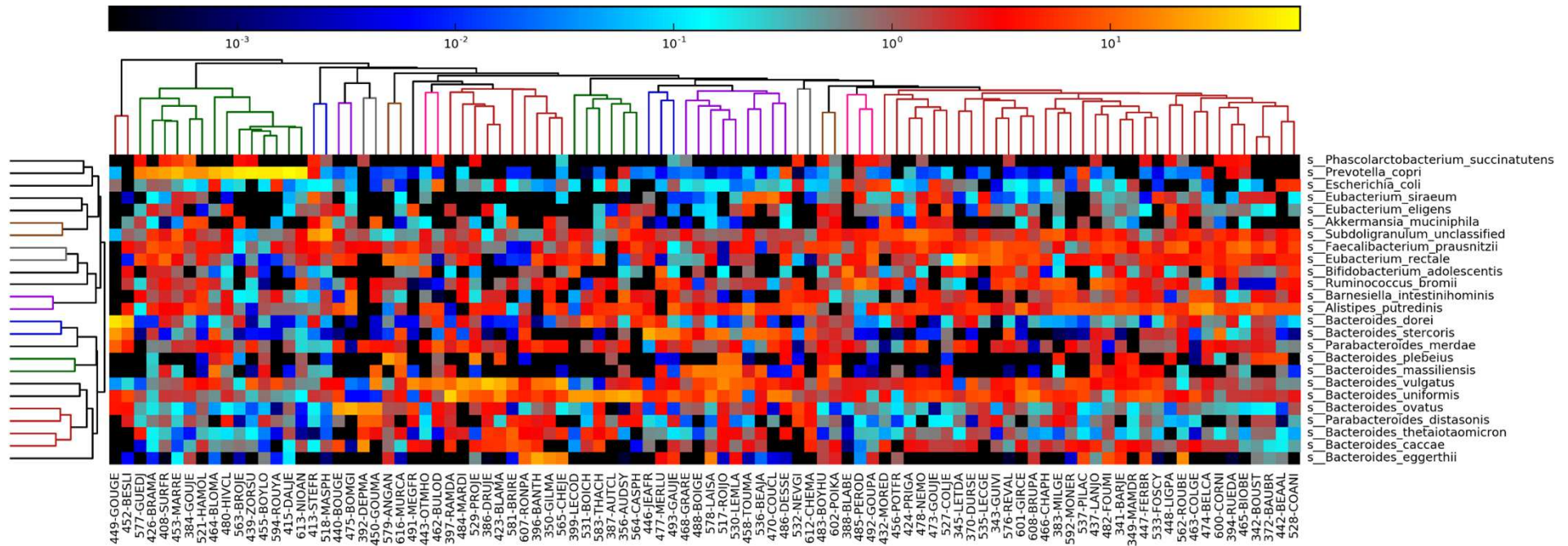
- 96 patients avec NAFLD prouvée histologiquement
- Analyse histologique selon classification NASH CRN (C Guy, Duke)
- NASH définie par grades stéatose ≥ 1 et ballooning ≥ 1 et inflammation lobulaire ≥ 1
- Prélèvement de selles le jour de la biopsie hépatique
- Extraction de l'ADN fécal avec le kit MoBIO
- Séquençage de l'ADN fécal sur Illumina HiSeq3000 (2 x 150b)
- 15 millions reads pairés en moyenne par échantillon (1 To données pour les 96 patients)

Caractéristiques des patients

	Tous	NAFL	NASH	p
Patients (n)	96	42	54	-
Age (années)	56,7 ± 12,1	55,5 ± 13,0	57,6 ± 11,4	0,469
Sexe masculin (%)	62,5	73,8	53,7	0,056
BMI (kg/m ²)	31,5 ± 5,4	30,5 ± 5,0	32,3 ± 5,5	0,058
Diabète (%)	46,9	21,4	66,7	<0,001
ASAT (UI/l)	46 ± 23	39 ± 19	52 ± 25	0,001
ALAT (UI/l)	68 ± 41	60 ± 44	75 ± 38	0,021
TP (%)	98 ± 13	98 ± 12	97 ± 13	0,93
Plaquettes (%)	218 ± 55	216 ± 54	219 ± 55	0,425

Inférence taxonomique

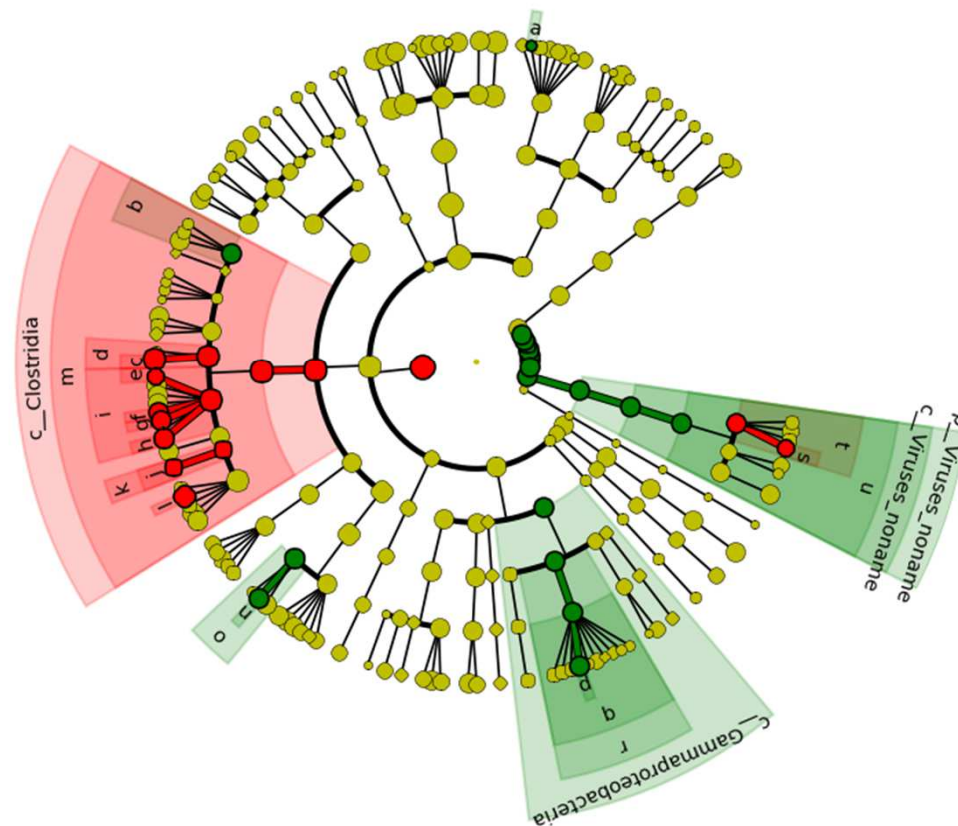
- MetaPhlAn2 : 1M marqueurs taxon-spécifiques obtenus à partir de 17 000 génomes bactériens (Truong *et al.*, 2015)



Identification de taxons associés à la NASH

- LEfSe (Linear discriminant analysis effect size, Segata et al. 2011)

■ NASH -
■ NASH +

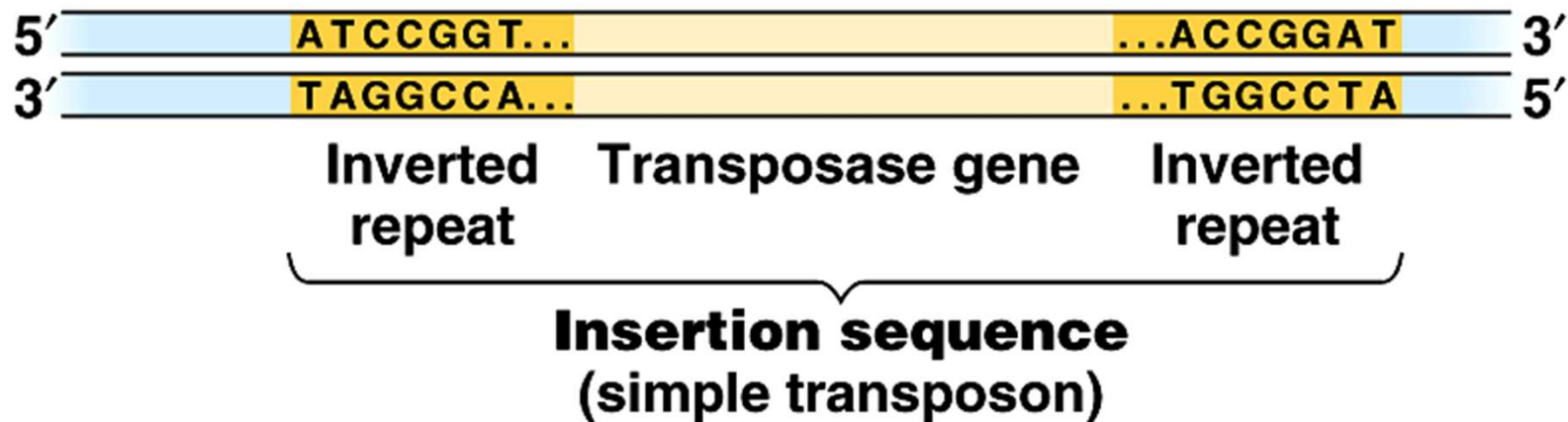


- a: g_Olsenella
- b: f_Clostridiaceae
- c: g_Eubacterium
- d: f_Eubacteriaceae
- e: g_Anaerostipes
- f: g_Dorea
- g: g_Lachnospiraceae_nona
- h: g_Roseburia
- i: f_Lachnospiraceae
- j: g_Peptostreptococcaceae
- k: f_Peptostreptococcaceae
- l: g_Faecalibacterium
- m: o_Clostridiales
- n: g_Acidaminococcus
- o: f_Acidaminococcaceae
- p: g_Escherichia
- q: f_Enterobacteriaceae
- r: o_Enterobacteriales
- s: g_C2likevirus
- t: f_Siphoviridae
- u: o_Caudovirales

Identification de fonctions associées à la NASH

- 6 familles de gènes associées à la NASH
- Dont 4 familles de gènes = éléments d'insertion (IS)

DNA

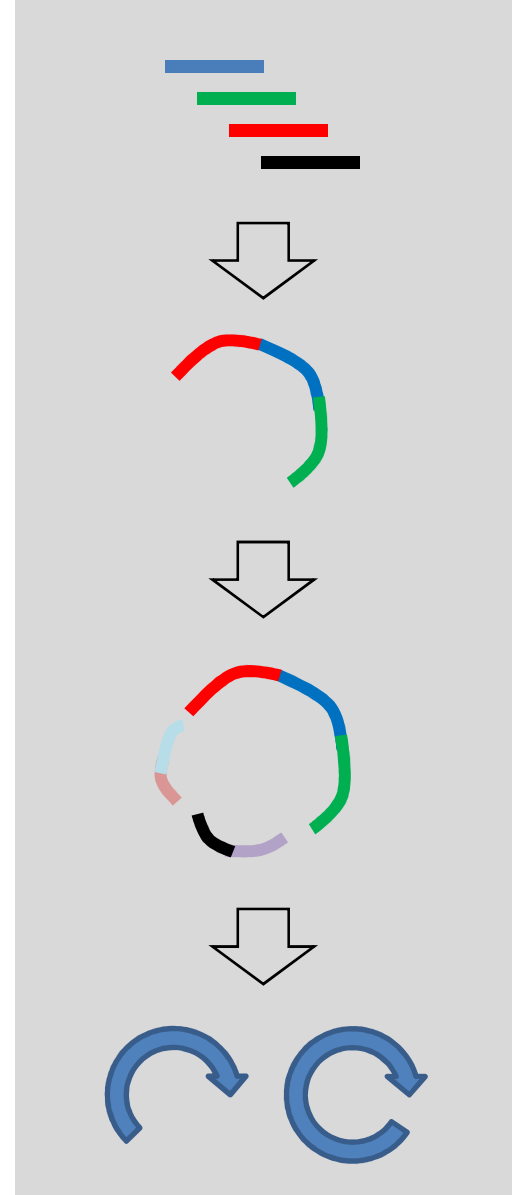


Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

- Génère de la diversité -> inactivation de gènes
- Nécessité de savoir où sont situés ces IS

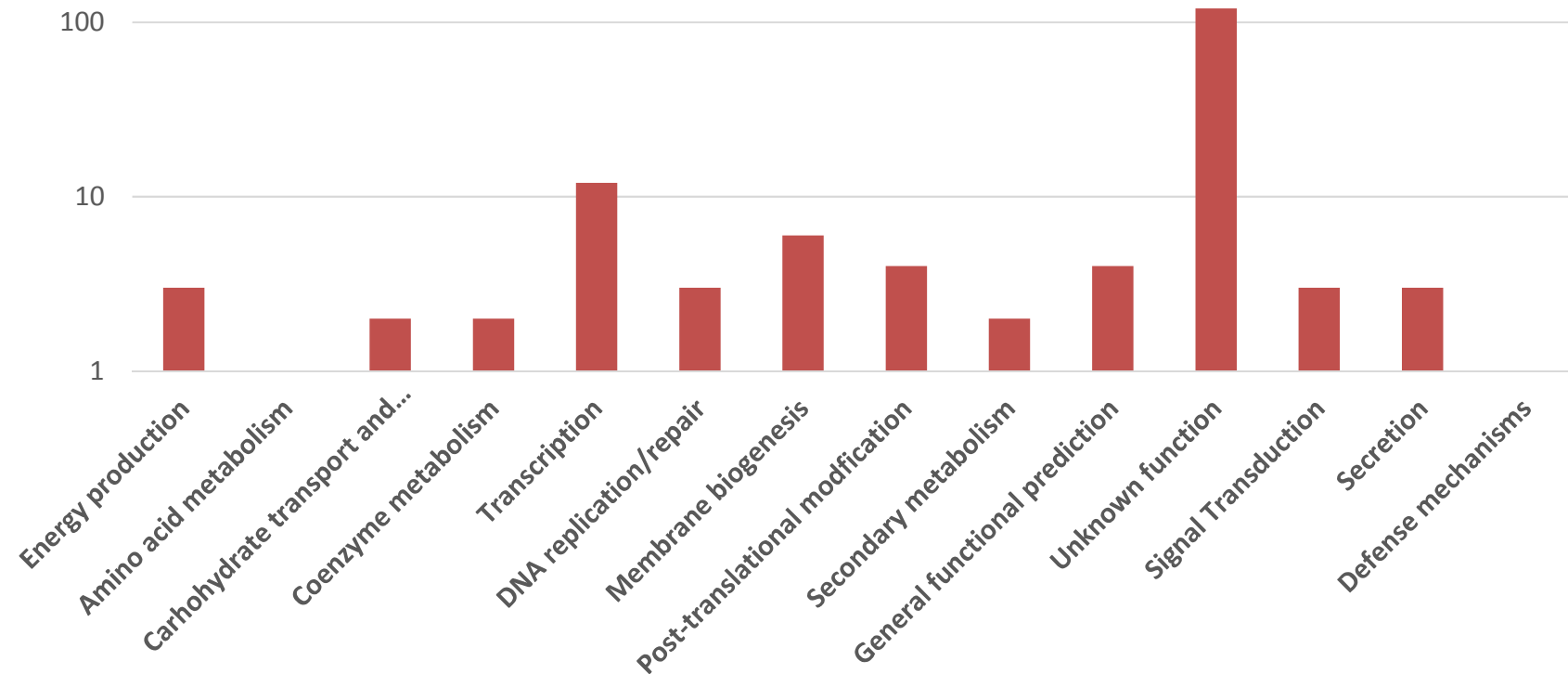
Reconstruction de génomes bactériens

- 1450 millions reads
- Assemblages des reads en 2,5 millions de contigs
- Regroupement des contigs en 1037 « bin » (= génome bactérien)
- Sélection de 374 génomes >50% complétude



Familles de gènes enrichis

- Protéomes prédits des 374 génomes bactériens classés dans 17 058 groupes d'orthologues
- Augmentation de la fréquence de 166 familles de gènes chez les patients NASH



Familles de gènes enrichis

COG0625: glutathione s-transferase

- catalyse de nombreuses réactions dont la plus connue est la conjugaison du GSH réduit à des substrats endogènes et xénobiotiques

NOG132525: OmpA family

- Protéines OmpA impliquées dans des processus pathogéniques tels que adhésion bactérienne, invasion, survie intracellulaire, échappement aux défenses de l'hôte, stimulation de la production de cytokines pro-inflammatoires

NOG101331: Diacylglycerol kinase

- Catalyse la conversion de diglycérides en acides phosphatidiques précurseurs pour la biosynthèse de nombreux lipides

Conclusion

- La métagénomique permet d'étudier la composition et les fonctions du microbiote intestinal
- Cette méthode permet d'apporter de nouvelles hypothèses physiopathologiques dans la NAFLD
- Néanmoins :
 - Compte tenu de l'abondance des données générées, de larges échantillons sont théoriquement nécessaires pour obtenir des résultats robustes
 - La fonction de nombreux gènes reste inconnue

Remerciements



Laboratoire HIFIH

- **Hépatologie**

P Calès, F Oberti, I Hubert, A Lannes

- **Anatomopathologie**

MC Rousselet, S Michalak

- **Radiologie**

C Aube, J Lebigot, V Cartier

- **Biochimie**

V Moal

- **Unité de Recherche Clinique**

S Girre, A Morisset, P Veillon, M de Saint Loup, N Saint Pierre, S Bertrais

- **Recherche Pré-clinique**

L Fizanne, J Chaigneau



Centre de Ressources Biologiques CHU Angers

O Blanchet, B Sekour

Plateforme GenoToul

O Bouchez

INRA Institut IHRS

M Barret, J Mace

Duke University

AM Diehl, M Abdelmalek, C Guy

Laboratoire LERIA



Abondance relative des génomes bactériens



- Génome spécifique de chaque patient
- Génomes Clostridia + fréquent chez NASH –
- Génomes Ruminococcus + fréquent NASH+