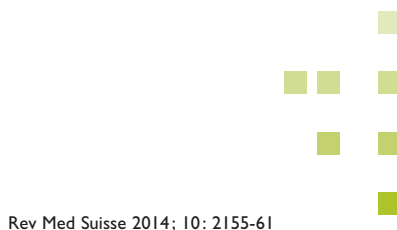




Génomique et métagénomique bactériennes: applications cliniques et importance médicale



Rev Med Suisse 2014; 10: 2155-61

S. M. Diene
C. Bertelli
T. Pillonel
J. Schrenzel
G. Greub

Bacterial genomics and metagenomics: clinical applications and medical relevance

New sequencing technologies provide in a short time and at low cost high amount of genomic sequences useful for applications such as: a) development of diagnostic PCRs and/or serological tests; b) detection of virulence factors (virulome) or genes/SNPs associated with resistance to antibiotics (resistome) and c) investigation of transmission and dissemination of bacterial pathogens. Thus, bacterial genomics of medical importance is useful to clinical microbiologists, to infectious diseases specialists as well as to epidemiologists. Determining the microbial composition of a sample by metagenomics is another application of new sequencing technologies, useful to understand the impact of bacteria on various non-infectious diseases such as obesity, asthma, or diabetes. Genomics and metagenomics will likely become a specialized diagnostic analysis.

Les nouvelles technologies de séquençage permettent d'obtenir rapidement pour un coût abordable des séquences génomiques pour des applications telles que a) le développement de PCR diagnostiques ou de tests sérologiques; b) la détection de facteurs de virulence et de gènes de résistance aux antibiotiques et c) l'épidémiologie de bactéries pathogènes. Ainsi, la génomique bactérienne est utile aux microbiologistes, aux infectiologues et aux spécialistes en hygiène hospitalière. La détermination de la composition microbienne d'un prélèvement, appelée métagénomique, est une autre application des nouvelles technologies de séquençage. L'étude des microbiotes humains est utile pour comprendre l'impact des bactéries sur l'obésité, l'asthme, ou le diabète. La métagénomique deviendra probablement une analyse diagnostique spécialisée.

INTRODUCTION

Le séquençage, permettant de déterminer la succession des bases nucléotidiques de l'ADN, a révolutionné la recherche scientifique. En 1977, Sanger et coll. séquençaient le premier génome d'un virus bactérien (Φ X174) par synthèse enzymatique.¹ Depuis lors, des améliorations techniques considérables ont permis l'émergence de nouvelles technologies de séquençage (NTS) dites «à haut débit» (tableau 1). Ces NTS ont massivement accéléré la vitesse de séquençage et ont simultanément réduit son coût. Plus récemment, des modèles de séquenceurs plus compacts tels que Roche/454 GS Junior, Illumina MiSeq ou Ion torrent PGM ont été mis sur le marché.² Moins chers mais moins productifs, ils ont toutefois une capacité suffisante pour des laboratoires de bactériologie diagnostique étant donné la taille des génomes bactériens (environ 1000 fois plus petits que le génome humain). L'utilisation des séquenceurs à haut débit a conduit à une augmentation exponentielle du nombre de génomes bactériens séquencés (figure 1). Ainsi, 98% des 26000 génomes actuellement disponibles ont été séquencés durant ces sept dernières années. Les données disponibles sur les communautés microbiennes sont également en forte croissance, grâce aux approches métagénomiques.

GÉNOMIQUE OU MÉTAGÉNOMIQUE: COMMENT DÉBUTER?

La génomique bactérienne, permettant l'étude des génomes bactériens (leur structure, leur évolution, la fonction des gènes codés et leur régulation), est principalement basée sur l'isolement et la culture d'une bactérie donnée. L'obtention d'une culture pure est une étape essentielle pour relier le phénotype particulier d'une souche bactérienne à son contenu en gènes, notamment pour étudier spécifiquement sa virulence, sa pathogénicité ou sa résistance.

Néanmoins, la très grande majorité des bactéries (plus de 99%) sont non cultivables.³ Ainsi, afin d'étudier une communauté bactérienne dans son ensemble, il est aujourd'hui possible de séquencer l'ADN de toutes les bactéries présentes dans un milieu donné (sol, eau, tube digestif de l'homme et des animaux, échantillons cliniques...). Cette approche, nommée «métagénomique», nous renseigne



Tableau 1. Tableau comparatif des différentes technologies de séquençage à haut débit

*SMRT: Single molecule real time sequencing; pb: paire de bases.

	Sanger	Roche		Illumina		Life Technologies		Pacific Biosciences
	Sanger	454 Junior Titanium	454 GS FLX+	MiSeq	HiSeq 2000/2500	Ion torrent PGM	5500xl SOLiD	PacBio RS
Date de lancement	1977	2005		2006		2006		2010
Méthode de séquençage	Synthèse	Synthèse	Synthèse	Synthèse	Synthèse	Synthèse	Ligation	SMRT*
Longueur maximale des reads	1 100 pb	400 pb	700 pb	300 pb	150 pb	400 pb	2x60 pb	5 à 20 Kpb
Production par run	1,9 ~ 84 Kpb	35 Mpb	700 Mpb	4,5 Gpb	600 Gpb	2 Gpb	95 Gpb	5 Gpb
Durée d'un run	3 heures	10 heures	23 heures	27 heures	11 jours	4 heures	6 jours	2 jours
Coût par Mpb	2400 \$	Environ 20 \$	10 \$	0,26 \$	0,07 \$	0,5 \$	0,13 \$	0,14 \$

sur la diversité et l'abondance relative des micro-organismes présents.

Comme illustré dans la **figure 2**, le séquençage du génome complet d'une bactérie ou le séquençage métagénomique s'effectue en quatre étapes principales: a) extraction de l'ADN génomique, soit à partir d'une culture bactérienne pure, soit directement à partir d'un échantillon; b) séquençage de l'ADN avec ou sans amplification préalable; c) assemblage bio-informatique du ou des génomes séquencés et d) analyse des séquences obtenues.

APPLICATIONS DE LA GÉNOMIQUE EN MICROBIOLOGIE CLINIQUE

De nouvelles applications des NTS émergent dans le domaine médical (**tableau 2**), telles que: le développement

d'outils moléculaires de diagnostic plus performants, l'investigation approfondie d'épidémies, l'étude de la pathogénicité d'une souche bactérienne, ainsi que la détection des facteurs de virulence (virulome) ou des gènes codant pour la résistance aux antibiotiques (résistome).^{4,5} Les approches NTS permettent d'analyser de manière exhaustive le micro-organisme en question et permettra, dans le futur, de fournir ces résultats aussi rapidement que les méthodes conventionnelles.

Développement d'outils de diagnostic moléculaire

L'expansion des NTS a permis le développement d'outils de prévention et de diagnostic des infections bactériennes, dont des PCR sensibles et spécifiques.⁶⁻⁸ Ainsi, Yang et coll. ont développé une PCR large spectre basée sur la com-

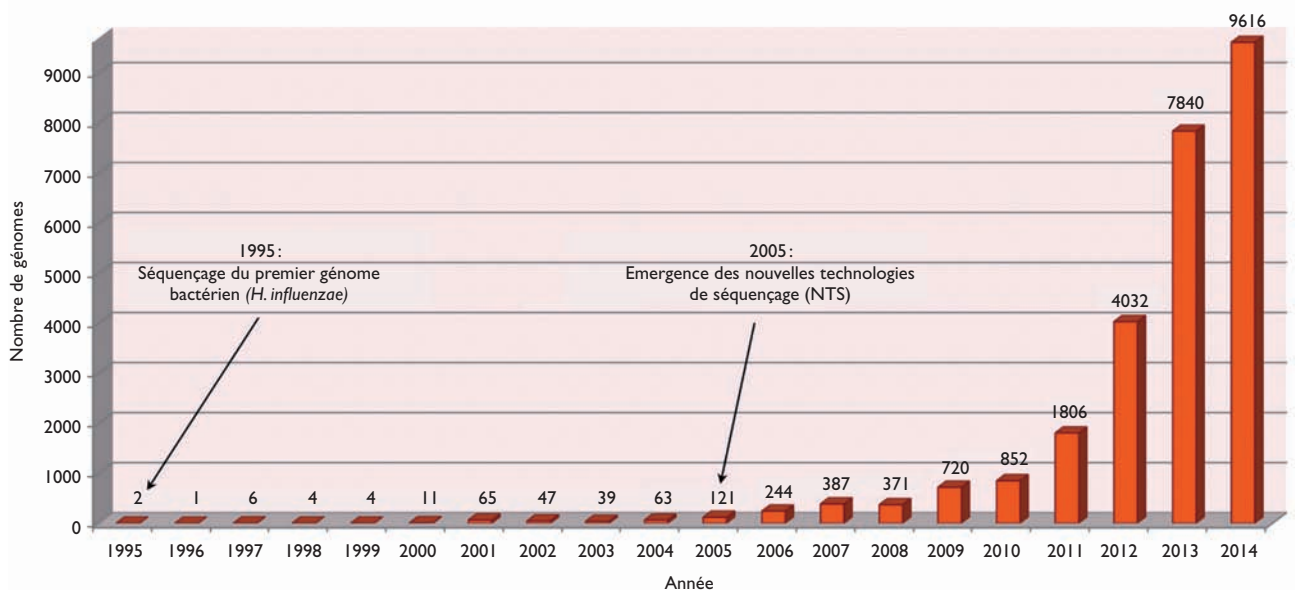


Figure 1. Nombre de génomes bactériens séquencés par année

Ces informations ont été collectées dans la base de données du National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse): un total de 26 231 génomes ont été séquencés jusqu'au 9 juillet 2014.

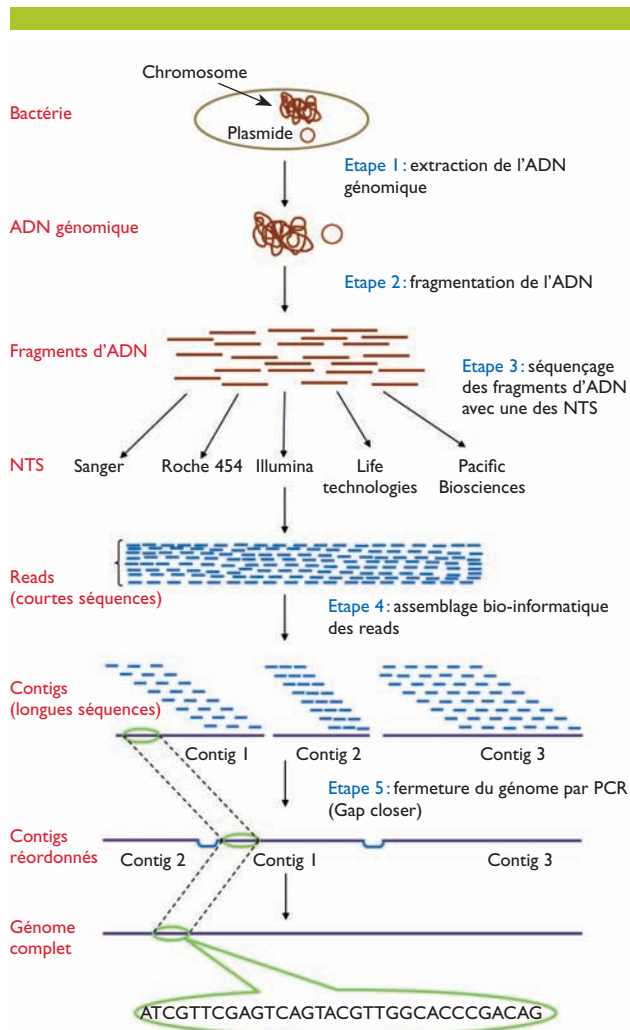


Figure 2. Les différentes étapes du séquençage d'un génome bactérien

NTS: nouvelles technologies de séquençage.

paraison génomique de 27 souches d'*Acinetobacter baumannii* afin d'améliorer la surveillance de souches pathogènes clonales et émergentes de cette espèce bactérienne.⁶ Récemment, nous avons identifié une souche de méningocoque (*Neisseria meningitidis*) polymorphique non détectable par la PCR diagnostique utilisée au CHUV.⁹ La comparaison des gènes de cette souche avec ceux de 183 autres souches de *N. meningitidis* disponibles a permis d'identifier onze gènes cibles et de développer des PCR diagnostiques spécifiques de l'espèce *N. meningitidis*.¹⁰

L'utilité d'une analyse génomique rapide a également été démontrée lors de récentes épidémies.^{8,11,12} Ainsi, lors de l'épidémie d'*E. coli* entérohémorragique O104: H4, la génomique a permis d'identifier en quelques jours des régions du génome uniques à cette souche qui ont pu être ciblées par une PCR diagnostique spécifique.¹¹ Un autre exemple est la souche suédoise de *Chlamydia trachomatis* qui échappait à la plupart des PCR commerciales. Le séquençage de son génome a mis en évidence une délétion de 377-bp au niveau du plasmide cryptique, une région précisément ciblée par les PCR utilisées jusqu'alors.¹²

Développement d'outils de sérologie

La séquence génomique permet également de dériver un catalogue de protéines codées par la bactérie (protéome). Ce catalogue théorique, couplé à une analyse des protéines immunogéniques par spectrométrie de masse, permet le développement d'outils sérologiques.^{13,14} Récemment, Kebbi et coll. ont appliqué une approche combinée de génomique et de protéomique sur *Waddlia chondrophila*, une bactérie intracellulaire apparentée aux *Chlamydia*, qui est associée à la fausse couche chez les humains et à l'avortement chez les ruminants.^{13,15} Cette étude a permis d'identifier des protéines immunogéniques et de proposer un nouveau test sérologique pour diagnostiquer ce pathogène émergent.¹³

Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques représente aujourd'hui un problème mondial de santé publique. En effet, les bactéries multirésistantes aux antibiotiques (BMR) sont de plus en plus répandues.^{16,17} En 2007, 400 000 infections ont été causées par des BMR en Europe avec pour conséquence 25 000 décès dus au manque d'antibiotiques efficaces.¹⁷

Dans ce contexte, les NTS représentent un moyen indispensable pour comprendre les différents mécanismes de résistance, leur base génétique et leur dissémination intercontinentale. L'étude des génomes de pathogènes multirésistants a ainsi permis de mieux décrire les principaux modes de transmission des déterminants de la résistance par l'échange d'éléments génétiques mobiles, notamment chez des isolats cliniques d'*Enterobacteriaceae*, d'*A. baumannii* et de *Pseudomonas aeruginosa*.^{16,18} Ces éléments génétiques mobiles, codant parfois pour de multiples gènes de résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds, permettent à ces BMR de persister dans les milieux hospitaliers et de résister à presque tous les antibiotiques communément prescrits.¹⁷

Le séquençage et l'analyse des génomes de ces bactéries ont permis d'identifier et de développer les outils moléculaires de surveillance pour les principaux gènes de résistance préoccupants tels que ceux codant pour des bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE, comme par exemple TEM-24), des carbapénémases (comme KPC, VIM, NDM, OXA-23, OXA-24), présents chez les bacilles Gram négatif, ainsi que le gène *mecA* codant pour la résistance à la méticilline chez les staphylocoques.¹⁹⁻²¹ De plus, l'augmentation des séquences génomiques disponibles a favorisé la création de bases de données librement accessibles sur internet, permettant ainsi une identification rapide des gènes de résistance répertoriés lors du séquençage d'un pathogène.²²⁻²⁵ L'identification rapide de ces facteurs de résistance permet la prévention d'épidémie par la limitation d'une propagation massive de ces gènes, la prescription d'un traitement plus approprié, et la limitation des coûts de traitement et d'hospitalisation.

Epidémiologie et dissémination de bactéries multirésistantes

Les structures hospitalières sont souvent confrontées à des épidémies bactériennes causées par des pathogènes nosocomiaux tels que les *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), les BMR composées principalement



Tableau 2. Exemples d'applications cliniques à travers l'utilisation des nouvelles technologies de séquençages (NTS)

Applications cliniques	Micro-organismes cibles	Commentaires	Références
Développement d'outils moléculaires			
PCR	<i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Legionella pneumophila</i>	Détection et identification spécifique d'espèce bactérienne	6,7,10
Génotypage moléculaire (PCR)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Identification de clones multirésistant aux antibiotiques	8
Développement d'outils de sérologie			
ELISA	<i>Waddlia chondrophila</i>	Nouveau test diagnostique de détection d'anticorps dirigés contre cette bactérie potentiellement pathogène pour les êtres humains	13
Epidémiologie			
Comparaisons génomiques	<i>Chlamydia trachomatis</i>	Identification d'un nouveau variant non détectable par les PCR conventionnelles	12
	<i>Neisseria meningitidis</i>	Identification de changement génomique induisant une virulence sévère d'une souche clonale	31
	<i>Escherichia coli</i>	Caractérisation du 1 ^{er} génome bactérien séquencé en temps réel au cours d'une épidémie	11
Taxonomie bactérienne (taxogénomique)			
Taxonomie des bactéries	<i>Chlamydiales</i>	Méthode de classification taxonomique des bactéries appartenant à l'ordre des <i>Chlamydiales</i>	56
	<i>Bacteria</i>	Proposition d'usage des génomes pour la description taxonomique de nouvelles espèces bactériennes	57
	<i>Enterobacteriaceae</i>	Reclassification taxonomique de l'espèce <i>Enterobacter aerogenes</i> dans le genre <i>Klebsiella</i>	58
Investigation de la résistance aux antibiotiques			
Bactéries multirésistantes	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Identification d'éléments génétiques mobiles porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques	16,59,60
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Identification des déterminants de la résistance des souches cliniques de cette espèce	16,61
	<i>Enterobacteriaceae</i>	Revue sur l'usage des NTS pour investiguer la résistance aux antibiotiques chez les bactéries Gram négatif multirésistantes	16
Identification de facteurs de virulence			
Syndrome du choc toxique (SSTS)	<i>Staphylococcus aureus</i>	Recherche de la toxine du SST-1 causant une forte desquamation et un tableau de sepsis chez un patient	62
	<i>Streptococcus dysgalactiae equisimilis</i>	Etude de comparaison des facteurs de virulence chez le genre streptocoque causant le STSS	63
Syndrome de Lemierre	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	Investigation des facteurs de virulence associés à des infections sévères	64

des entérobactéries (*Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, etc.), et des bacilles non fermentatifs tels qu'*A. baumannii* et *P. aeruginosa*.²⁶⁻³⁰ Plusieurs études rapportent l'utilisation des NTS comme outils d'investigation pour comprendre la dissémination de souches à l'échelle d'un hôpital, d'une région, ou même d'un continent.³¹⁻³⁴

En 2012, Vogel et coll. ont rapporté l'usage des NTS pour étudier et comprendre la persistance et la diffusion d'une souche clonale de *S. aureus* ST228 au CHUV sur une période de dix ans.³⁵ Le séquençage et la comparaison génomique de huit souches de *S. aureus* isolées entre 2001 et 2008 ont mis en évidence des changements génétiques tels que l'acquisition d'un plasmide, la perte d'un large fragment génomique et des insertions de transposases. En 2013, Lavezzo et coll. ont étudié une épidémie de *N. meningitidis* caractérisée par un taux de mortalité élevé dans le nord-est

de l'Italie. Alors que l'investigation de cette épidémie avec les méthodes conventionnelles telles que le typage moléculaire (MLST), l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) et les tests sérologiques concluaient à la diffusion d'un même clone de *N. meningitidis* ST-11, le séquençage et la comparaison génomique de certaines souches ont mis en évidence des différences génomiques et des acquisitions de gènes ayant significativement contribué à la pathogénicité de ces souches.³¹

MÉTAGÉNOMIQUE BACTÉRIENNE

Le terme «métagénomique» a été utilisé pour la première fois par Handelsman et coll. en 1998.³⁶ Toutefois, ce n'est que grâce aux progrès amenés par les NTS qu'il est à présent possible d'étudier la diversité microbienne de n'im-

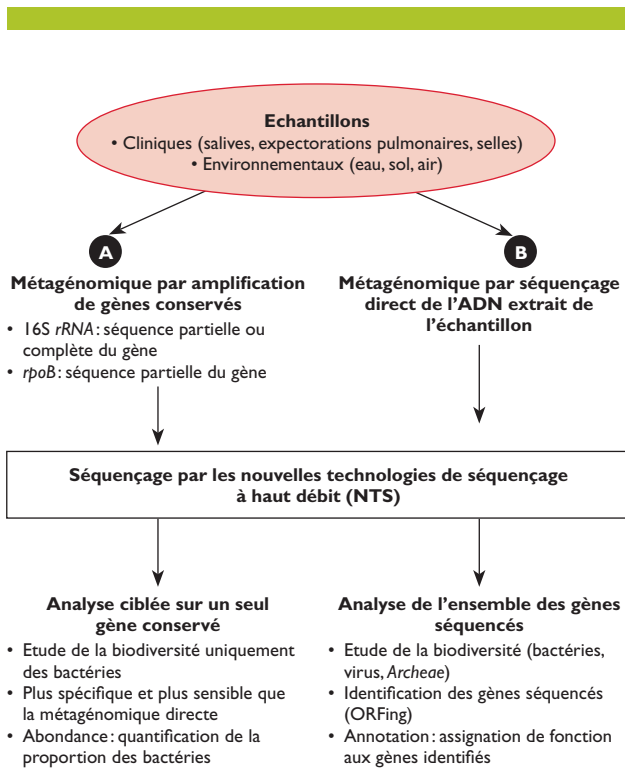


Figure 3. Les différentes étapes et applications de la métagénomique

16S *rRNA*: ARN ribosomique 16S.

porte quel échantillon. Cette approche permet aussi de quantifier la proportion relative de chaque microbe à un temps et dans une condition donnée.^{36,37}

Deux approches sont principalement utilisées (figure 3). La première approche, plus ciblée et plus utilisée, est basée sur l'amplification par PCR de la séquence complète ou partielle de l'ARN ribosomique 16S (16S *rRNA*) d'un échantillon (figure 3A).³⁷⁻³⁹ La deuxième approche est basée sur l'extraction de l'ADN total d'un échantillon directement suivi de son séquençage (figure 3B). Cette approche directe permet de mettre en évidence le contenu en gènes d'une population microbienne et de déterminer ainsi leurs capacités. Cette approche demande plus de ressources de séquençage et est donc moins sensible que la précédente pour étudier la biodiversité.^{37,38} Il est toutefois probable que cette approche devienne la méthode de choix, en raison des multiples informations de fonctions géniques qu'elle seule peut apporter.

Métagénomique via des gènes conservés: 16S *rRNA*

Les NTS ont permis d'explorer la diversité des micro-organismes du sol,^{39,40} de l'eau^{41,42} et de l'air.⁴³ De la même manière, les microbiotes de la salive, des expectorations, des selles et des prélèvements vaginaux ont fait l'objet de nombreuses études⁴⁴⁻⁴⁶ qui ont permis de documenter l'impact du microbiome sur la santé des patients.⁴⁷⁻⁴⁹ Les approches métagénomiques ont mis en évidence notre manque de connaissance de la diversité microbienne colonisant

l'homme et le potentiel d'étude – et d'intervention – sur ce microbiote.

Lazarevic et coll. ont notamment décrit le microbiote oral de personnes saines et malades, un milieu pouvant renfermer jusqu'à 700 espèces bactériennes différentes dont la moitié sont non cultivables.⁵⁰⁻⁵² Dans ces études, comme dans d'autres, la diversité microbienne se composait principalement de bactéries appartenant aux phyla suivants, par ordre d'importance: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes*, et «TM7».

L'une de ces études a investigué l'impact du traitement antibiotique sur le microbiote salivaire dans des cas d'otite moyenne aiguë chez l'enfant.⁵² L'utilisation d'antibiotiques tels que l'amoxicilline comme traitement conduit à une réduction de la flore salivaire bénéfique pour l'enfant et, à l'inverse, favorise l'émergence d'agents pathogènes colonisant le nasopharynx tels que le *S. aureus*.⁵³

Métagénomique directe sur échantillon

Hauser et coll. se sont penchés sur la biodiversité microbienne des expectorations pulmonaires de patients atteints de mucoviscidose.⁵⁴ Les principaux micro-organismes colonisateurs des poumons dans ce contexte sont les *S. aureus*, *Haemophilus influenzae*, *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* et *Aspergillus fumigatus*. D'autres bactéries appartenant aux genres *Streptococcus*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Gemella*, *Moraxella* et *Granulicatella* ont également été identifiées.⁵⁴

Cette approche a également été utilisée pour étudier le microbiote de coprolithes (crottes fossiles) datant du Moyen Age (plus de 600 ans). Cette étude a apporté des connaissances du microbiote intestinal d'un habitant de l'époque médiévale, comportant des parasites intestinaux typiques tels que les *Trichuris* et les *Ascaris*, mais également des bactéries pathogènes telles que *Bartonella* et *Bordetella*.⁵⁵

CONCLUSIONS

Les NTS ont de nombreuses applications et la génomique remplace progressivement d'autres techniques de typage tels que le typage moléculaire (MLST) ou l'électrophorèse à champ pulsé (PFGE). Il est probable que, dans un futur proche, le génome de toute bactérie causant une infection sévère sera séquencé, permettant une prise en charge individualisée.⁶⁵ De plus, la métagénomique va à terme permettre d'améliorer le traitement de maladies associées à une perturbation de certains microbiotes comme l'obésité ou l'asthme. ■

Les auteurs n'ont déclaré aucun conflit d'intérêts en relation avec cet article.



Implications pratiques

- > L'expansion des nouvelles technologies de séquençage (NTS) permet d'améliorer les outils de diagnostic disponibles (PCR et sérologie), un point essentiel et crucial dans la prise en charge des patients
- > Aujourd'hui, seule la génomique permet l'identification exhaustive et rapide des facteurs de virulence et/ou des déterminants de la résistance aux antibiotiques d'une souche pathogène. Une telle connaissance permet aux médecins de prescrire aux patients des traitements plus adéquats et plus personnalisés afin de réduire au maximum les coûts et les durées d'hospitalisation
- > La métagénomique apporte une meilleure compréhension de la biodiversité bactérienne des microbiotes humains, du rôle de ces microbes et de leur impact sur l'état de santé des patients (obésité par exemple)

Adresses

Drs Seydina M. Diene et Claire Bertelli
Trestan Pillonel
Pr Gilbert Greub
Institut de microbiologie
CHUV, Université de Lausanne
1011 Lausanne
gilbert.greub@chuv.ch

SIB Institut suisse de bioinformatique (SMD, CB, TP)
Quartier Sorge, Bâtiment Génopole
1015 Lausanne

Pr Jacques Schrenzel
Laboratoire de recherche génomique
Service des maladies infectieuses
HUG, 1211 Genève 14

Bibliographie

- 1 Sanger F, Air GM, Barrell BG, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 1977;265:687-95.
- 2 Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, et al. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol* 2012;30:434-9.
- 3 Ferrer M, Martínez-Abarca F, Golyshin PN. Mining genomes and metagenomes for novel catalysts. *Curr Opin Biotechnol* 2005;16:588-93.
- 4 McAdam PR, Richardson EJ, Fitzgerald JR. High-throughput sequencing for the study of bacterial pathogen biology. *Curr Opin Microbiol* 2014;19C:106-13.
- 5 Greub G. Genomics of medical importance. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:781-3.
- 6 Yang JY, Brooks S, Meyer JA, et al. Pan-PCR, a computational method for designing bacterium-typing assays based on whole-genome sequence data. *J Clin Microbiol* 2013;51:752-8.
- 7 Portenko SA, Osina NA, Bugorkova TV, Kutryev VV. New approaches to detection of legionellosis causative agents in clinical samples and environment objects by PCR. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2013; 94-9.
- 8 López-Camacho E, Rentero Z, Ruiz-Carrascoso G, et al. Design of clone-specific probes from genome sequences for rapid PCR-typing of outbreak pathogens. *Clin Microbiol Infect* 2014; epub ahead of print.
- 9 * Jaton K, Ninet B, Bille J, Greub G. False-negative PCR result due to gene polymorphism: The example of *Neisseria meningitidis* false. *J Clin Microbiol* 2010;48: 4590-2.
- 10 Diene SM, Bertelli C, Pillonel T, et al. Genome analysis of a clinical isolate of *Neisseria meningitidis* Serogroup B: New targets for molecular diagnostics. 72nd Annual Assembly of Swiss Society for Microbiology (SSM), 2014.
- 11 * Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, et al. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS One* 2011;6:e22751.
- 12 * Unemo M, Seth-Smith HMB, Cutcliffe LT, et al. The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis*: Genome sequence, morphology, cell tropism and phenotypic characterization. *Microbiology* 2010;156:1394-404.
- 13 Kebbi-Beghdadi C, Lienard J, Uytendaele F, et al. Identification of immunogenic proteins of *Waddlia chondrophila*. *PLoS One* 2012;7:e28605.
- 14 Bonhomme CJ, Renesto P, Nandi S, Lynn AM, Raoult D. Serological microarray for a paradoxical diagnostic of Whipple's disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008;27:959-68.
- 15 Baud D, Goy G, Osterheld MC, et al. *Waddlia chondrophila*: From bovine abortion to human miscarriage. *Clin Infect Dis* 2011;52:1469-71.
- 16 * Diene SM, Rolain JM. Investigation of antibiotic resistance in the genomic era of multidrug-resistant Gram-negative bacilli, especially Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013;11:277-96.
- 17 ** Bush K, Courvalin P, Dantas G, et al. Tackling antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 2011;9:894-6.
- 18 Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, et al. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet* 2006;2:e7.
- 19 Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:490-5.
- 20 Diene SM, Bruder N, Raoult D, Rolain JM. Real-time PCR assay allows detection of the New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1)-encoding gene in France. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37:544-6.
- 21 Francois P, Pittet D, Bento M, et al. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from sterile or nonsterile clinical samples by a new molecular assay. *J Clin Microbiol* 2003;41:254-60.
- 22 Scaria J, Chandramouli U, Verma SK. Antibiotic Resistance Genes Online (ARGO): A database on vancomycin and beta-lactam resistance genes. *Bioinformatics* 2005;1:5-7.
- 23 Liu B, Pop M. ARDB - Antibiotic resistance genes database. *Nucleic Acids Res* 2009;37:D443-7.
- 24 Zankari E, Hasman H, Cosentino S, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:2640-4.
- 25 Gupta SK, Padmanabhan BR, Diene SM, et al. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:212-20.
- 26 Lee H, Kim ES, Choi C, et al. Outbreak among healthy newborns due to a new variant of USA300-related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect* 2014;87:145-51.
- 27 Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:5046-54.
- 28 Wendel AF, Brodner AHB, Wydra S, et al. Genetic characterization and emergence of the metallo-beta-lactamase GIM-1 in *Pseudomonas* spp. and Enterobacteriaceae during a long-term outbreak. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:5162-5.
- 29 Dettori M, Piana A, Deriu MG, et al. Outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit. *New Microbiol* 2014;37:185-91.
- 30 Witney AA, Gould KA, Pope CF, et al. Genome sequencing and characterization of an extensively drug-resistant sequence type 111 serotype O12 hospital outbreak strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* 2014; epub ahead of print.
- 31 Lavezzo E, Toppo S, Franchin E, et al. Genomic comparative analysis and gene function prediction in infectious diseases: Application to the investigation of a meningitis outbreak. *BMC Infect Dis* 2013;13:554.
- 32 * Köser CU, Fraser LJ, Ioannou A, et al. Rapid single-colony whole-genome sequencing of bacterial pathogens. *J Antimicrob Chemother* 2013;69:1275-81.
- 33 Schürch AC, Siezen RJ. Genomic tracing of epidemics and disease outbreaks. *Microb Biotechnol* 2010; 3:628-33.
- 34 Rasko DA, Webster DR, Sahl JW, et al. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. *N Engl J Med* 2011;365:709-17.
- 35 Vogel V, Falquet L, Calderon-Copete SP, Basset P, Blanc DS. Short term evolution of a highly transmissible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone (ST228) in a tertiary care hospital. *PLoS One* 2012;7: e38969.
- 36 Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. *Chem Biol* 1998;5:R245-9.
- 37 Handelsman J. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68:669-85.
- 38 Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, Gibbs RA, Versalovic J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clin Chem* 2009;55:856-66.
- 39 Akbari VG, Pandya RD, Singh SP. Extraction of the metagenomic DNA and assessment of the bacterial diversity from the petroleum-polluted sites. *Environ Monit Assess* 2014;186:6351-62.



- 40 Luo C, Rodriguez-R LM, Johnston ER, et al. Soil microbial community responses to a decade of warming as revealed by comparative metagenomics. *Appl Environ Microbiol* 2014;80:1777-86.
- 41 Yang Y, Li B, Zou S, Fang HHP, Zhang T. Fate of antibiotic resistance genes in sewage treatment plant revealed by metagenomic approach. *Water Res* 2014; 62C:97-106.
- 42 Hawley ER, Schackwitz W, Hess M. Metagenomic sequencing of two salton sea microbiomes. *Genome Announc* 2014;23:2pii:e01208-132.
- 43 Whon TW, Kim MS, Roh SW, et al. Metagenomic characterization of airborne viral DNA diversity in the near-surface atmosphere. *J Virol* 2012;86:8221-31.
- 44 * Cox MJ, Cookson WO, Moffatt MF. Sequencing the human microbiome in health and disease. *Hum Mol Genet* 2013;22:R88-94.
- 45 Willner D, Furlan M, Haynes M, et al. Metagenomic analysis of respiratory tract DNA viral communities in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis individuals. *PLoS One* 2009;4:e7370.
- 46 * Andersson P, Klein M, Lilliebridge RA, Giffard PM. Sequences of multiple bacterial genomes and a *Chlamydia trachomatis* genotype from direct sequencing of DNA derived from a vaginal swab diagnostic specimen. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:E405-8.
- 47 Montassier E, Batard E, Massart S, et al. 16S rRNA gene pyrosequencing reveals shift in patient faecal microbiota during high-dose chemotherapy as conditioning regimen for bone marrow transplantation. *Microb Ecol* 2014;67:690-9.
- 48 Taur Y, Pamer EG. The intestinal microbiota and susceptibility to infection in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis* 2013;26:332-7.
- 49 Uitto VJ, Nylund K, Pussinen P. The association of oral microbiota and general health. *Duodecim* 2012; 128:1232-7.
- 50 Lazarevic V, Whiteson K, Huse S, et al. Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing. *J Microbiol Methods* 2009;79:266-71.
- 51 Lazarevic V, Whiteson K, Hernandez D, François P, Schrenzel J. Study of inter- and intra-individual variations in the salivary microbiota. *BMC Genomics* 2010; 11:523.
- 52 * Lazarevic V, Manzano S, Gaia N, et al. Effects of amoxicillin treatment on the salivary microbiota in children with acute otitis media. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:E335-42.
- 53 Brook I, Gober AE. The effects of treatment of acute otitis media with a low dose vs a high dose of amoxicillin on the nasopharyngeal flora. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2009;135:458-61.
- 54 Hauser PM, Bernard T, Greub G, et al. Microbiota present in cystic fibrosis lungs as revealed by whole genome sequencing. *PLoS One* 2014;9:e90934.
- 55 Appelt S, Armougoum F, Le Bailly M, Robert C, Drancourt M. Polyphasic analysis of a middle ages coprolite microbiota, Belgium. *PLoS One* 2014;9:e88376.
- 56 Pillonel T, Bertelli C, Salamin N, Greub G. Taxogenomics of the chlamydiales. 71st annual assembly of Swiss Society for Microbiology (SSM), 2013.
- 57 Ramasamy D, Mishra AK, Lagier JC, et al. A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014;64:384-91.
- 58 Diene SM, Merhej V, Henry M, et al. The rhizome of the multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* genome reveals how new «killer bugs» are created because of a sympatric lifestyle. *Mol Biol Evol* 2013;30: 369-83.
- 59 Fournier P, Vallenet D, Barbe V, et al. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. 2006;2:e7 2.
- 60 Rolain JM, Diene SM, Kempf M, et al. Real-time sequencing to decipher the molecular mechanism of resistance of a clinical pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate from Marseille, France. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:592-6.
- 61 Miyoshi-Akiyama T, Kuwahara T, Tada T, Kitao T, Kirikae T. Complete genome sequence of highly multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* NCGM2.S1, a representative strain of a cluster endemic to Japan. *J Bacteriol* 2011;193:7010.
- 62 Pillonel T, Bertelli C, Diene SM, Schrenzel J, Greub G. Clinical applications of high-throughput sequencing: Draft genome of a community-acquired *Staphylococcus aureus* causing lethal septic shock in absence of toxic shock syndrome toxin. 72nd annual assembly of Swiss Society for Microbiology (SSM), 2014.
- 63 Shimomura Y, Okumura K, Murayama SY, et al. Complete genome sequencing and analysis of a Lancefield group G *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* strain causing streptococcal toxic shock syndrome (STSS). *BMC Genomics* 2011;12:17.
- 64 Bertelli C, Gardiol C, Andrey D, et al. Rapid bacterial genomics in clinical diagnostic: Virulence factors of *Fusobacterium necrophorum* associated with Lemierre's syndrome and bacteremia. 72nd annual assembly of Swiss Society for Microbiology (SSM), 2014.
- 65 * Bertelli C, Greub G. Rapid bacterial genome sequencing: Methods and applications in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:803-13.

* à lire

** à lire absolument