

**NOUVELLE**

**Culturomics : une méthode d'étude du microbiote humain**

Jean-Christophe Lagier<sup>1</sup>, Didier Raoult<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Aix-Marseille Université, URMITE, IHU Méditerranée-Infection, UM63, CNRS 7278, IRD 198, Inserm U1095, Campus International UCAD-IRD, BP 1386, CP 18524, Dakar, Sénégal ;

<sup>2</sup>Aix-Marseille Université URMITE, IHU Méditerranée-Infection, UM63, CNRS 7278, IRD 198, Inserm 1095, 27, boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 5, France.

[didier.raoult@gmail.com](mailto:didier.raoult@gmail.com)

[jclagier@yahoo.fr](mailto:jclagier@yahoo.fr)

> La culture microbienne a été dans l'histoire de la microbiologie la première technique permettant d'avoir une compréhension des microbes et des maladies qu'ils causaient [1]. Étant une technique longue, fastidieuse et coûteuse, les microbiologistes l'ont progressivement abandonnée à la suite de l'avènement des méthodes moléculaires, à la fin du xx<sup>e</sup> siècle [1]. La métagénomique appliquée pour la première fois en 2005 au microbiote digestif humain, qui promettait de découvrir l'incultivable, a été par la suite la seule et unique méthode utilisée par les chercheurs pour explorer les écosystèmes complexes, en particulier les microbiotes humains [2]. Cependant, cette technique est associée à de nombreux biais, comme celui dû à l'extraction ou celui résultant du choix des amorces (utilisées pour l'amplification des séquences nucléotidiques), expliquant que les résultats ne soient que rarement reproductibles entre différents laboratoires et que des données contradictoires soient parfois générées au sein d'un même laboratoire [2, 13] (→). Le biais de profondeur<sup>1</sup> est probablement une des plus grandes limites

(→) Voir la Synthèse de J. Weissenbach et A. Sghir, page 937 de ce numéro

actuelles de la métagénomique qui est incapable de détecter les espèces présentes à des concentrations inférieures à 10<sup>5</sup> ou 10<sup>6</sup> bactéries par gramme de selles [2, 3]. Plusieurs bactéries pathogènes pour l'homme, telles que *Sal-*

*monella typhi*, *Yersinia enterocolitica* ou *Tropheryma whippelii* sont pourtant responsables de pathologies humaines graves alors qu'elles sont présentes à de plus faibles concentrations dans les selles humaines [2]. Ainsi, malgré les progrès considérables que la métagénomique a permis pour étendre la définition du répertoire, une grande partie de ce dernier, dénommée usuellement la « dark matter » et qui correspond à un nombre incalculable de séquences nucléotidiques n'étant assignées à aucun microorganisme connu, résiste à cette avancée technologique et demeure totalement inconnue [4].

Jusqu'à présent, environ 13 000 espèces bactériennes ont été cultivées, incluant environ 2 200 espèces isolées à partir de prélèvements humains [5]. Depuis quelques années, la culture microbienne a en effet connu un renouveau important, en premier lieu grâce aux microbiologistes de l'environnement qui ont développé des techniques mimant la composition du milieu naturel des bactéries qu'ils cherchaient à isoler, facilitant ainsi leur croissance [2]. Ainsi, en utilisant des chambres de diffusion, Kaeberlein *et al.* ont montré que ce dispositif permettait d'isoler plus de 300 fois plus de colonies qu'en ensemençant directement les prélèvements sur gélose [6]. Ces 5 dernières années, la culture microbienne en microbiologie humaine a connu un essor considérable grâce à l'avènement et à la généralisation d'une méthode d'identification rapide et peu coûteuse par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption ionisation/time of flight*) qui

permet, notamment, de détecter des espèces bactériennes pathogènes rares [7]. Cette technique qui est devenue la technique de référence d'identification bactérienne dans les laboratoires de microbiologie clinique, a permis également de développer un nouveau concept d'étude des microbiotes humains appelé « microbial culturomics » [2, 3]. Cette technique est fondée sur la multiplication des conditions de culture, en utilisant d'une part des conditions permettant de faciliter la croissance des espèces fastidieuses et, d'autre part, d'utiliser des inhibiteurs de croissance des espèces majoritaires, ce qui permet de sélectionner les espèces minoritaires afin de les identifier (Figure 1) [3]. Dans un travail préliminaire, cette approche a permis, grâce à l'utilisation de 212 conditions de culture différentes, et en analysant 31 500 colonies par MALDI-TOF, de cultiver 340 espèces bactériennes dont 31 nouvelles espèces ainsi que des espèces appartenant à des phylums rares (*Synergistetes* et *Deinococcus-Thermus*) [3]. En particulier, l'utilisation d'une pré-incubation des selles dans des flacons d'hémoculture ainsi que l'ajout de jus de rumen de mouton (un des compartiments de l'estomac des ruminants) stérilisé, afin de mimer le milieu naturel des bactéries du tube digestif, pour la plupart anaérobies, ont été deux des clés majeures permettant d'obtenir ces résultats [3]. La complémentarité de la *culturomics* avec la métagénomique a également été démontrée puisque seules 15 % des espèces analysées de façon concomitante par pyroséquençage ont été détectées avec les deux techniques

<sup>1</sup> En fonction du seuil de détection, des bactéries peuvent passer inaperçues alors qu'elles sont à l'origine de pathologies, malgré leur faible représentation.



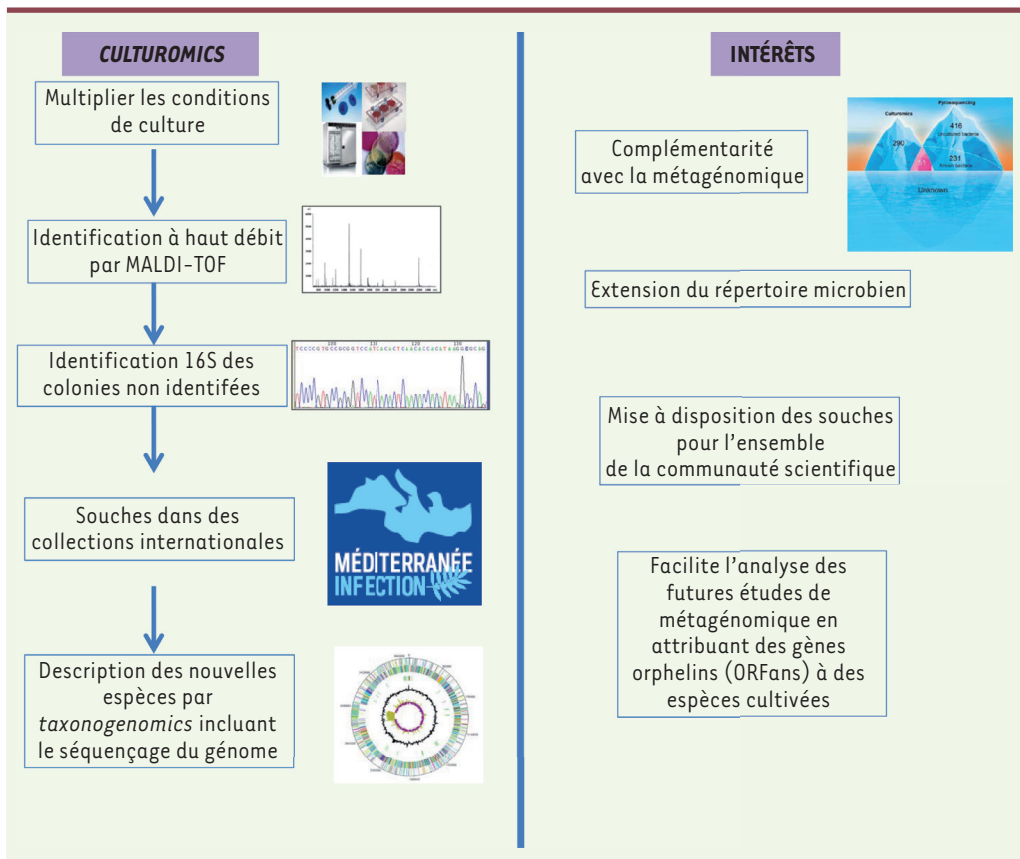


Figure 1. Schéma explicatif de la culturomics et de son intérêt. MALDI-TOF : matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight.

obsolète l'hybridation ADN-ADN jusqu'alors *gold standard* pour décrire une nouvelle espèce (alors qu'il s'agit d'une méthode non reproductible entre laboratoires et non adaptée à de nombreuses espèces bactériennes [8]), le fait de séquencer chacun des génomes et de les déposer dans des banques de dépôt internationales (Genbank, EMBL [european molecular biology laboratory]), ce

[3]. Une analyse détaillée a permis de sélectionner successivement les 70 puis les 18 conditions de culture les plus appropriées pour explorer la plus grande diversité possible tout en réduisant la charge de travail nécessaire pour analyser chaque échantillon. D'autres travaux réalisés par notre équipe ont permis par la suite de cultiver plus de 50 % des espèces connues du tube digestif humain incluant 247 nouvelles espèces [2, 9]. Cette augmentation du nombre d'espèces bactériennes a conduit à devoir créer de nouvelles méthodes de description des espèces bactériennes découvertes. La *taxonogenomics*<sup>2</sup> implique ainsi que chaque nouvelle espèce voie son génome séquencé et comparé aux génomes des espèces les plus proches et que son spectre MALDI-TOF soit ajouté à sa description [8]. Le processus de description puis de publication étant relativement long, nous avons proposé récemment

de créer des « *new species announcements* » de façon à ce que l'ensemble de la communauté scientifique puisse être informé en temps réel, dès l'isolement de la nouvelle espèce, afin d'en disposer le plus rapidement possible. Ces publications de description courtes incluent le numéro d'identification de l'amplification et du séquençage du gène 16S de ces nouvelles bactéries (numéro Genbank), le numéro de dépôt dans la collection de souches de l'unité des Rickettsies (CSUR)<sup>3</sup> de façon à pouvoir être commandées rapidement, et quelques caractéristiques phénotypiques de base. La *taxonogenomics* a été reconnue. Quinze nouvelles espèces, décrites selon cette méthode, ont en effet été validées officiellement par le comité de taxonomie international de l'*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [8]. Outre le fait de rendre

qui les rend disponibles à l'ensemble des chercheurs, permet ainsi d'attribuer à des espèces, des gènes qui étaient jusqu'alors orphelins (ORFans) et ainsi de faciliter l'interprétation des futures études de métagénomique. L'ensemble de ces nouvelles espèces sont disponibles dans des collections de souches internationales (CSUR et DSMZ [*deutsche sammlung von mikroorganismen und zellkulturen*]) accessibles à l'ensemble de la communauté scientifique, chacun pouvant les utiliser afin de rechercher un éventuel lien de causalité avec diverses pathologies.

Outre l'effort d'extension du répertoire (doublement du nombre d'espèces cultivées connues) qui permet de combler en partie la « *dark matter* » [9], la culture pure des bactéries demeure indispensable afin d'étudier leur virulence, leur sensibilité aux antibiotiques, ou pour développer des modèles expérimentaux [1]. Un lien entre des souches toxiques<sup>4</sup>

<sup>2</sup> Incluant des données phénotypiques et le séquençage du génome.

<sup>3</sup> Une collection mise à disposition au niveau mondial. <http://www.mediterranee-infection.com/article.php?laref=14&titre=collection-de-souches&PHPSESSID=9fcdelb4k5880muqm-nmagg4pj6>

<sup>4</sup> À effet toxique.



de *Clostridium butyricum* et l'entérocolite ulcéro-nécrosante, touchant les enfants prématurés, a ainsi pu être démontré récemment par Cassir *et al.* [10]. C'est en effet grâce à la *culturomics* appliquée à leurs échantillons que ces auteurs ont mis en évidence une plus grande fréquence de cette bactérie chez les enfants atteints, par rapport aux témoins, et ont pu tester les toxines produites par les souches isolées [10]. De même, Zitvogel *et al.* ont récemment démontré le caractère immunomodulateur du microbiote digestif au cours de la réponse aux thérapies anticancéreuses [11, 12] (→). Seul le fait de disposer de souches pures a permis à ces auteurs de tester une hypothèse qui n'aurait pu être vérifiée par la métagénomique seule. Le concept de *culturomics*, appliqué aux microbiotes urinaire, vaginal ou cutané, permet des études similaires et l'obtention de résultats significatifs (résultats

(→) Voir la Synthèse de M. Vétizou *et al.*, page 974 de ce numéro

non publiés). La *culturomics* constitue donc un formidable effort pour la constitution du répertoire des bactéries isolées chez l'homme. Elle devrait donc permettre à des générations de chercheurs de disposer de souches pures leur permettant d'appréhender les relations existant entre bactéries composant le microbiote humain et santé humaine. ♦  
**Culturomics: a method to study human gut microbiota**

#### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

1. Lagier JC, Edouard S, Pagnier I, *et al.* Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* 2015 ; 28 : 208-36.
2. Lagier JC, Hugon P, Khelaifia S, *et al.* The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clin Microbiol Rev* 2015 ; 28 : 237-64.
3. Lagier JC, Armougom F, Million M, *et al.* Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin Microbiol Infect* 2012 ; 18 : 1185-93.

4. Rinke C, Schwientek P, Sczyrba A, *et al.* Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature* 2013 ; 499 : 431-7.
5. Hugon P, Dufour JC, Colson P, *et al.* A comprehensive repertoire of prokaryotic species identified in human beings. *Lancet Infect Dis* 2015 ; 15 : 1211-9.
6. Kaeberlein T, Lewis K, Epstein SS. Isolating uncultivable microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* 2002 ; 296 : 1127-9.
7. Seng P, Abat C, Rolain JM, *et al.* Identification of rare pathogenic bacteria in a clinical microbiology laboratory: impact of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2013 ; 51 : 2182-94.
8. 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.
9. Lagier JC, Khelaifia S, Tidjani Alou M, *et al.* Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics. *Nat Microbiol* 2016 ; 1 : 16203.
10. Cassir N, Benamar S, Khalil JB, *et al.* *Clostridium butyricum* strains and dysbiosis linked to necrotizing enterocolitis in preterm neonates. *Clin Infect Dis* 2015 ; 61 : 1107-15.
11. Vétizou M, Pitt JM, Daillere R, *et al.* Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science* 2015 ; 350 : 1079-84.
12. Vétizou M, Daillère R, Zitvogel L. Microbiote intestinal et réponses aux thérapies anti-tumorales. *Med Sci (Paris)* 2016 ; 32 : 974-82.
13. Weissenbach A, Sghir A. Microbiotes et métagénomique. *Med Sci (Paris)* 2016 ; 32 : 937-43.

## NOUVELLE

**Croissance, sous-nutrition et microbiote**  
**L'effet bénéfique de souches de lactobacilles est conservé de la drosophile à la souris**  
Gilles Storelli<sup>1,2</sup>, François Leulier<sup>1</sup>

> Notre inconscient collectif est marqué par une longue et riche histoire de lutte contre les pathogènes. Ainsi, les bactéries sont souvent regardées avec un *a priori* négatif et de nombreux efforts sont dédiés à leur éradication de notre quotidien. Mais la plupart d'entre nous oublie ou ignorent que nous vivons en constante symbiose avec une immense population bactérienne

appelée microbiote. Celui-ci peut être composé de plus de 1 000 espèces différentes, pour un nombre de bactéries atteignant celui de nos propres cellules [1, 2]. Malgré ces nombres impressionnants, cette symbiose passe souvent inaperçue, car nous ne souffrons pas de la présence quotidienne de nos milliards d'invités. Mais bien plus que d'être de simples pique-assiettes, ces microor-

<sup>1</sup>Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon (IGFL), université de Lyon, École Normale Supérieure de Lyon, CNRS UMR 5242, université Claude Bernard Lyon 1, 46, allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France

<sup>2</sup>Adresse actuelle : Department of Human Genetics, University of Utah School of Medicine, Salt Lake City, UT 84112, États-Unis. [francois.leulier@ens-lyon.fr](mailto:francois.leulier@ens-lyon.fr)  
[gstorelli@genetics.utah.edu](mailto:gstorelli@genetics.utah.edu)

ganismes jouent un rôle majeur dans notre équilibre physiologique. En effet, de nombreuses études démontrent que les bactéries symbiotiques supportent de nombreux traits animaux, tels que le développement post-embryonnaire, la fertilité ou le comportement [2, 3]. Cet impact global s'explique notamment par le fait que les symbiontes bactériens participent à la nutrition de leur