

> Notre vision du microbiote intestinal et de sa contribution à la physiologie humaine a été complètement revisitée grâce aux nouveaux outils de métagénomique. Le séquençage de dernière génération a permis d'identifier les espèces dominantes présentes dans l'intestin par des approches ciblées sur l'ADN ribosomal 16S, mais également de séquencer l'ensemble des gènes présents et donc d'accéder à leurs fonctions. La métagénomique quantitative a conduit à une caractérisation précise de l'écosystème intestinal, de sa structuration et de sa perturbation dans certaines pathologies. Le microbiome apparaît comme un outil diagnostique voire pronostique d'intérêt. La compréhension des mécanismes par lesquels le microbiote interagit avec nos cellules est indispensable ; la métagénomique fonctionnelle constitue un outil essentiel à l'identification des fonctions du microbiote. La prise en compte du microbiote et ses applications en santé humaine constituent un domaine en plein développement. <

## Impact des nouveaux outils de métagénomique sur notre connaissance du microbiote intestinal et de son rôle en santé humaine

### Enjeux diagnostiques et thérapeutiques

Hervé M. Blottière<sup>1,2</sup>, Joël Doré<sup>1,2</sup>



<sup>1</sup> Institut Micalis, INRA, AgroParisTech, université Paris-Saclay, Domaine de Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas, France ;  
<sup>2</sup> MGP MétaGénoPolis, INRA, université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France. [herve.blottiere@jouy.inra.fr](mailto:herve.blottiere@jouy.inra.fr)

Ces dernières années, notre conception de la physiologie humaine a été considérablement revisitée par la reconnaissance du rôle joué par les milliards de micro-organismes qui colonisent notre organisme [1]. Reconnu depuis longtemps pour leur contribution à notre apport en énergie *via* la fermentation des résidus non-digestibles par nos enzymes digestives (principalement les fibres), le microbiote intestinal contribue également à nos besoins en vitamines et en micro-constituants. Plus récemment, le rôle du microbiote dans le développement et la maturation du système immunitaire [38] (→), son importance dans le contrôle des fonctions métaboliques et son interaction avec le système nerveux central ont été soulignés [2]. Il est également essentiel dans la protection contre

(→) Voir la Synthèse de V. Gaboriau-Routhiau et N. Cerf-Bensussan, page 961 de ce numéro

la colonisation par les pathogènes aussi appelée effet barrière. Cet effet barrière est illustré par le spectaculaire effet thérapeutique de la transplantation de microbiote dans les infections récurrentes à *Clostridium difficile* [3, 39] (→).

Suite aux travaux de Savage publiés dans les années 1970, on estimait le microbiote intestinal à quelques 100 000 milliards de micro-organismes et on considérait que l'homme hébergeait 10 fois plus de micro-organismes qu'il n'avait de cellules dans son organisme [4]. Des travaux récents ont revu ces chiffres à la baisse et estiment que nous avons autant de micro-organismes que de cellules humaines [5]. Le microbiote colonise le bébé dès la naissance, et va se diversifier dans les trois premières années de la vie en parallèle du développement et de la maturation du système immunitaire. Cette colonisation est influencée par le mode de naissance (césarienne vs accouchement par voies naturelles), le mode d'alimentation (allaitement vs biberon), la prise d'antibiotiques, l'hygiène environnementale et enfin le mode et le moment du sevrage [6]. Chez l'adulte en bonne santé, on considère que le microbiote

(→) Voir la Synthèse de J.C. Lagier et D. Raoult, page 991 de ce numéro

est relativement stable dans le temps, bien qu'influencé par nos habitudes alimentaires. En revanche, une modification de la composition et des fonctions du microbiote est décrite dans de nombreuses pathologies [1].

### La métagénomique : un outil puissant de caractérisation du microbiote

Pendant de longues années, la caractérisation de la composition du microbiote intestinal était limitée à la seule fraction cultivée et était effectuée par des méthodes de culture en anaérobiose. Le développement des approches moléculaires, et en particulier des approches ciblant l'ADN ribosomal 16S, a permis de revisiter notre vision de la complexité du microbiote, et de souligner l'importance de la fraction non-cultivée [7]. Les progrès des techniques de séquençage de nouvelles générations et des approches métagénomiques ont permis des avancées majeures dans notre compréhension du microbiote [8]. Cependant, la première étape qui est primordiale est la collecte des échantillons (généralement de selles humaines) et l'extraction d'ADN. Ces étapes souvent négligées sont pourtant essentielles pour une analyse optimale du microbiome. À cet égard, le projet européen IHMS (pour *International human microbiome standards*), a souligné l'importance de ces étapes et permis de mettre à la disposition de la communauté scientifique des procédures opérationnelles standardisées (<http://www.microbiome-standards.org>).

Deux stratégies sont ensuite possibles pour obtenir des données à partir d'échantillons d'ADN métagénomique. La plus utilisée et la plus accessible est l'approche ciblée. Elle consiste à amplifier par PCR (*polymerase chain reaction*) un gène (ou une région d'un gène), puis à séquencer l'ensemble des amplicons<sup>1</sup> ainsi obtenus. La cible principale est une région du gène codant l'ARNr 16S qui est maintenant utilisé comme marqueur universel de la phylogénie bactérienne. Ce gène de structure mosaïque<sup>2</sup> est constitué de régions très conservées et de régions variables. Suivant les auteurs, les méthodes de séquençage (longueur des lectures) et l'objectif des études, différentes régions sont ciblées [9]. Cette approche phylogénétique ou méta-taxonomique, permet, malgré les biais, d'appréhender la composition en espèces d'un échantillon. La seconde stratégie, appelée métagénomique globale ou métagénomique « *shotgun* », consiste à séquencer directement l'ensemble de l'ADN de l'échantillon sans cette amplification ciblée. Cette approche permet d'accéder à l'ensemble des gènes dominants présents dans l'échantillon et donc d'accéder aux fonctions du microbiome [10, 11]. Il faut souligner que ces approches, sources de nombreuses données, soulèvent des difficultés liées à leur stockage et à leur traitement et nécessitent des *pipelines* bio-informatiques sophistiqués. La métagénomique quantitative, telle que présentée sur la *Figure 1*, nécessite un référentiel, c'est-à-dire un catalogue annoté des gènes potentiellement présents. Le premier catalogue de notre « autre génome » a été

publié en 2010. Il était composé de 3,3 millions de gènes non-redondants identifiés à partir des selles de 124 Européens [10]. Ce catalogue issu de séquençages métagénomiques a été augmenté récemment en incluant les gènes présents dans les selles de 1267 individus issus des trois continents (Européens, Américains et Chinois) et comprend maintenant 10 millions de gènes [12]. Il faut noter que les nouveaux gènes inclus dans le catalogue sont essentiellement des gènes rares, retrouvés chez peu d'individus. Un catalogue similaire a été construit à partir des métagénomiques fécales de 184 souris de laboratoire [13]. La comparaison des métagénomiques humaines et murines montre une énorme dissimilitude puisque seulement 4 % des gènes sont communs aux deux catalogues. En revanche, lorsque l'on s'intéresse aux fonctions connues des gènes, via l'annotation des KEGG (*Kyoto encyclopedia of genes and genomes*), les deux catalogues montrent une grande similarité fonctionnelle (80 %).

Le principe de la métagénomique quantitative (*Figure 1*) consiste à générer à partir de l'échantillon d'ADN initial une multitude de courtes séquences (lectures ou « *reads* ») de 100 à 150 paires de bases (pb). En moyenne, 20 à 50 millions de lectures seront obtenues. Elles seront ensuite reportées sur les gènes du catalogue afin d'identifier et de quantifier ceux qui sont présents dans l'échantillon. Une matrice de comptage sera ainsi générée pour chaque échantillon/individu permettant une définition fine du microbiome de chaque individu d'une cohorte.

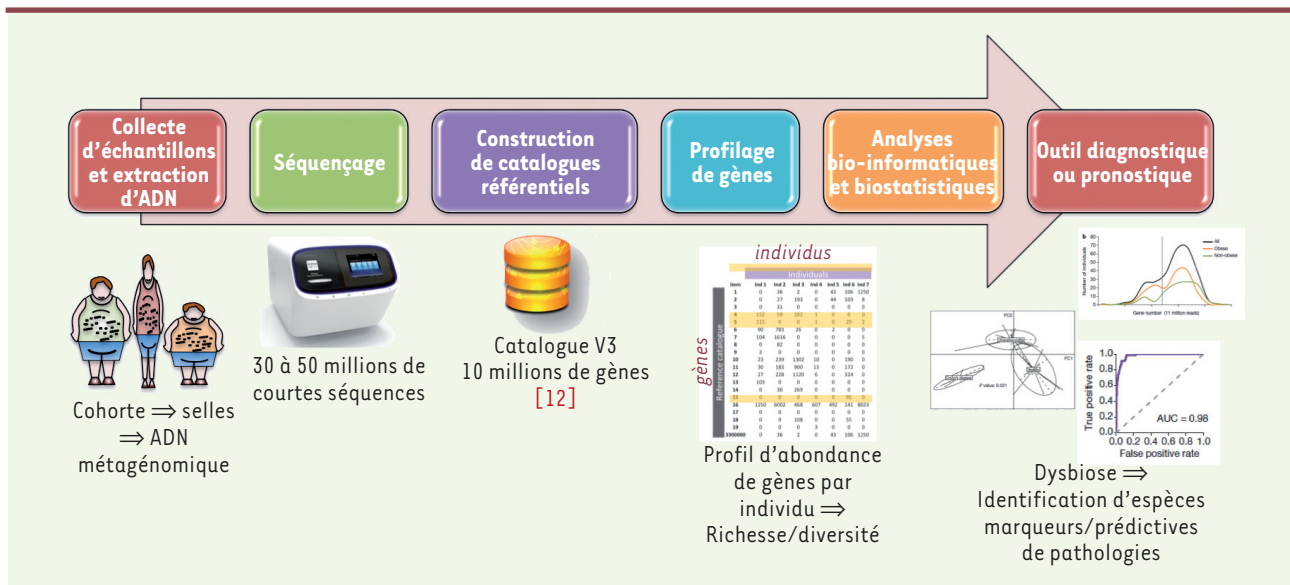
À côté de l'inventaire des gènes présents, les outils de bio-informatique ont permis de reconstituer des entités génomiques entières. En se basant sur le principe que les gènes provenant d'un même génome bactérien devraient se retrouver en abondance identique au sein d'un échantillon, mais vont co-varier d'un échantillon à l'autre, 741 génomes d'espèces bactériennes dites métagénomiques (MGS) ont été reconstruits dont 238 de haute qualité [14]. Ces génomes provenaient pour la majorité (85 %) d'espèces non-cultivées à ce moment et jusqu'alors inconnues. Ces approches ont également permis de reconstruire 6 640 petites unités métagénomiques correspondant à des plasmides, des phages, voire à des séquences CRISPR (des gènes qui protègent les bactéries d'attaques virales) [40] (→).

Ces mêmes outils bio-informatiques ont également permis d'associer à ces MGS, certaines espèces identifiées comme importantes dans les métagénomiques humaines par l'analyse du gène de l'ARN ribosomal 16S, donnant

(→) Voir la Nouvelle de H. Gilgenkrantz, *m/s* n° 12, décembre 2014, page 1066

<sup>1</sup> Produits de l'amplification.

<sup>2</sup> Discontinue.



**Figure 1. Pipeline de métagénomique quantitative.** L'étude du microbiote intestinal tel qu'il est effectué à MétaGénoPolis commence par la réception d'échantillons de selles issus de cohortes ou d'études cliniques. L'ADN contenu dans l'échantillon est extrait et préparé pour le séquençage. Trente à 50 millions de courtes séquences sont obtenues et « mappées » sur un catalogue référentiel des gènes bactériens présents dans l'intestin humain. Un profil d'abondance est ainsi obtenu pour chaque individu. Les analyses bio-informatiques et biostatistiques permettent alors d'identifier les espèces bactériennes associées à un phénotype clinique.

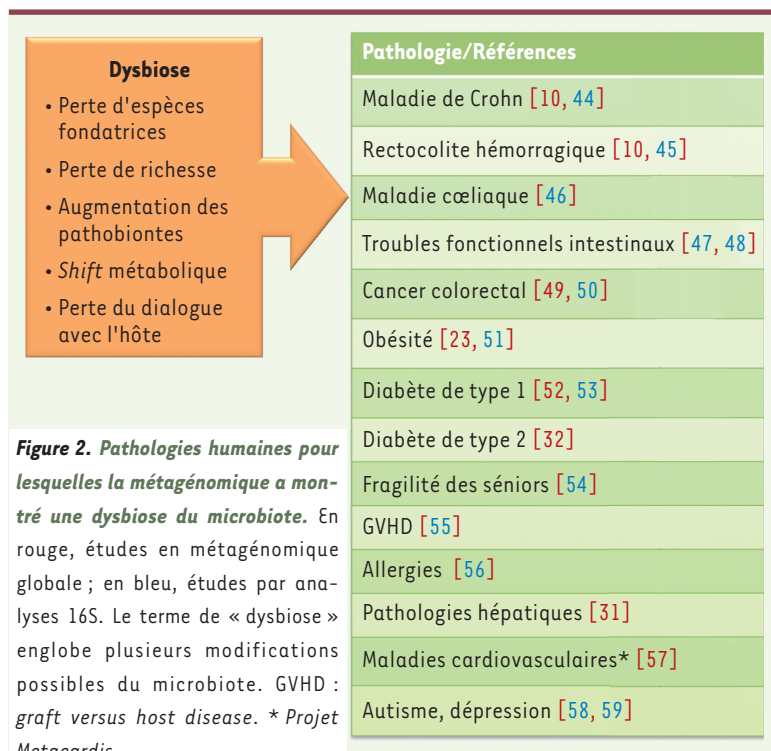
des informations essentielles sur les fonctions de ces espèces non cultivées [15].

### Apport de la métagénomique quantitative à notre connaissance du microbiote

La métagénomique a permis dans un premier temps de confirmer que seuls quelques phylums bactériens étaient retrouvés dans le tube digestif humain. La majorité des espèces présentes appartiennent au phylum des *Firmicutes* et à celui des *Bacteroides* [10]. On retrouve également des Actinobactéries, des Protéobactéries, des *Verrucomicrobia* voire des *Fusobacteria*. Certains individus hébergent des *Archaea*, principalement du genre *Methanobrevibacter*, associées à la capacité de produire et d'excréter du méthane. En analysant les métagénomiques d'individus en bonne santé, les chercheurs du projet européen MétaHIT ont observé qu'il n'y avait pas un microbiome intestinal moyen, mais que les métagénomiques se distribuaient en au moins trois arrangements écologiques, appelés alors entérotypes [16]. Deux de ces entérotypes sont dominés par un seul genre bactérien, *Bacteroidetes* et *Prevotella*, tandis que le troisième est dominé par quelques genres tels *Ruminococcus*, *Subdoligranulum*, et *Methanobrevibacter*. Ce concept a donné lieu à une controverse, notamment entre biostatisticiens, pendant plusieurs années [17-19]. Les habitudes alimentaires semblent être l'un des déterminants majeurs de structuration de l'écosystème intestinal en entérotypes [20, 21]. La physiologie de l'hôte, telle que le temps de transit, est également l'un de ces déterminants essentiels [22]. Quoiqu'il en soit, cette notion soulève de

nombreuses questions concernant en particulier la mise en place de cet équilibre écologique, sa stabilité dans le temps, son lien avec des risques de pathologies, ou son association à la réponse, ou l'absence de réponse, après une intervention nutritionnelle ou thérapeutique [21]. À cet égard, il faut noter que des auteurs américains ont montré qu'un régime alimentaire drastique de 10 jours ne modifiait pas l'appartenance à l'entérotype [20], alors que le microbiote d'un individu peut, sur une période d'un an, présenter séquentiellement les caractéristiques de chacun des 3 entérotypes [18]. Les études de cohortes indiquent également que la richesse en gènes bactériens (et donc en espèces) caractérise l'écosystème intestinal. Certains individus ont un microbiome pauvre ou atrophié, comptant moins de 300 000 gènes, tandis que d'autres, au contraire, ont un microbiome riche de plus de 800 000 gènes dominants [23]. Cette richesse est également associée aux entérotypes. Ainsi, les individus ayant un microbiote dominé par les *Bacteroides* ont plus fréquemment un microbiome à faible richesse en gènes. La richesse en gènes s'avère corrélée, au moins partiellement, au régime alimentaire [24] et un régime peu calorique, riche en fibre, améliore la richesse du microbiome chez des individus à microbiome atrophié [25, 41] (→).

(→) Voir la Synthèse de R. Burcelin et al., page 952 de ce numéro



Cette richesse ou pauvreté correspond également à une fonctionnalité du microbiote différente. Ainsi, chez les individus à microbiote atrophié, la production de propionate<sup>3</sup> liée aux *Bacteroidetes* serait plus importante, tandis que chez les individus à microbiote riche, la production de butyrate, liée elle aux *Firmicutes*, serait accrue [23].

### Microbiote et pathologies - Un outil diagnostique ou pronostique ?

Le développement de la métagénomique a permis d'étudier le microbiome dans diverses pathologies. Les premiers travaux ont porté naturellement sur les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), maladie de Crohn et rectocolite hémorragique, pour lesquelles le rôle du microbiote avait été suggéré dès les années 1990 [26, 42, 43] (→).

Ces travaux montrent une réduction de la diversité bactérienne, en particulier dans les *Firmicutes* du groupe des *Clostridium leptum*, et une augmentation des Proteobactéries dont *Escherichia coli*. La perte d'un *Firmicute* normalement dominant, *Faecalibacterium prausnitzii*, chez les patients atteints de maladie de Crohn, a été ensuite découverte comme marqueur pronostique péjoratif de récurrence après chirurgie [27]. Les propriétés anti-inflammatoires de cette bactérie ont été démontrées dans des modèles de colites chez la souris et *in vitro*, faisant de *F. prausnitzii* un candidat pour des interventions thérapeutiques. La métagénomique quantitative a confirmé cette

(→) Voir la Nouvelle de B. Lamas *et al.*, et la Synthèse de O. Rahmouni *et al.*, pages 933 et 968 de ce numéro

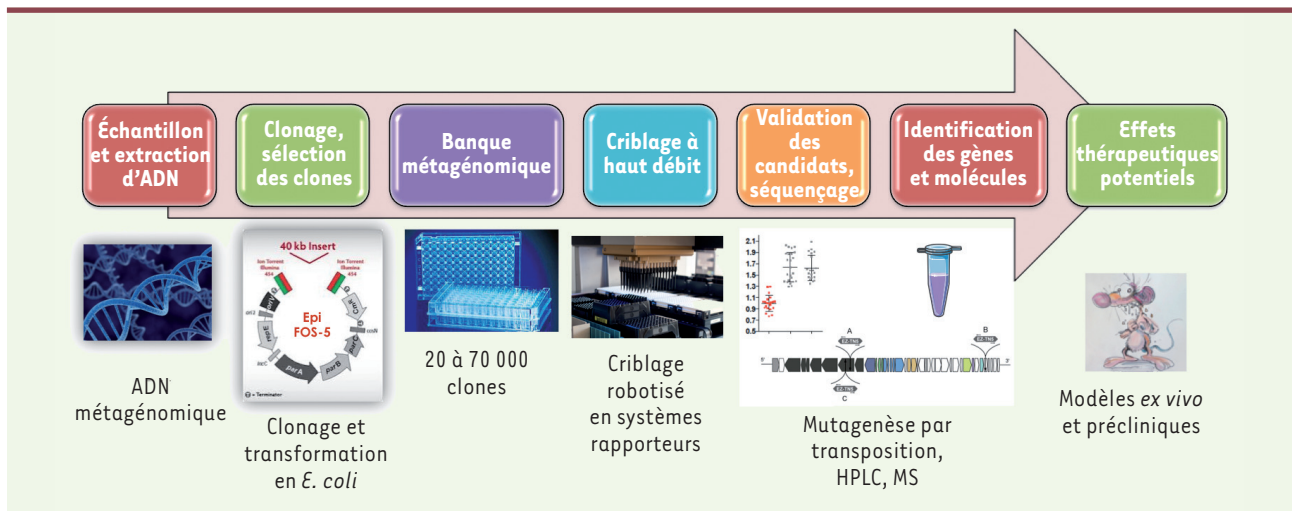
dysbiose observée chez les patients atteints de maladie de Crohn [10].

Depuis ces travaux pionniers, cette approche puissante de métagénomique quantitative a été appliquée à de nombreuses autres pathologies (Figure 2). Ainsi dans l'obésité, une augmentation des *Firmicutes* associée à une réduction des *Bacteroidetes* a été rapportée dans un modèle murin d'obésité mais aussi dans un petit groupe de 12 patients [28], ces résultats n'ont cependant pas été confirmés dans d'autres études incluant un nombre supérieur de volontaires [29, 30]. Une autre étude conduite sur une cohorte de 169 obèses et 123 témoins n'a pas retrouvé ce déséquilibre *Firmicutes/Bacteroidetes*, mais elle a montré une diminution de la richesse du microbiome chez certains patients obèses [23, 25]. Cette atrophie du microbiote est associée à un état inflammatoire exacerbé, à une insulino-résistance accrue, à une dyslipidémie et une augmentation de l'adiposité [23, 41] (→).

(→) Voir la Synthèse de R. Burcelin *et al.*, page 952 de ce numéro

Dans la cirrhose hépatique, une dysbiose du microbiote est également observée [31]. Les patients montrent une perte de richesse, comme cela est décrit dans la maladie de Crohn. En revanche, une trentaine d'espèces, rarement retrouvées chez les témoins sains, sont surabondantes, remplaçant des espèces normalement dominantes. Ces « envahisseurs » sont en fait des bactéries communément retrouvées dans la bouche et quelques pathogènes d'origine alimentaire. L'explication la plus plausible à cette localisation inhabituelle des bactéries de la sphère orale peut être liée aux sels biliaires. En effet, ces bactéries qui sont normalement détruites par la bile, survivent au passage dans l'intestin dans un contexte de cirrhose et vont coloniser celui-ci, déséquilibrant l'écosystème intestinal [31]. Cette dysbiose constitue une base diagnostique potentielle, puisqu'en analysant la présence ou l'absence de quelques espèces dans les selles de patients, il est possible, de façon non-invasive, de diagnostiquer une atteinte hépatique. De plus, une analyse des gènes, et donc des fonctions, surreprésentés chez les patients cirrhotiques, montre une augmentation des gènes associés à la production d'ammoniaque, de l'acide gamma amino-butyrique (GABA) et au métabolisme du manganèse, des facteurs associés aux complications de la cirrhose notamment aux encéphalopathies hépatiques [31]. Cet exemple illustre l'intérêt de caractériser le microbiome de patients dans diverses pathologies, et la force de la métagénomique quantitative qui permet

<sup>3</sup> Métabolite produit par certaines bactéries.



**Figure 3. Application de la métagénomique fonctionnelle à l'identification de molécules bactériennes d'intérêt thérapeutique.** La métagénomique fonctionnelle permet d'aborder l'ensemble des gènes dominants présents dans un échantillon sans avoir à cultiver les bactéries dont ils proviennent. L'ADN est extrait pour être cloné et intégré dans une bactérie facilement cultivable (*Escherichia coli*). Des méthodes de criblages à haut débit sont ensuite mises au point afin d'identifier des gènes portant la fonction recherchée, i.e. l'activation de voie de signalisation dans des cellules humaines. Par des approches biochimiques, la molécule/métabolite est recherchée. HPLC : high performance liquid chromatography ; MS : mass spectrometry.

également d'apporter des informations sur les fonctions du microbiote.

La Figure 2 liste un certain nombre de pathologies pour lesquelles des dysbioses du microbiote ont été documentées. Certains cancers, les diabètes de type 1 et 2, mais également des pathologies associées au système nerveux central, ont été étudiées, illustrant l'importance de la prise en compte du microbiote dans la compréhension de la physiopathologie. Cependant, comme le souligne un article récent d'une étude du consortium MetaHIT, une bonne caractérisation des patients et, en particulier, de leur médication, est essentielle, certaines drogues ayant un fort impact sur le microbiote et la physiologie intestinale [32].

### Métagénomique fonctionnelle : un pipeline pour la découverte de nouvelles molécules/cibles d'intérêt thérapeutique

L'adaptation du microbiote à son hôte résulte d'une longue co-évolution au cours des millénaires et d'une adaptation pour un bénéfice mutuel. L'hôte apporte la niche écologique et l'aliment nécessaire au développement bactérien ; le microbiote produit des métabolites essentiels pour l'homme, tels que certaines vitamines ou les acides gras à chaîne courte qui contribuent aux fonctions physiologiques de l'hôte. Il participe également à l'homéostasie intestinale et à la maturation du système immunitaire [38] (→).

Cependant nos connaissances des mécanismes cellulaires et moléculaires d'interaction entre le microbiote et son hôte restent parcellaires. En effet, en plus de la diversité et la complexité du microbiome, un des challenges à relever réside dans la difficulté à cultiver la majorité des bactéries intestinales, ce qui rend leur étude ardue. Il faut noter cependant que

(→) Voir la Synthèse de V. Gaboriau-Routhiau et N. Cerf-Bensussan, page 961 de ce numéro

des efforts importants sont fournis actuellement pour tenter de cultiver les bactéries considérées incultivables [33]. Afin d'identifier les gènes et métabolites bactériens impliqués dans le dialogue avec les cellules de l'hôte, en particulier les cellules épithéliales intestinales, nous avons développé une approche de métagénomique fonctionnelle (Figure 3) permettant d'accéder au potentiel des gènes bactériens de l'ensemble du microbiote intestinal [34]. Cette approche consiste à isoler l'ADN de l'ensemble des bactéries présentes dans l'échantillon initial, ou ADN métagénomique, de le fragmenter en larges fragments d'environ 40 kb, ce qui correspond en moyenne à 40 gènes bactériens et donne accès à des opérons<sup>4</sup> entiers. Cet ADN est cloné dans un fosmide<sup>5</sup>, qui est ensuite transfecté dans une bactérie hôte, souvent *E. coli*, qui n'accepte qu'une unique copie par bactérie. Un clonage est ensuite effectué, afin d'obtenir des banques de clones métagénomiques comportant 20 à 70 000 clones, chacun pouvant exprimer le potentiel des 40 gènes de l'insert métagénomique. Des banques issues des selles de donneurs sains, de patients atteints de maladie de Crohn et d'obèses, ou provenant de la fraction bactérienne adhérente à la muqueuse intestinale humaine, ont ainsi été produites.

<sup>4</sup> Ensemble de gènes impliqués dans une fonction.

<sup>5</sup> Un cosmide fondé sur le facteur F de *Escherichia coli*. Les cosmides sont des plasmides dans lesquels a été inséré le site cos du phage lambda qui rend possible l'emballage du plasmide (porteur d'un insert) dans la tête du phage lambda. Le facteur F est un plasmide qui contrôle sa propre répllication, son nombre de copies, la répartition des copies dans les cellules filles et son transfert.





**Figure 4. Plateforme robotique de métagenomique fonctionnelle de MétaGénoPolis.** Cette photographie montre trois robots utilisés par l'unité MétaGénoPolis (INRA) pour réaliser les criblages à haut débit nécessaires à la métagenomique fonctionnelle.

Étant donné le nombre de clones à tester, une approche à haut débit basée sur l'utilisation de gènes rapporteurs a été adoptée. Une plateforme de criblage mettant en jeu des automates a été construite (Figure 4). Les premiers criblages ont ciblé la voie de signalisation cellulaire NF- $\kappa$ B (*nuclear factor-kappa B*) dont la régulation contrôle l'inflammation [35]. Deux lignées de cellules épithéliales intestinales classiquement utilisées, HT-29 et Caco-2<sup>6</sup>, ont été transfectées de façon stable avec un plasmide rapporteur utilisant la luciférase, ou la phosphatase alcaline<sup>7</sup>, comme gène rapporteur placé sous le contrôle de plusieurs copies des éléments de réponse à NF- $\kappa$ B. Ce type d'approche à haut débit a nécessité une mise au point de toutes les étapes du criblage, que ce soit la partie croissance et lyse des clones métagenomiques, la partie cellulaire, ou la partie traitement et analyse des milliers de données obtenues [36]. Les clones positifs, obtenus après une étape de validation, sont séquencés, afin de connaître le support génétique des actifs obtenus et de savoir de quelle bactérie est issu l'insert métagenomique. En parallèle, une mutagenèse randomisée par transposition<sup>8</sup> est effectuée. Pour chaque clone, entre 200 et 400 mutants sont obtenus et criblés à nouveau pour identifier quels sont les gènes qui sont porteurs de l'activité [35]. À titre d'exemple, un des clones identifiés comme activateur de la voie NF- $\kappa$ B est issu de *Bacteroides vulgatus*, une bactérie souvent associée à la maladie de Crohn. La mutagenèse par transposition a montré qu'un transporteur de lipoprotéine de la famille LolD et une lipoprotéine étaient indispensables à l'activation de NF- $\kappa$ B. Des travaux sont en cours pour comprendre comment cette lipoprotéine peut activer cette voie de signalisation, notamment quel est le récepteur cellulaire mis en jeu, mais également pour comprendre les conséquences physiopathologiques de cette interaction. Plus d'une trentaine de clones modulateurs de voies

<sup>6</sup> Lignées cellulaires tumorales humaines d'origine intestinale isolées d'adénocarcinomes coliques.

<sup>7</sup> Les gènes de ces enzymes sont placés sous la dépendance des promoteurs de gènes que l'on étudie. Lorsqu'elles sont exprimées par la cellule, elles permettent de révéler l'induction de la transcription des gènes qu'elles remplacent.

<sup>8</sup> Insertion d'une séquence entière d'ADN.

de signalisation ou de gènes clés pour l'homéostasie de l'épithélium intestinal ont été identifiés à ce jour et sont en cours de caractérisation. Les outils développés pour ce projet forment maintenant la plate-forme MetaFun du projet d'investissement d'avenir MétagénoPolis ([www.mgps.eu](http://www.mgps.eu)) et sont accessibles pour des projets collaboratifs. Cette approche innovante a également été utilisée avec succès par une équipe de l'université Rockefeller de New York [37]. Cette stratégie permettant de découvrir de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique est maintenant adoptée par deux entreprises, *Entérome biosciences* en France, et *Lodo therapeutics* aux États-Unis.

Ces travaux pionniers permettent ainsi de mieux comprendre le support génétique des fonctions du microbiote intestinal, les mécanismes d'interaction avec l'épithélium intestinal et le rôle joué par nos bactéries intestinales dans le maintien de la santé.

### Les futures applications du microbiote en santé humaine

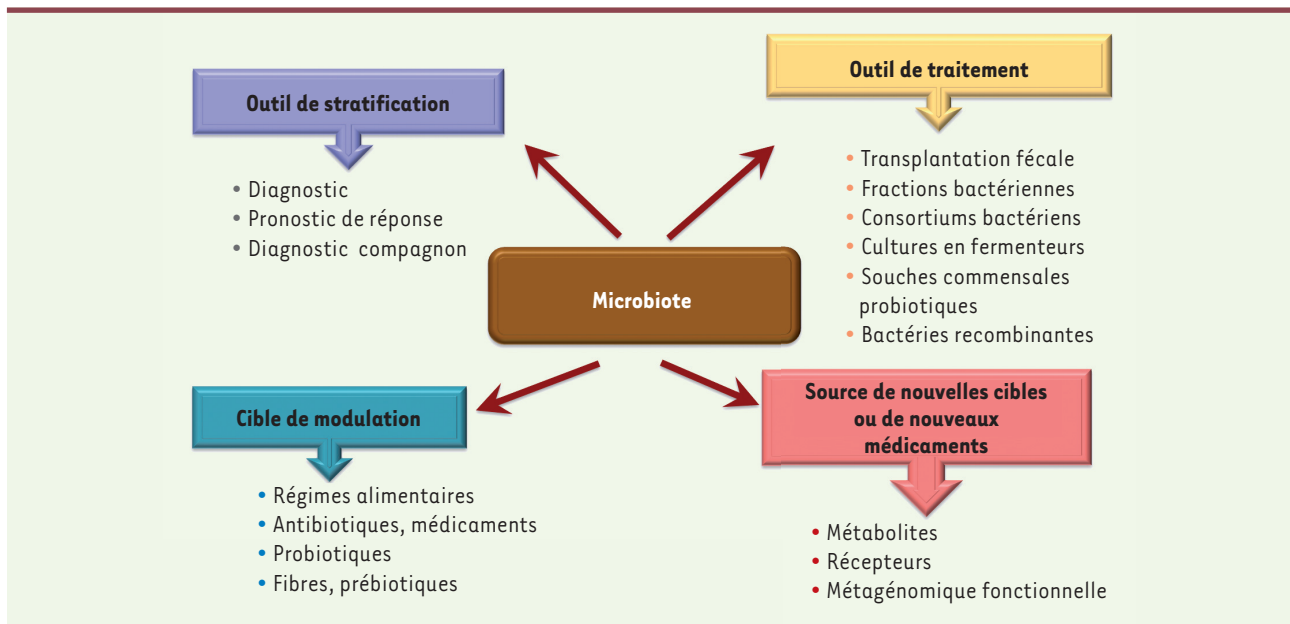
La caractérisation complète de notre *autre* génome, le métagénome, est donc une étape clé de la compréhension de la physiologie humaine. De nombreuses entreprises se sont créées afin d'exploiter les potentielles applications de notre microbiote. Ces applications possibles vont dans quatre directions (Figure 5).

La première utilise le microbiote comme outil de stratification, avec des applications possibles dans le domaine du diagnostic, comme nous l'avons vu avec l'exemple de la cirrhose. La caractérisation fine du microbiome permettant de sélectionner les éventuels répondeurs à un traitement est une piste en plein développement, elle constitue un outil de diagnostic « compagnon » de produits thérapeutiques.

Le microbiote peut également être un outil de traitement. Le succès de la transplantation fécale dans le cadre des infections à *Clostridium difficile* a ouvert une voie pour de nombreuses autres applications [39] (→).

(→) Voir la Synthèse de J.C. Lagier et D. Raoult, page 991 de ce numéro

À côté de la transplantation à proprement parler, d'autres alternatives sont à l'étude. L'utilisation de fractions bactériennes obtenues à partir de selles, l'utilisation d'un cocktail de souches ou consortium bactérien, voire de cultures en fermenteurs sont aussi proposées. Le secteur des probiotiques a connu un essor très important. L'utilisation de bactéries commensales, pour leur potentiel probiotique, paraît un domaine prometteur et plusieurs espèces comme *F. prausnitzii* ou *Akkermansia muciniphila* semblent de bonnes candidates.



**Figure 5. Applications potentielles du microbiote en santé humaine.** Ces applications vont dans quatre directions différentes. La caractérisation précise d'un microbiote intestinal constitue un moyen de stratifier les patients en vue d'une médecine plus personnalisée. Différentes approches interventionnelles en vue de modifier le microbiote intestinal peuvent également être envisagées. Le microbiote ou certaines de ses composantes peuvent constituer des outils thérapeutiques potentiels. Enfin, certains métabolites/molécules provenant de bactéries commensales, ou de récepteurs à ces métabolites peuvent avoir un intérêt thérapeutique.

La compréhension des mécanismes par lesquels le microbiote module la signalisation de nos cellules est essentielle afin d'identifier les effecteurs de ce dialogue. D'un côté, les métabolites identifiés peuvent constituer de nouvelles drogues à potentiel thérapeutique. D'un autre côté, les éventuels récepteurs ou voies de signalisation identifiés chez l'hôte peuvent représenter des cibles pour de nouveaux anticorps médicaments ou des molécules pharmacologiques. Ainsi, la métagénomique fonctionnelle a permis d'identifier de nouveaux métabolites bactériens d'intérêt thérapeutique à partir de bactéries non isolées ni cultivées.

Enfin, de nombreuses approches visant à moduler notre microbiote peuvent être envisagées [21]. L'adoption de régimes alimentaires appropriés, l'utilisation de fibres et/ou prébiotiques, certains probiotiques, voire certains médicaments dont les antibiotiques permettent, en modulant la composition ou l'activité métabolique de notre microbiote, d'avoir un impact sur la physiologie de l'hôte avec des conséquences positives pour certaines pathologies. Les années à venir nous diront quelles sont les pistes qui se révéleront les plus pertinentes. ♦

## SUMMARY

### Impact of newly developed metagenomic tools on our knowledge of the gut microbiota and its role in human health: diagnostic and therapeutic issues

Over the last years, our vision of the intestinal microbiota and its contribution to human physiology has been fully revisited, thanks to metagenomics. Next generation sequencing allowed a full characterization of the microbiome. Quantitative metagenomic permitted

a deep understanding of the intestinal ecosystem, its structure, and potential dysbiosis in several human pathologies. The microbiome may be used as biomarker of disease or of risk to progress toward a disease. A good understanding of the mechanisms of interaction between gut microbiota and its host is needed; functional metagenomic is a useful tool to identify genes and metabolites able to interact with host's cells. Overall, the microbiome science that is developing opens new avenue for diagnosis, discovery of new drugs and potential therapeutic approaches. It is also a target for modulation by food, with potential impact on health. ♦

## LIENS D'INTÉRÊT

Hervé M. Blottière collabore avec Enterome Bioscience. J. Doré déclare n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

## RÉFÉRENCES

1. Blottière HM, de Vos WM, Ehrlich SD, Doré J. Human intestinal metagenomics: state of the art and future. *Curr Opin Microbiol* 2013; 16 : 232-9.
2. Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 2012; 336 : 1262-7.
3. Van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2013; 368 : 407-15.
4. Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* 1977; 31 : 107-33.
5. Sender R, Fuchs S, Milo R. Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. *Cell* 2016; 164 : 337-40.

## RÉFÉRENCES

6. Cultrone A, Tap J, Lapaque N, Doré J, Blottière HM. Metagenomics of the human intestinal tract: from who is there to what is done there. *Curr Opin Food Sci* 2015 ; 4 : 64-8.
7. Suau A, Bonnet R, Sutren M, et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* 1999 ; 65 : 4799-4-807.
8. Audebert C, Hot D, Lemoine Y, Caboche S. Le séquençage haut-débit : vers un diagnostic basé sur la séquence complète du génome de l'agent infectieux. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 1144-51.
9. Clooney AG, Fouhy F, Sleator RD, et al. Comparing apples and oranges ? Next generation sequencing and its impact on microbiome analysis. *PLoS One* 2016 ; 11 : e0148028.
10. Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010 ; 464 : 59-65.
11. Weinstock GM. Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature* 2012 ; 489 : 250-6.
12. Li J, Jia H, Cai X, et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol* 2014 ; 32 : 834-41.
13. Xiao L, Feng Q, Liang S, et al. A catalog of the mouse gut metagenome. *Nat Biotechnol* 2015 ; 33 : 1103-8.
14. Nielsen HB, Almeida M, Juncker AS, et al. Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes. *Nat Biotechnol* 2014 ; 32 : 822-8.
15. Almeida M, Pop M, Le Chatelier E, et al. Capturing the most wanted taxa through cross-sample correlations. *ISME J* 2016 ; 10 : 2459-67.
16. Arumugam M, Raes J, Pelleret E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011 ; 473 : 174-80.
17. Jeffery IB, Claesson MJ, O'Toole PW, Shanahan F. Categorization of the gut microbiota: enterotypes or gradients? *Nat Rev Microbiol* 2012 ; 10 : 591-2.
18. Knights D, Ward TL, McKinlay CE, et al. Rethinking enterotypes. *Cell Host Microbe* 2014 ; 16 : 433-7.
19. Ding T, Schloss PD. Dynamics and associations of microbial community types across the human body. *Nature* 2014 ; 509 : 357-60.
20. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 2011 ; 334 : 105-8.
21. Doré J, Blottière HM. The influence of diet on the gut microbiota and its consequences for health. *Curr Opin Biotechnol* 2015 ; 32 : 195-9.
22. Vandeputte D, Falony G, Vieira-Silva S, et al. Stool consistency is strongly associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates. *Gut* 2016 ; 65 : 57-62.
23. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 2013 ; 500 : 541-6.
24. Kong LC, Holmes BA, Cotillard A, et al. Dietary patterns differently associate with inflammation and gut microbiota in overweight and obese subjects. *PLoS One* 2014 ; 9 : e109434.
25. Cotillard A, Kennedy SP, Kong LC, et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* 2013 ; 500 : 585-8.
26. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 2006 ; 55 : 205-11.
27. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 ; 105 : 16731-6.
28. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JJ. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006 ; 444 : 1022-3.
29. Duncan SH, Lohley GE, Holtrop G, et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes (Lond)* 2008 ; 32 : 1720-4.
30. Schwierz A, Taras D, Schäfer K, et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity* 2010 ; 18 : 190-5.
31. Qin N, Yang L, Li A, et al. Human gut microbiome alterations in liver cirrhosis. *Nature* 2014 ; 513 : 59-64.
32. Forslund K, Hildebrand F, Nielsen T, et al. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature* 2015 ; 528 : 262-6.
33. Browne HP, Forster SC, Anonye BO, et al. Culturing of unculturable human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature* 2016 ; 533 : 543-6.
34. Larraufie P, de Wouters T, Veronese G, Blottière HM, Doré J. Functional metagenomics to decipher food-microbe-host crosstalk. *Proc Nutr Soc* 2015 ; 74 : 1-4.
35. Lakhdari O, Cultrone A, Tap J, et al. Functional metagenomics: a high throughput screening method to study microbiota-driven cell signaling modulation in the human gut. *PLoS One* 2010 ; 5 : e13092.
36. De Wouters T, Ledue F, Nepelska M, et al. A robust and adaptable high throughput screening method to study host-microbiota interactions in the human intestine. *PLoS One* 2014 ; 9 : e105598.
37. Cohen LJ, Kang HS, Chu J, et al. Functional metagenomic discovery of bacterial effectors in the human microbiome and isolation of commensamide, a GPCR G2A/132 agonist. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015 ; 112 : E4825-34.
38. Gaboriau-Routhiau V, Cerf-Bensussan N. Microbiote intestinale et développement du système immunitaire. *Med Sci (Paris)* 2016 ; 32 : 961-7.
39. Lagier JC, Raoult D. Greffe de microbiote fécal et infections : mise au point, perspectives. *Med Sci (Paris)* 2016 ; 32 : 991-7.
40. Gilgenkrantz H. La révolution des CRISPR est en marche. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 1066-9.
41. Burcelin R, Nicolas S, Blasco-Baque V. Microbiotes et maladies métaboliques : de nouveaux concepts pour de nouvelles stratégies thérapeutiques. *Med Sci (Paris)* 2016 ; 32 : 952-60.
42. Lamas B, Richard ML, Sokol H. CARD9 et colite : un pont entre dysbiose et immunité. *Med Sci (Paris)* 2016 ; 32 : 933-6.
43. Rahmouni O, Dubuquoy L, Desreumaux P, Neut C. Microbiote intestinale et développement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Med Sci (Paris)* 2016 ; 32 : 968-73.
44. Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, et al. The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe* 2014 ; 15 : 382-92.
45. Lepage P, Häslér R, Spehlmann ME, et al. Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2011 ; 141 : 227-36.
46. D'Argenio V, Casaburi G, Precone V, et al. Metagenomics reveals dysbiosis and a potentially pathogenic *N. flavescens* strain in duodenum of adult celiac patients. *Am J Gastroenterol* 2016 ; 111 : 879-90.
47. Saulnier DM, Riehle K, Mistretta TA, et al. Gastrointestinal microbiome signatures of pediatric patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2011 ; 141 : 1782-91.
48. Rajilic-Stojanovic M, Biagi E, Heilig HG, et al. Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2011 ; 141 : 1792-801.
49. Zeller G, Tap J, Voigt AY, et al. Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer. *Mol Syst Biol* 2014 ; 10 : 766.
50. Sobhani I, Tap J, Roudot-Thoraval F, et al. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS One* 2011 ; 6 : e16393.
51. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JJ. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006 ; 444 : 1022-3.
52. Kostic AD, Gevers D, Siljander H, et al. The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression toward type 1 diabetes. *Cell Host Microbe* 2015 ; 17 : 260-73.
53. Murri M, Leiva I, Gomez-Zumaquero JM, et al. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. *BMC Med* 2013 ; 11 : 46.
54. Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 2012 ; 488 : 178-84.
55. Taur Y, Jenq RR, Perales MA, et al. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2014 ; 124 : 1174-82.
56. Abrahamsson TR, Jakobsson HE, Andersson AF, et al. Low diversity of the gut microbiota in infants with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* 2012 ; 129 : 434-40.
57. Karlsson FH, Fåk F, Nookaew I, et al. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat Commun* 2012 ; 3 : 1245.
58. Finegold SM, Dowd SE, Gontcharova V, et al. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe* 2010 ; 16 : 444-53.
59. Naseribafrouei A, Hestad K, Avershina E, et al. Correlation between the human fecal microbiota and depression. *Neurogastroenterol Motil* 2014 ; 26 : 1155-62.

**TIRÉS À PART**  
H.M. Blottière



Tarifs d'abonnement m/s - 2016

**Abonnez-vous**  
**à médecine/sciences**

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès  
des sciences biologiques et médicales

**Bulletin d'abonnement**  
page 1040 dans ce numéro de m/s

