



INSTITUT DE FRANCE
Académie des sciences

Séance commune

Académie des sciences / Académie d'agriculture de France

**Mardi 23 mars 2010, 14 h 30
à l'Académie des sciences**

La métagénomique et ses conséquences

Coordinateurs

**Stanislas Dusko EHRLICH (Académie d'agriculture de France)
et Jean WEISSENBACH (Académie des sciences)**

ACADEMIE DES SCIENCES / ACADEMIE D'AGRICULTURE DE FRANCE

- 14 h 30 Ouverture**
Jean WEISSENBACH, Académie des sciences, directeur du Génoscope, Evry
- 15 h 00 Métagénomique des eaux usées**
Denis LE PASLIER, CNRS UMR8030, responsable du programme Cloaca maxima, Génoscope, Evry
- 15 h 30 Terragénome : un consortium international pour séquencer le métagénome du sol**
Pascal SIMONET, CNRS, UMR 5005, Équipe Génomique Microbienne Environnementale, Ecole Centrale de Lyon
- 16 h 00 Questions et discussion**
- 16 h 30 A chacun son microbiote intestinal, organisé en biofilm**
Joël DORÉ, INRA, Unité d'Écologie et Physiologie du Système Digestif, (UEPSD) Jouy-en-Josas, coordinateur du projet franco-chinois
- 17 h 00 Conclusion et perspectives**
Stanislas Dusko EHRLICH, Académie d'agriculture de France, INRA, Unité de génétique microbienne, Jouy-en-Josas

Métagénomique des eaux usées

Denis LE PASLIER
CNRS UMR 8030
Responsable du programme Cloaca maxima
Génoscope, Evry

La métagénomique ou génomique environnementale est une science relativement récente. Elle a pour but d'étudier l'ensemble des génomes de tous les organismes ou communautés prélevés dans l'environnement. Ces communautés sont généralement majoritairement composées d'organismes non encore cultivés (résistants aux tentatives de culture et d'isolement ou dont les conditions de culture utilisées sont inappropriées). Il est, en effet, généralement admis que moins de 1% des procaryotes de la plupart des environnements peuvent être cultivés.

Le traitement des eaux usées est réalisé par un ensemble d'écosystèmes complexes interconnectés : les stations d'épuration. Ces bassins sont le siège d'une intense activité de biodégradation d'une grande variété de substances chimiques. Celles-ci sont effectuées par une succession d'étapes alternant l'aérobiose et l'anaérobiose et impliquent une importante diversité de microorganismes. Dans le but d'étudier cette diversité, d'importantes ressources métagénomiques (clones "grand insert" et séquences nucléiques) ont été produites à la fois pour le bassin aérobie et pour le digesteur anaérobie mésophile de la station d'épuration d'Evry. Les objectifs de ce projet "Cloaca maxima" sont de réaliser un inventaire des microorganismes, un inventaire des gènes et des activités enzymatiques.

Les banques métagénomiques ont permis de découvrir de nouvelles divisions candidates bactériennes. Nous avons montré qu'il n'était pas impossible de reconstituer le génome complet de bactéries appartenant à des divisions sans représentant cultivable, même à partir d'un métagénome complexe. De plus, les banques "grand insert" s'avèrent très utiles pour des études fonctionnelles. Les séquences métagénomiques permettent ainsi la mise en évidence de nouveaux enzymes et de voies métaboliques alternatives. Ces approches métagénomiques, l'exploitation des données de séquences et l'identification expérimentale des fonctions biologiques, sont multidisciplinaires et ouvrent de nouvelles perspectives pour les biotechnologies.

Terragenome: Un consortium international pour séquencer le métagénome du sol.

Pascal SIMONET

Equipe « Génomique Microbienne Environnementale »
(Environmental Microbial Genomics Group)

UMR CNRS 5005, Laboratoire Ampère, Ecole Centrale de Lyon,
36 avenue Guy de Collongue, 69134 Ecully Cedex, France.

pascal.simonet@ec-lyon.fr

L'activité microbienne du sol est capitale à la vie sur notre planète, les microorganismes telluriques étant des acteurs majeurs des grands cycles bio-géochimiques terrestres dont notamment ceux du carbone et de l'azote. La fertilité et inversement la désertification des sols dépendent fortement de la présence et des activités que réalisent bactéries, archaea, eucaryotes microscopiques des sols. Ces microbes recèlent également un potentiel considérable de fonctions utiles à l'homme, pour sa santé (nouveaux médicaments), celle de son environnement (traitement des pollutions chimiques des sols, bioremédiation), son alimentation (amélioration de la croissance des plantes, protection contre les pathogènes). Paradoxalement et en dépit de l'importance qu'ils représentent on ne connaît encore que très imparfaitement la vulnérabilité de ces microorganismes aux différents types de perturbations auxquels ils peuvent être confrontés. Sont-ils eux aussi menacés par l'érosion de la biodiversité, dans quelle mesure la redondance de fonctions entre différents taxons bactériens permet-elle de compenser cette possible érosion populationnelle, les mécanismes de résilience tant populationnelle que fonctionnelle sont-ils suffisamment puissants pour maintenir un fonctionnement optimal des écosystèmes lorsque ceux-ci sont soumis à des stress comme lors du changement d'utilisation des terres ou en réponse aux changements climatiques? Ces problématiques, déjà d'actualité, vont prendre une importance considérable dans un futur proche. La difficulté rencontrée pour répondre à ces questions tient au fait que les communautés microbiennes des sols, qui représentent le plus important réservoir de biodiversité demeurent largement méconnues, inexplorées et donc sous-exploitées du fait que seule une infime proportion de ces organismes peut être cultivée in vitro.

C'est avec le développement conjoint des approches métagénomiques, c'est-à-dire basée sur l'extraction directe de l'ADN bactérien du sol sans étape de mise en culture préalable et des nouvelles méthodes de séquençage à très haut débit qu'une véritable analyse du potentiel génétique des communautés microbiennes peut aujourd'hui être efficacement initiée. L'information produite permettra de révéler progressivement toute la diversité de ce monde microscopique, leur mode d'évolution et d'adaptation, les interactions qui régissent tant le développement des différentes populations que les fonctions que chacune peut réaliser séparément ou en associations.

Le projet « Terragenome »¹ a pour objectif de fédérer la communauté scientifique internationale en vue de réaliser le séquençage complet du métagénome (l'ensemble des génomes bactériens) d'un sol de référence. Celui-ci a été soigneusement sélectionné non pas sur des considérations pédo-agronomiques mais sur le consensus international que la station agronomique expérimentale britannique de Rothamsted a réussi à réunir autour de la parcelle « Park Grass » grâce aux informations agro-pédo-climatologiques accumulées tout au long des cent cinquante années d'étude de cette parcelle.

Ce projet d'une ampleur considérable, si l'on considère que les 10 milliards de cellules bactériennes colonisant un gramme de sol se répartissent en plusieurs dizaines voire centaines de milliers d'espèces différentes, constitue la troisième initiative internationale de séquençage de génomes bactériens d'écosystèmes complexes après l'environnement marin et celui du tube digestif de l'homme. Seule une mobilisation large de la communauté scientifique internationale est donc susceptible de permettre de relever un tel défi qui nécessite de plus une collaboration étroite entre scientifiques spécialistes de microbiologie, d'écologie microbienne, de biologie moléculaire, de bioinformatique mais aussi de chimie et de physique du sol. S'appuyant sur la solide fondation que représente le projet « Metasoil » financé par le programme Génomique à Grande Echelle de l'ANR, les chercheurs de l'équipe « Génomique Microbienne Environnementale » de l'Unité Ampère à l'Ecole Centrale de Lyon coordonnent le consortium international « Terragenome » qui s'est fixé comme objectif des dix prochaines années de réaliser le séquençage exhaustif du métagénome de ce sol, son analyse et son exploitation.

Ma communication visera à présenter les premiers résultats tant expérimentaux concernant l'extraction de l'ADN bactérien à partir du sol, son exploitation en séquençage et en construction de banques d'ADN métagénomique, qu'organisationnels sur la structuration progressive du consortium international « Terragenome ».

¹ Vogel TM, Simonet P, Jansson JK., Hirsch PR, Tiedje JM, Van Elsas JD, Bailey MJ, Nalin R and Philippot L. 2009. TerraGenome: a consortium for the sequencing of a soil metagenome. *Nature Reviews Microbiology*, 7,252.

A chacun son microbiote intestinal, organisé en biofilm

Joël DORÉ

INRA, Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif
78352 Jouy-en-Josas Cedex. France

La communauté microbienne qui réside dans l'intestin humain est pour la plus grande part inconnue dans la mesure où les microbes dominants sont majoritairement non cultivables. Les techniques de culture adaptées ont néanmoins permis l'isolement et la caractérisation d'une grande diversité de bactéries de ce que l'on appelle aujourd'hui le microbiote fécal humain dominant. La dernière décennie a vu se développer des outils indépendants de la culture qui ont permis la réévaluation complète de la diversité du microbiote intestinal humain. La génomique appliquée au consortium microbien dans son ensemble se développe depuis quelques années et va permettre d'accéder aux fonctions bactériennes qui s'expriment in situ dans l'intestin.

La majorité des espèces bactériennes fécales dominantes chez l'homme adulte appartiennent à 3 phyla : les Bactéroïdètes (gram négatifs) ; les Firmicutes et les Actinobactéries (gram positifs). On estime aujourd'hui que 800 à 1000 espèces bactériennes composent le microbiote intestinal dominant d'un individu adulte et 70% ou plus sont non-cultivés. La proportion d'espèces non-cultivées augmente de la naissance au grand âge et les Firmicutes sont tout particulièrement mal connues par la culture. La comparaison de la biodiversité du microbiote fécal dominant de plusieurs individus indique qu'il est pour une large part (80% des espèces) spécifique de l'hôte, mais que quelques espèces parmi les plus représentées sont néanmoins très conservées et constituent un noyau phylogénétique. Le microbiote intestinal est également remarquablement stable dans le temps et donc résistant à la modification en termes de composition. Il est aussi résilient suite à un stress modéré tel qu'un traitement antibiotique.

L'accès au microbiote présent au niveau du mucus intestinal relève de prélèvements invasifs ; il a été possible dans le cadre d'essais cliniques. Ce microbiote est composé d'une diversité d'espèces très conservée de l'iléon à l'anus pour un individu donné, contrairement au microbiote luminal qui varie en fonction de la localisation. L'hybridation in situ montre un complexe microbien associé au mucus, à la fois diversifié et dense, qui évoque une structure en biofilm.

La métagénomique est l'approche récente qui donne accès aux génomes de l'ensemble des microorganismes d'une niche écologique. Après extraction des populations microbiennes de leur environnement leur ADN est purifié puis soumis à un séquençage massif avec ou sans clonage préalable. Le répertoire complet de l'ensemble des gènes des microorganismes dominants, cultivables ou non, de l'intestin humain est ainsi en cours de caractérisation de même que l'ensemble des génomes de microorganismes associés à l'Homme, appelé Microbiome humain.

Les projets Européen MetaHIT (Metagenomics of the Human Intestinal Tract for Health) et ANR MicroObes (Microbiome intestinal humain dans l'Obésité et la transition nutritionnelle) contribuent très significativement à cette démarche et font partie des projets labellisés par l'IHMC (International Human Microbiome Consortium). Les premiers résultats soulignent l'existence d'un ensemble de génomes prévalents pouvant constituer un noyau métagénomique, même si la variabilité interindividuelle reste majeure au niveau métagénomique. Ils vont permettre d'avancer vers l'identification des caractéristiques génomiques redondantes du microbiote intestinal humain et de l'équilibre fonctionnel de l'intestin.

Une analyse au niveau métaprotéomique, concernant l'ensemble des protéines microbiennes de l'environnement intestinal dominant, montre un fort degré de conservation entre individus avec environ 50% des protéines bactériennes dominantes conservées entre deux individus.

Cette réévaluation à différents niveaux d'intégration ouvre la perspective de définir la situation normale ou « normobiose » et ainsi de mettre en évidence des déséquilibres de microbiote ou « dysbioses » associées à des pathologies de société telle que les maladies immunes, métaboliques

ou dégénératives. La comparaison du microbiote de sujets sains et de patients atteints de maladie de Crohn a montré que 20 à 30% des espèces bactériennes du microbiote fécal des patients étaient des espèces absentes du microbiote des sujets sains et que les patients, même en phase quiescente de la maladie, présentaient une dysbiose par rapport aux sujets sains. La proportion et la diversité d'espèces du groupe *Faecalibacterium prausnitzii*-*Clostridium leptum* des Firmicutes étaient réduites. Une étude ultérieure du microbiote du biofilm iléal chez des patients devant subir une résection iléo-caecale a montré une association entre une diminution de *Faecalibacterium prausnitzii*, bactérie majeure du phylum Firmicutes et un haut risque de récurrence postopératoire de la maladie de Crohn iléale à 6 mois. Cette observation a conduit à tester l'hypothèse que *F. prausnitzii* pouvait avoir des effets protecteurs vis à vis de la maladie de Crohn. Des études sur modèles de cultures cellulaires, sur cellules sanguines et sur animaux de laboratoire en conditions d'inflammation intestinale chimio-induite ont montré que *F. prausnitzii* a des effets anti inflammatoires à la fois in vitro et in vivo. Son action implique des métabolites sécrétés qui bloquent l'activation de la voie du NFκB et la production d'interleukine-8.

Un long processus de coévolution a conduit à une situation d'interaction mutualiste entre le microbiote intestinal et l'hôte. La régénération continue et l'activité proliférative de l'épithélium intestinal sont par exemple modulés par le microbiote ou ses métabolites. Une meilleure compréhension de la contribution du microbiote au bien-être et à la santé de l'hôte exige une caractérisation des signaux moléculaires bactériens effecteurs dans le dialogue microbiote-hôte. Au-delà du séquençage massif, l'approche métagénomique ouvre la possibilité d'une exploration fonctionnelle. Des clones métagénomiques porteurs de fragments de génomes de grande taille peuvent être soumis à une analyse fonctionnelle donnant accès à des ressources biologiques totalement inexplorées à ce jour et permettant d'étudier les mécanismes d'interaction, et notamment le dialogue entre bactéries et cellules humaines. Le criblage fonctionnel de banques de clones porteurs de larges fragments métagénomiques permet ainsi l'identification d'interactions bactéries-cellules à partir de ressources génomiques jamais explorées à ce jour. Ces approches permettent l'identification de gènes fonctionnels, de voies métaboliques complètes et de modulateurs de la prolifération cellulaire ou de la réponse immunitaire.

L'apport de bactéries commensales telle que *F. prausnitzii* ou l'utilisation de probiotiques qui permettraient de corriger la dysbiose dans la maladie de Crohn apparaissent comme des stratégies prometteuses dans l'accompagnement du traitement de cette maladie. Par extension, les probiotiques doivent pouvoir jouer un rôle majeur dans les contextes exigeant une modulation de l'inflammation, que sont par exemple l'allergie chez l'enfant, le syndrome métabolique chez l'adulte ou l'immuno-sénescence chez la personne âgée. Une connaissance fine des mécanismes d'interaction microorganisme-hôte, qu'une approche intégrée rend aujourd'hui accessible, va dans ce contexte permettre d'ouvrir des champs nouveaux d'applications nutritionnelles et pharmaceutiques.