

STRUCTURATION DE LA CULTUROMIQUE A INRAE VIA LE PROJET MicroWorld Discovery (MWD)

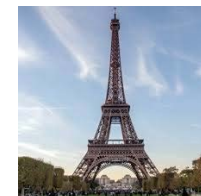
Philippe Langella, PhD

Head of the Laboratory of “Commensals and Probiotics-Host Interactions” (ProbiHôte Lab)
(<http://www.micalis.fr/Poles-et-Equipes/Pole-Ecosystemes/ProbiHote-Langella/>)

UMR 1319 INRA-AgroParisTech
MICALIS Institute, INRAE
(<http://www.micalis.fr/micalis/>)

78352 Jouy en Josas

FRANCE



Plan de ma présentation

Etat de l'art de la culturomique sur les biotopes humains et animaux à INRAE en mars 2020

Notre projet Equipex+ MicroWorldDiscovery (MWD) soumis en juin 2020

La Culturomique

Définition : Culture de micro-organismes avec des approches à haut débit pour augmenter le répertoire microbien d'un écosystème et atteindre les micro-organismes «non encore cultivés».

Terme proposé par Didier Raoult en 2012

Lagier JC, *et al*: **Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study.** *Clin Microbiol Infect* 2012, **18**(12):1185-1193.

Lagier JC *et al*: **Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics.** *Nat Microbiol* 2016, **1**:16203.

Lagier *et al*, 2018

mais le concept d'écologie microbienne existe depuis 2002

Connon SA, Giovannoni S, 2002. **High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates.** *AEM*, 68(8):3878-85

Analyse du biotope humain par le *workflow* culturomique

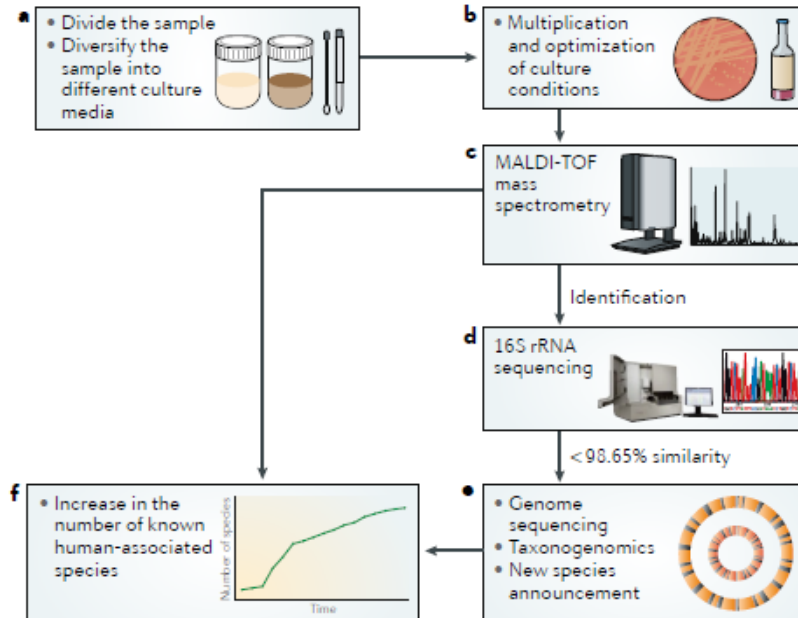


Fig. 2 | **The culturomic workflow.** Culturomics was originally designed to identify new bacterial species in the gut microbiota, but it has since been applied to other microbiota, such as the human vaginal and urinary microbiota. The first step of culturomics is to divide the sample and diversify the sample into different culture conditions (part a). The culture conditions were designed to suppress the culture of majority populations and to promote the growth of fastidious microorganisms at lower concentrations (part b). However, targeted culture conditions were used to recover specific taxa. An important feature of culturomics is the rapid (<1 hour) identification by MALDI-TOF mass spectrometry, which relies on the comparison of the protein mass spectra of the isolate with an upgradable database (part c). If identification fails, the isolate is subjected to 16S ribosomal RNA (rRNA) sequencing (part d). If there is <98.65% similarity to the closest official strain, the isolate could be a new species. The discovery of new taxa is confirmed by genome sequencing (part e), and taxonogenomics is used to formally describe the bacterium. All identification results are compared with a database that contains bacterial species recovered from humans. The identification of new species by culturomics has increased the repertoire of bacterial species associated with humans (part f).

(Lagier *et al*, 2012)

Enjeux scientifiques du domaine biotopes humain et animaux

Santé humaine : prévention et traitement de pathologies humaines grâce aux différentes composantes microbiennes de l'holobionte

Utilisation de microorganismes commensaux comme i) biothérapie, ii) solutions alternatives ou complémentaires aux antibiotiques; iii) lutte contre le portage des pathogènes; iv) maintien en bonne santé et v) détoxification des xénobiotiques

Durabilité de la production animale : santé animale avec enjeux similaires à la santé humaine (y compris les zoonoses), efficacité de la production, limitation des intrants et rejets et bien-être animal

Mieux connaître les interactions microorganismes-hôte au sein d'écosystèmes humains et animaux

Enjeux technologiques et juridiques du domaine biotopes humain et animaux

Enjeux liés à la culture :

L'anaérobiose, le haut débit, et la miniaturisation

Diversité des échantillons (humains et animaux) et des isolats microbiens

Approche systématique et/ou ciblée (enrichissement sur substrats spécifiques)

Culture en milieux complexes & synthétiques

Design de milieux de culture à façon à partir des données *in silico* de génomique et métagénomique (shotgun).

Développement d'approches en co-culture microorganismes et microorganismes/cellules pour faciliter la croissance

Micro-fluidique ; Cytométrie de flux en anaérobiose (tri cellulaire);

Les non-cultivables : « Genome up design » pour trouver les milieux ad hoc ou symbiotique ou syntrophique

Enjeux liés au phénotypage et génotypage des souches isolées :

identification par Maldi-Tof avec une bonne base de références ;

whole-genome sequencing ; métabolomique ?

Enjeux liés à la valorisation des isolats :

Conservation, stockage et distribution

Statut juridique des souches isolées

Les objectifs visés

Isolement et étude des microorganismes commensaux d'intérêt dont les rares

Comprendre les fonctions et interactions : validation d'hypothèses basées sur analyses *in silico* de données méta-omiques, nouveaux probiotiques et LBPs et compréhension des interactions avec l'hôte.

Identifier les fonctions de nouvelles molécules sur de nouveaux microorganismes ou consortia ;
Préserver la biodiversité.

Applications

Protection contre les agents infectieux

Métabolisme anaérobie des xénobiotiques (médicaments, toxines) et autres constituants alimentaires (polyphénols, gluten etc.) en lien avec la santé de l'Hôte

Résurrection de bactéries viables non cultivables ;
Optimiser l'efficacité métabolique des animaux

Validation de l'aspect causal dans les corrélations avec les phénotypes par l'inoculation des souches d'intérêt à des animaux (et voir si le phénotype est transféré)

Les dispositifs déjà existants

13 chambres anaérobies (9 Micalis, 1 GenPhyse, 3 MEDIS) et logistique pour la croissance en tubes de Hungate (Micalis, MEDIS).

Deux piqueurs de colonies en aérobiose (MGP)

Microfluidique en aérobiose (GenPhySe), mais abandonné au profit du robot piqueurs anaérobie.

Deux piqueurs de colonies en anaérobiose (GenPhySE)

Cytomètre-trieur en aérobiose

Expertise en analyse de données génomiques (avec MAIAGE)

Six fermenteurs de 500 mL (Fine) + un SHIME

20 fermenteurs (MEDIS) + Système digestifs artificiels (TIM + ARCOL)

De nouvelles souches isolées et séquencées de *F. prausnitzii*

frontiers
in Microbiology

ORIGINAL RESEARCH
published: 30 June 2017
doi: 10.3389/fmicb.2017.01226

OPEN ACCESS

Edited by:
Andrés Gomez-Zangne,
Center for Research and Development
in Food Cryobiology (CIDEA,
National Council for Scientific and
Technological Research
(CONICET)-Argentina-Capital,
Argentina

Reviewed by:
Mireia Lopez Siles,
University of Girona, Spain
Marie de los Angeles Semadri,
CONICET La Plata (CCT) and Instituto
de Ciencias de la Salud-UNLa,
Argentina

*Correspondence:
Philippe Langella
philippe.langella@inra.fr

[†]These authors have contributed

Functional Characterization of Novel *Faecalibacterium prausnitzii* Strains Isolated from Healthy Volunteers: A Step Forward in the Use of *F. prausnitzii* as a Next-Generation Probiotic

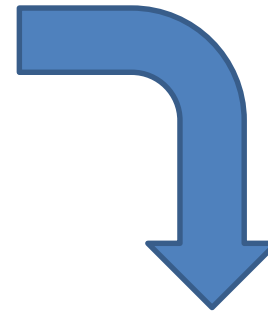
Rebeca Martín^{1†}, Sylvie Miquel^{1,2†}, Leandro Benevides^{1,3}, Chantal Bridonneau¹,
Véronique Robert¹, Sylvie Hudault¹, Florian Chain¹, Olivier Barboiu¹, Vasco Azevedo⁴,
Joan M. Chatot¹, Harry Sokol^{1,4,5}, Luis G. Bermúdez-Humarán¹, Muriel Thomas¹ and
Philippe Langella^{1*}

¹Comensals and Probiotics-Host Interactions Laboratory, Micalis Institute, Institut National de la Recherche Agronomique, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France, ²Université Clermont Auvergne, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 6002 Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, Clermont-Ferrand, France, ³Department of General Biology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁴AVANIR Team GUT Microbiota and Immunity Equipe de Recherche Labellisée (ERL), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1157/UMR17203, Faculté de Médecine Saint-Antoine, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France, ⁵Service de Gastroentérologie, Hôpital Saint-Antoine, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

(Martin *et al*, 2017)



Choix de notre souche
CNCM-4573



15 génomes séquencés

frontiers

New insights into the diversity of the genus *Faecalibacterium*

Leandro Benevides^{1,2}, Sriti Burman³, Rebeca Martín², Véronique Robert², Muriel THOMAS²,
Sylvie Miquel^{2,4}, Florian Chain², Harry Sokol^{2,5,6}, Luis Bermudez-Humarán², Mark Morrison³,
Philippe Langella², Vasco A. Azevedo¹, Jean-Marc Chatel², Siomar D. Soares⁷

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil, ²INRA Centre Jouy-en-Josas, France, ³The University of Queensland, Australia, ⁴Université Clermont Auvergne, France, ⁵Institut national de la santé et de la recherche médicale, France, ⁶Hôpital Saint-Antoine, France, ⁷Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Brazil

(Benevides *et al*, 2017)

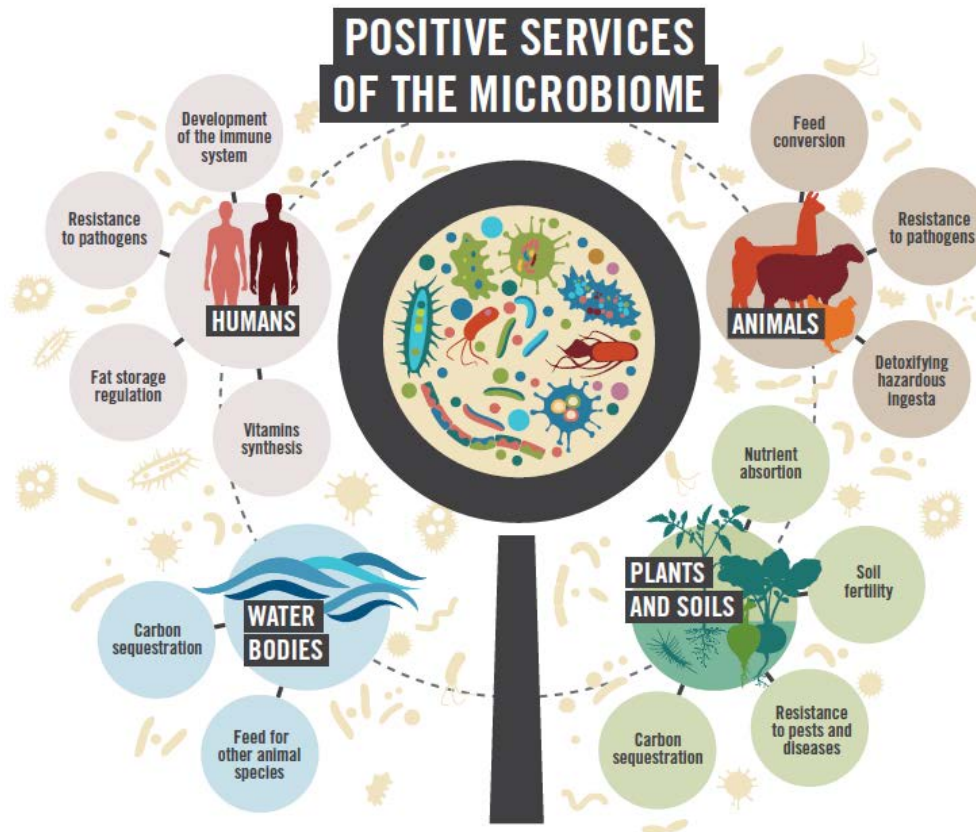
Notre vision sur ce qui serait nécessaire dans le domaine biotopes humain et animal

Mettre en place un réseau de plate-formes de culturomique avec du personnel permanent (en charge du MALDI TOF + le personnel pour faire tourner les équipements y compris les robots piqueurs + un spécialiste en physio anaérobie et un en métabolomique)

Créer un CIRMI dédié aux microorganismes anaérobies stricts ?

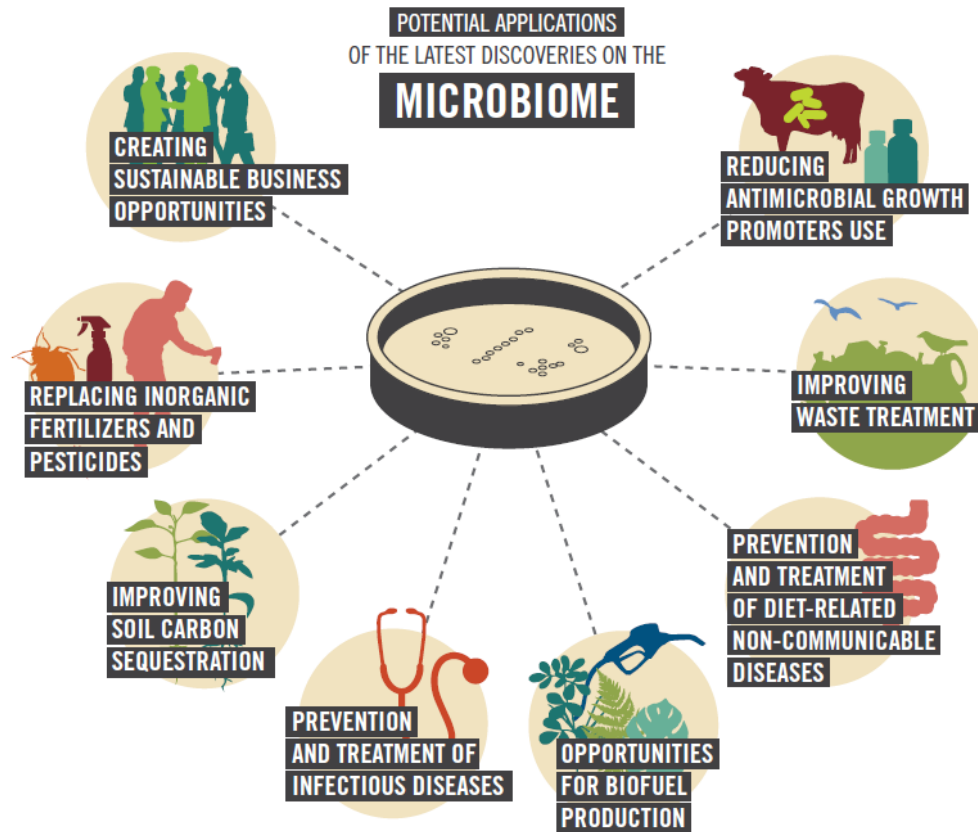
Cette problématique s'applique à d'autres écosystèmes au niveau INRAE

Application de la culturomique aux écosystèmes étudiés à INRAE ?



(Microbiome, the missing link, FAO, 2019)

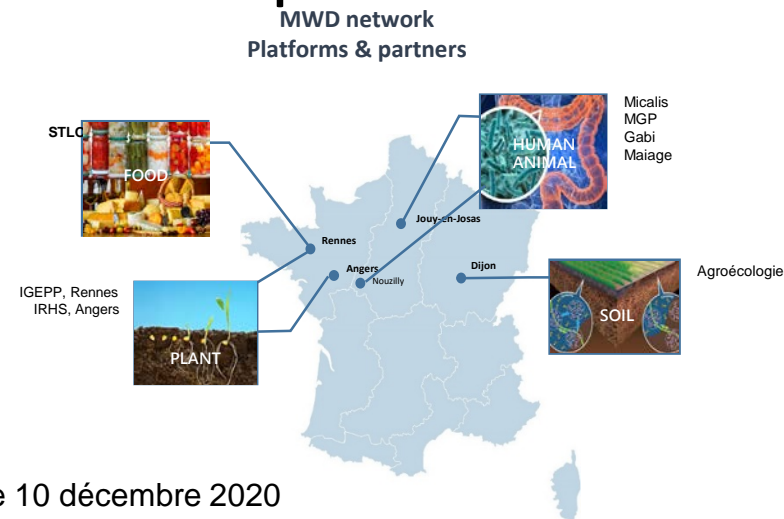
Les valorisations possibles de la culturomique appliquée aux écosystèmes étudiés à INRAE ?



(Microbiome, the missing link, FAO, 2019)

Projet Equipex+ AO PIA3: MicroWorld Discovery (MWD)

- Demande de la DG portée par Gilles Aumont et Sylvie Dequin en mars 2020
- **Le contexte :**
- **Les microbiotes** jouent un rôle central dans la santé et le fonctionnement durable des écosystèmes naturels et industriels.
- La majorité de ces micro-organismes reste à ce jour non cultivée et non caractérisée. La culturomique met en jeu des technologies innovantes pour isoler et caractériser à haut-débit cette « matière noire microbienne ».
- Le projet a donc consisté à répondre à l'AO Equipex+ du PIA3 :
- **Plateforme de culturomique des microbiotes Sol-Environnement / Plante / Aliment / Homme-Animal pour des applications écosystémiques et biotechnologiques : continuum unique à INRAE**



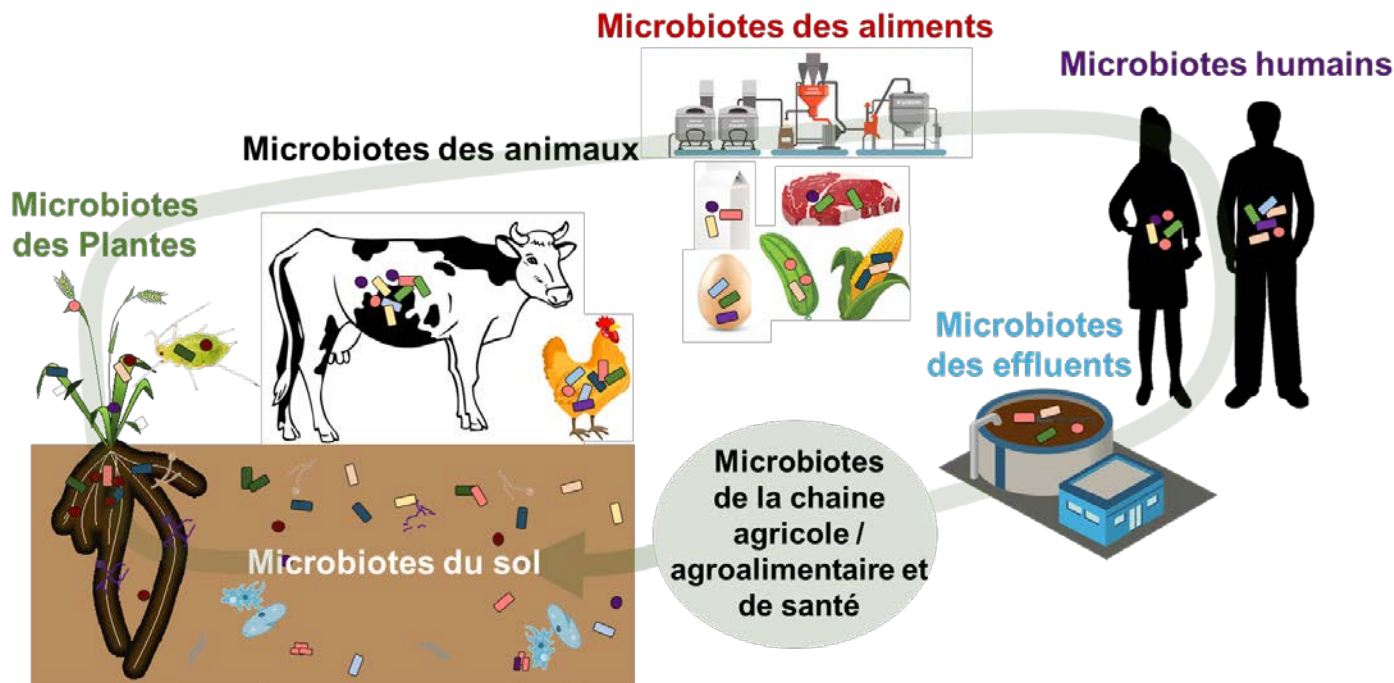
Projet Equipex+ AO PIA3: MicroWorld Discovery (MWD)

- Demande de la DG portée par Gilles Aumont et Sylvie Dequin
- Financement d'équipements d'une plateforme nationale de **culturomique à haut débit appliquée aux microbiotes des écosystèmes sol-environnement ; plante ; aliment et homme-animal** en complétant de l'existant pour dépasser les aspects descriptifs et analyses de corrélation, et renforcer le fonctionnel pour établir les liens de causalité
- **Porteurs niveau national** : Philippe Langella (**Coordinateur**, Micalis, Jouy), Pascale Serror (**Homme-animal**, Micalis, Jouy); Fabrice Martin-Laurent (**Sol-environnement** ; AgroEcologie, Dijon), Christophe Mougel (**Plante**, IGEPP, Rennes), Yves Le Loir (**Aliment**, STLO, Rennes), Michel-Yves Mistou (**CIRM/MAIAGE**, Jouy en Josas) et Emmanuelle Maguin (chargée de mission Microbiome).
- **Soumission** : 1^{ère} phase 19 juin 2020 à 11h
- **Réponse de la 1^{ère} phase** : fin décembre 2020
- **Financement** : 8 ans (~ 2022-2030)



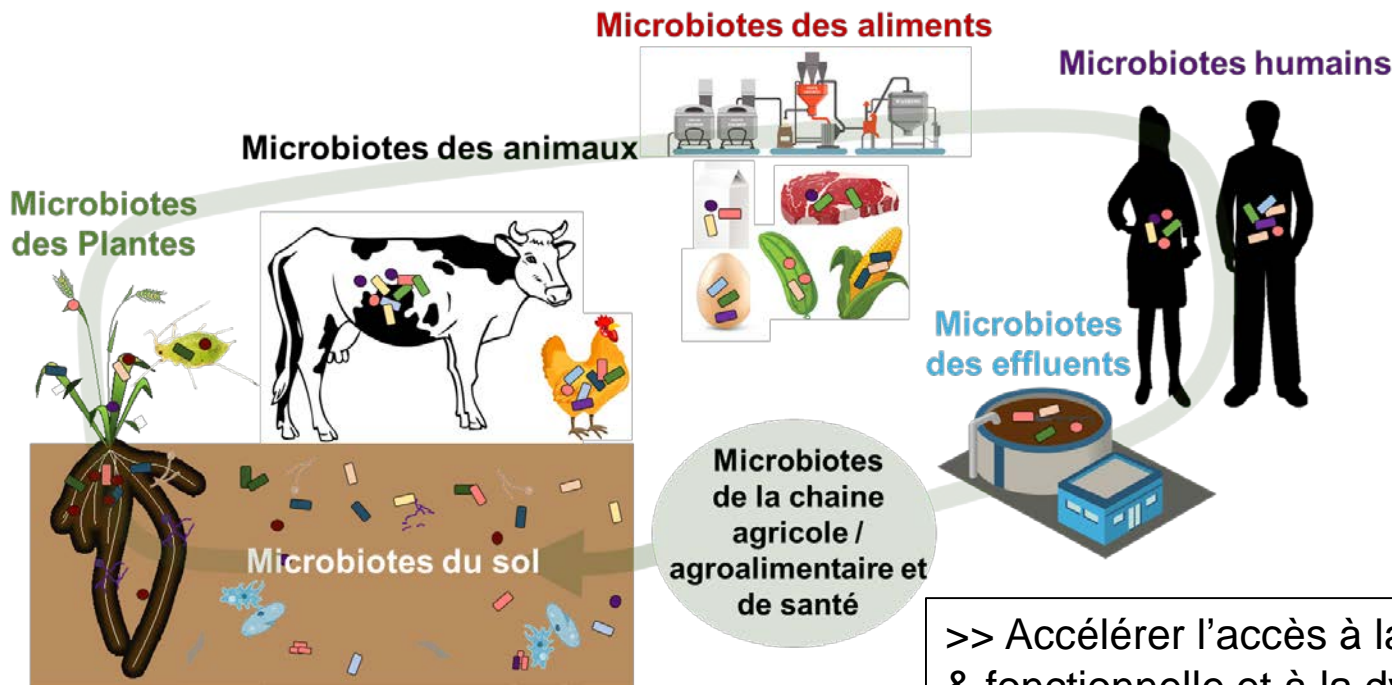
Les ambitions de MicroWorld Discovery (MWD)

- Se positionner au niveau national en complétant les dispositifs existants dans le domaine de la recherche sur les écosystèmes microbiens pour dépasser les aspects descriptifs et analyses de corrélation, et renforcer le fonctionnel pour établir les liens de causalité.
- Développer des techniques culturales et analytiques permettant d'isoler, identifier et caractériser à haut débit un répertoire de microorganismes (archées, bactéries, champignons/levures et oomycètes) isolés à partir des quatre écosystèmes sol/environnement, plante, aliment, homme/animal qui constituent un continuum unique du collectif scientifique INRAE et de ses partenaires.



Les ambitions de MicroWorld Discovery (MWD)

- Se positionner au niveau national en complétant les dispositifs existants dans le domaine de la recherche sur les écosystèmes microbiens pour dépasser les aspects descriptifs et analyses de corrélation, et renforcer le fonctionnel pour établir les liens de causalité.
- Développer des techniques culturales et analytiques permettant d'isoler, identifier et caractériser à haut débit un répertoire de microorganismes (archées, bactéries, champignons/levures et oomycètes) isolés à partir des quatre écosystèmes sol/environnement, plante, aliment, homme/animal qui constituent un continuum unique du collectif scientifique INRAE et de ses partenaires.



>> Accélérer l'accès à la diversité taxonomique & fonctionnelle et à la dynamique des **microbiotes** de « la fourche à la fourchette »

Le workflow MWD

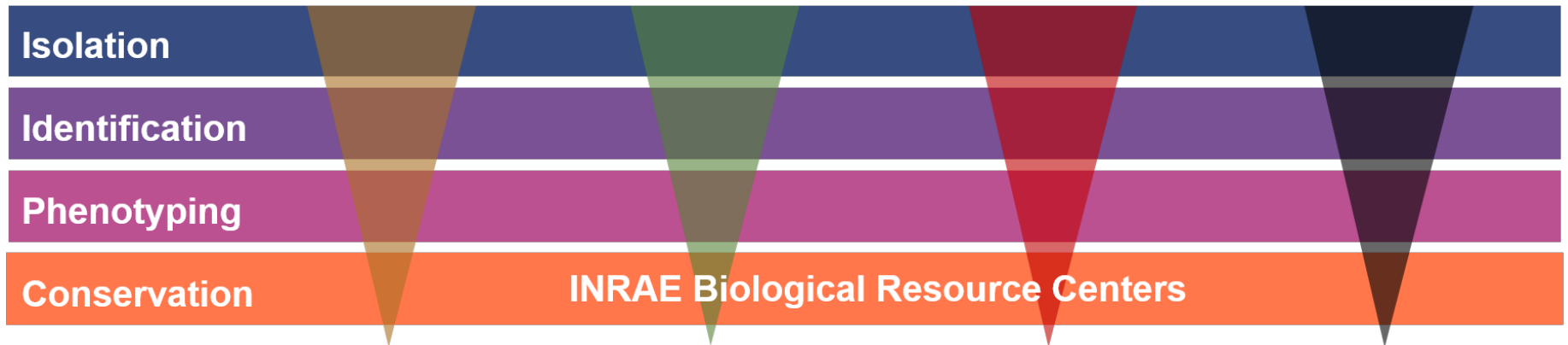
MicroWorld Discovery : Integrative Culturomic Approach

Soil / Environment

Plant

Food

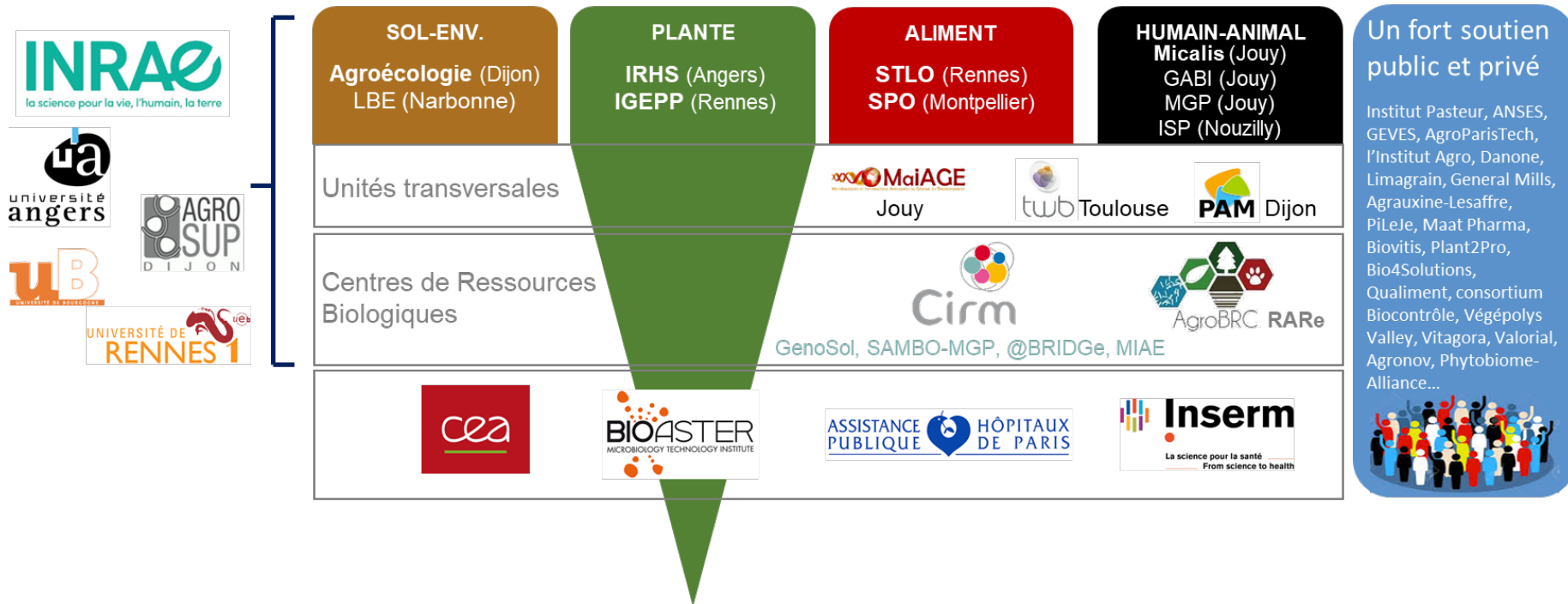
Animal / Human



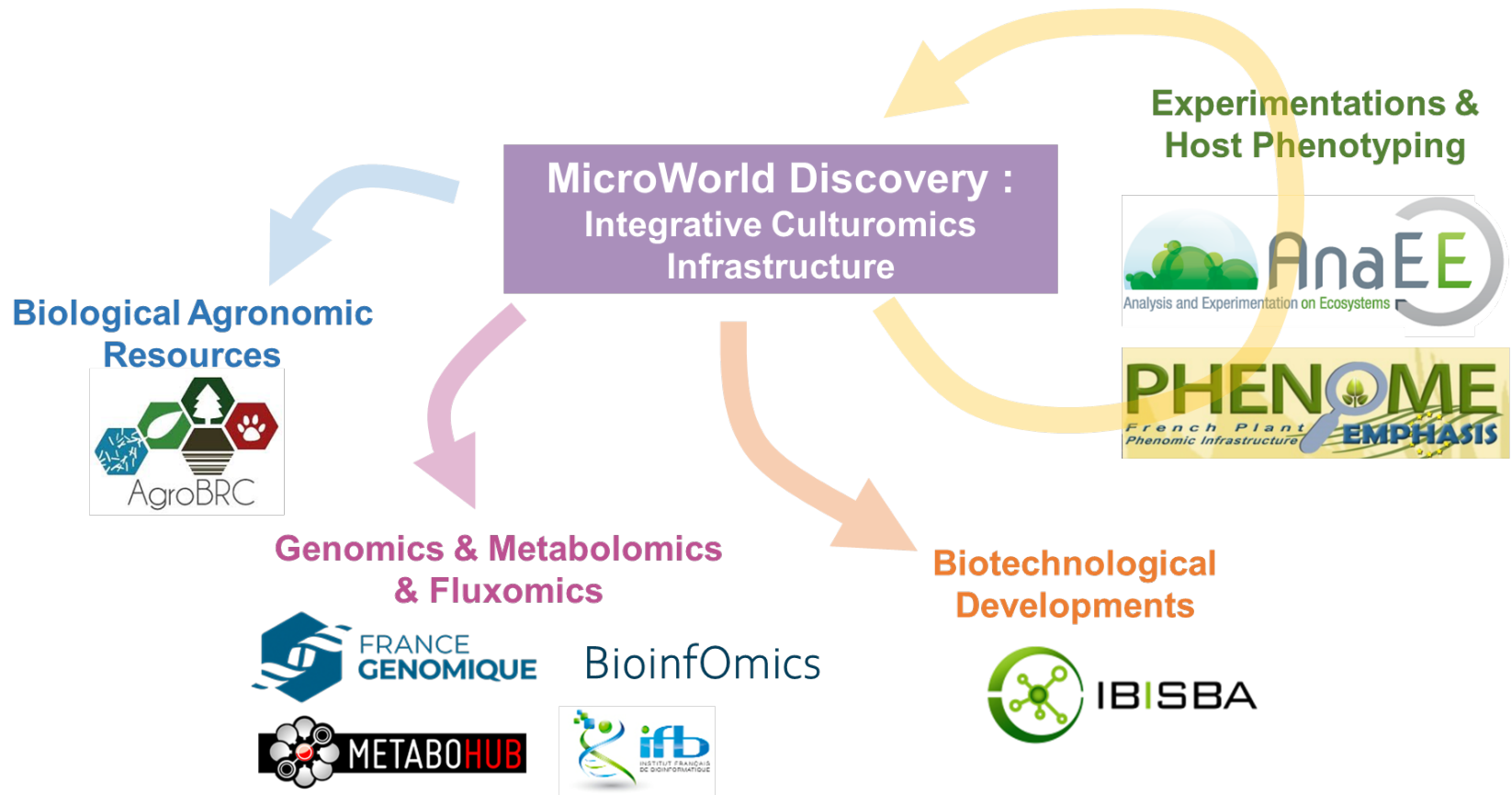
Innovation
Microbial-based Biotechnological Solutions

MWD, un projet structurant

9 partenaires, 15 unités de Recherche, 6 départements
INRAE, demande de financement de 14 M€



MWD, un projet connecté



Des équipements très innovants pour la mise en œuvre de MWD

Innovative Equipments for High-Throughput Microbial Culturomics

Isolation

Microarrays

Reverse genomics chips

Diffusion chambers & i-

Single Cell picking

Fluorescence activated cell sorting

Automated colony imaging & picking

Identification

Proteomics
MALDI-TOF MS

Genomics
High-throughput sequencing

Phylopeptidomics

Phenotyping

Automated SynCom Reconstruction

SynCom Screening by
Millifluidics

Biochemical & Immunoassays

High-throughput Growth & Metabolic profiling

Conservation

High-throughput Biobanking

Data Management System

Sterilization
Sample Prep
Incubators

Support Equipments

Biosafety Cabinets
Safety Level 2 Labs
Fermenters
Anaerobic Enclosures

Adapted Facilities

Sequencing & Metabolomics platforms

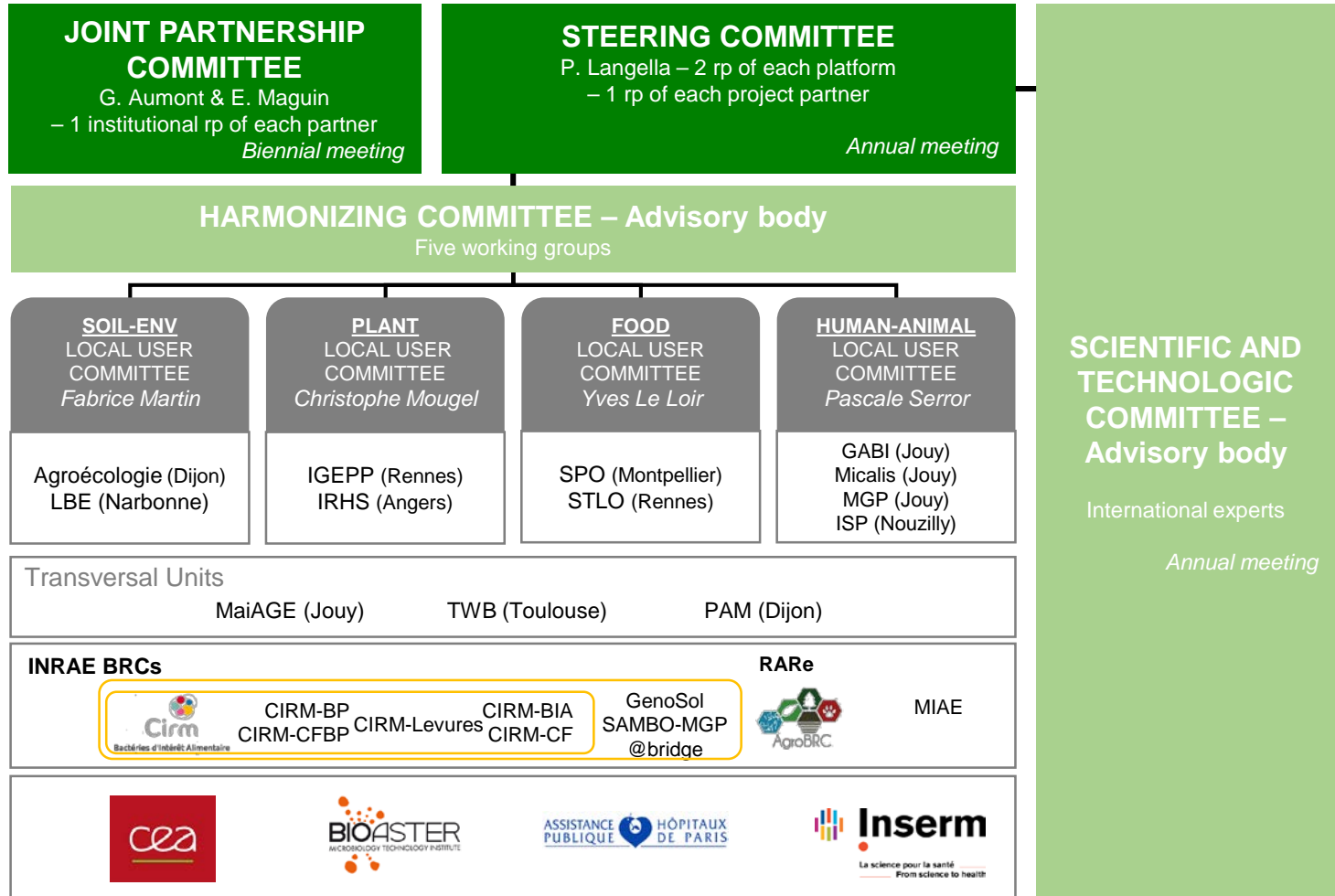
Experimentation & Host Phenotyping platforms

CIRM Biological Resource centers

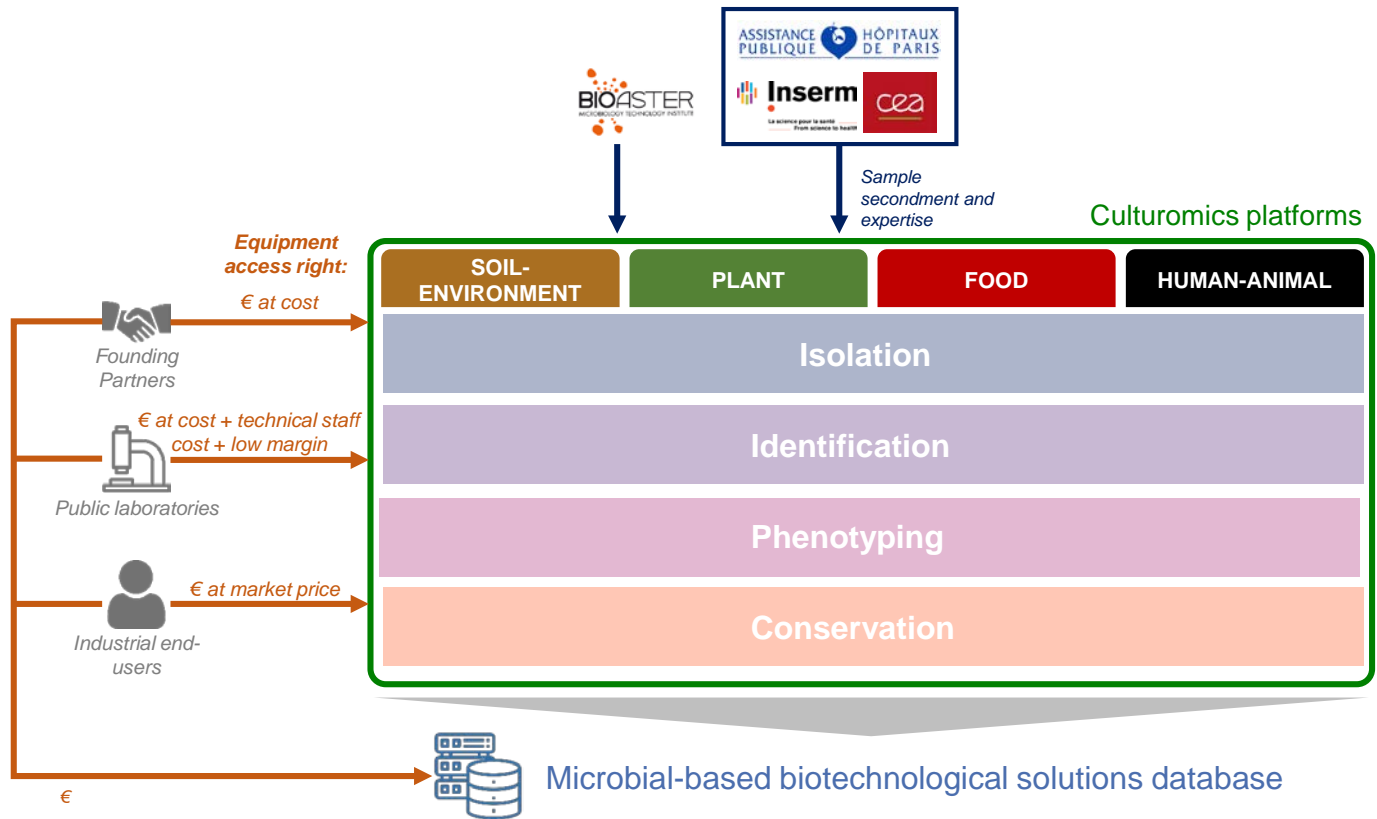
Existing Infrastructures

MicroWorld Discovery Project

Le management proposé de MWD



Le *business model* de MWD

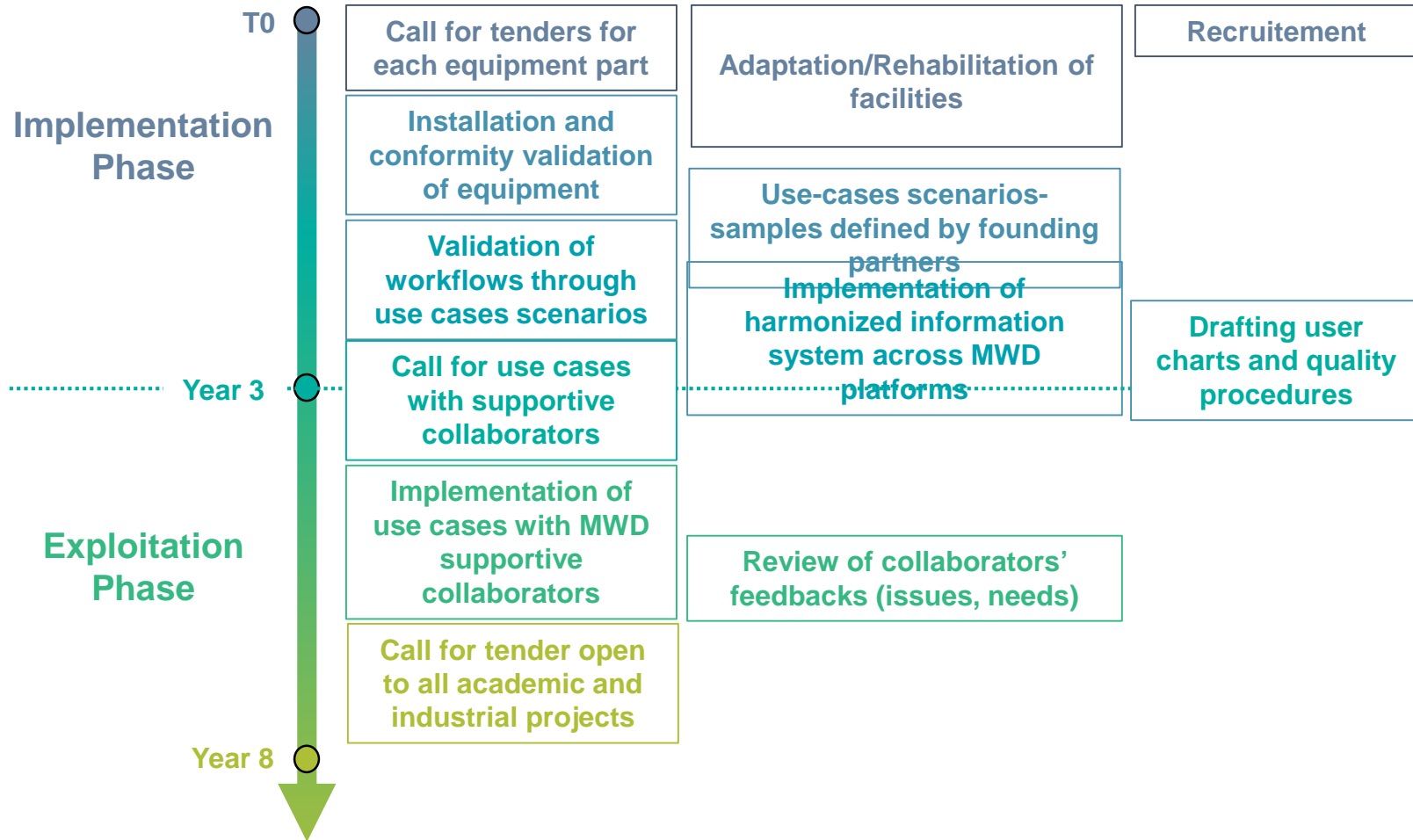


Valorisation projects across the whole Agri/Food value chain



La mise en œuvre prévue de MWD

MWD General Management Plan



Merci pour votre attention et un immense merci à la dream team MWD !!

Sol : Fabrice



Plantes : Marie, Marion et Christophe



**Homme-animal :
Pascale**



**Aliment :
Yves Le Loir**



CIRM : Michel-Yves



Emmanuelle, M^{me} Microbiote



Gilles, Mr Infrastructures

