



Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



MICROBIOTE NORMAL DU TRACTUS INTESTINAL

Le microbiote intestinal humain ☆

The human intestinal microbiota

J. Doré *, G. Corthier

INRA, MICALIS ex-UEPSD, Domaine de Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas, France

Résumé Le microbiote intestinal humain constitue un écosystème complexe, qui est maintenant bien reconnu pour son impact sur la santé et le bien-être de l'Homme. Il contribue à la maturation du système immunitaire et assure une barrière directe contre la colonisation par des agents pathogènes. Son implication possible dans les maladies des sociétés modernes, dont la prévalence est en augmentation, a été décrite. Ces maladies sont notamment les allergies, les maladies inflammatoires de l'intestin et, peut-être, des troubles métaboliques et dégénératifs. L'analyse de la composition moléculaire du microbiote intestinal humain indique des variations interindividuelles marquées, qui pourraient sembler paradoxales étant donné le haut degré de conservation des fonctions majeures du microbiote intestinal, telles que la digestion anaérobie des fibres alimentaires. Nous avons caractérisé un noyau phylogénétique au sein du microbiote intestinal humain, en termes de composition, c'est-à-dire un ensemble d'espèces conservées qui pourraient être responsables des fonctions conservées majeures. Sur la base d'évaluations moléculaires indépendantes des cultures, les connaissances actuelles permettent de définir les critères qualifiant l'état normal du microbiote intestinal humain, ou « normobiose ». Cela permet en outre l'identification d'écarts spécifiques par rapport à la normobiose, c'est-à-dire d'une dysbiose, dans les maladies immunitaires, métaboliques ou dégénératives. La maladie de Crohn notamment, qui est une maladie inflammatoire de l'intestin dont l'étiologie est encore inconnue, est associée à une dysbiose intestinale avec une plus faible représentation du groupe *Clostridium leptum* parmi le phylum des Firmicutes. Nous avons en outre montré que l'espèce bactérienne *Faecalibacterium prausnitzii* possède des propriétés anti-inflammatoires *in vitro* et dans des modèles animaux ; cela pourrait expliquer sa capacité, lorsqu'elle est détectée dans le microbiote associé à la muqueuse de patients *in vivo*, à protéger ces patients contre une récurrence postopératoire des signes endoscopiques d'inflammation 6 mois après la résection chirurgicale de la région iléocœcale de l'intestin. En confirmant le rôle majeur joué par le microbiote dans les troubles en relation avec l'intestin, qui sont en particulier associés à une rupture de l'homéostasie, nous procédons actuellement à des analyses métagénomiques fonctionnelles à haut débit dans le but d'identifier les molécules signal et les mécanismes d'interaction bactérie-hôte. Conjointement avec la description de haute résolution du métagénome intestinal

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : joel.dore@jouy.inra.fr (J. Doré)

☆ La version originale anglaise de cet article a été publiée dans le Suppl. 1. Pour citer cet article : Doré J, Corthier G. The human intestinal microbiota. *Gastroenterol Clin Biol* 2010;34:S7–S15.

humain, ainsi qu'avec des explorations des protéines et métabolites environnementaux, ces observations nous permettront de mieux comprendre les rôles fonctionnels joués par les bactéries dans l'entretien de la santé et du bien-être chez l'Homme. De nouvelles perspectives s'ouvriront alors pour la surveillance et la mise au point de stratégies de modulation du microbiote pour l'optimisation de la santé.

© 2010 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés

Summary The human intestinal microbiota constitutes a complex ecosystem which is now well recognized for its impact on human health and well-being. It contributes to maturation of the immune system and provides a direct barrier against colonization by pathogens. Its possible implication in diseases of modern societies, currently increasing in prevalence, has been reported. These include allergies, inflammatory bowel diseases and possibly metabolic and degenerative disorders. The analysis of the molecular composition of the human intestinal microbiota indicates marked inter-individual variations which may seem paradoxical considering the high degree of conservation of major functions of the intestinal microbiota such as anaerobic digestion of alimentary fibres. We have characterized a phylogenetic core within the human intestinal microbiota, in terms of composition, i.e., a set of conserved species that could be responsible for major conserved functions. Based on culture-independent molecular assessments, current knowledge enables a definition of criteria qualifying the normal state of the human intestinal microbiota that we call normobiosis. This further enables the identification of specific deviations from normobiosis, i.e., dysbiosis in immune, metabolic or degenerative diseases. Notably, Crohn's disease, an inflammatory bowel disease of yet unknown aetiology, is associated with intestinal dysbiosis with a lower representation of the *Clostridium leptum* group among the Firmicutes phylum. We further showed that the bacterial species *Faecalibacterium prausnitzii* exerts anti-inflammatory properties *in vitro* and in animal models; this could explain its ability, when detected in the mucosa-associated microbiota of patients *in vivo*, to protect patients from post-operative recurrence of endoscopic signs of inflammation 6 months after surgical resection of the ileocecal region of the gut. By confirming the major role of the microbiota in bowel-related disorders, which are especially associated with a disruption of homeostasis, we are currently applying high throughput functional metagenomic screens in order to identify signal molecules and mechanisms of bacteria-host cross-talk. Together with the high resolution description of the human intestinal metagenome, as well as explorations of environmental proteins and metabolites, these observations will further our understanding of the functional roles bacteria play in the maintenance of health and well-being in humans. It will open new perspectives for the monitoring and design of strategies for modulating the microbiota for health.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction

Dès son tout premier instant, des microorganismes colonisent le nouveau-né et établissent une relation mutuelle avec leur hôte, qui durera toute sa vie et jouera un rôle essentiel dans sa santé et son bien-être. Pourtant, les microorganismes qui nous entourent sont encore, le plus souvent, perçus comme des envahisseurs potentiels dangereux que nous devons être prêts à combattre. Cette perception curieusement négative contraste avec leur utilité reconnue pour l'environnement, l'agriculture, l'industrie et l'humanité.

Depuis des millions d'années, les Hommes, et les animaux avant eux, évoluent conjointement avec les microorganismes, conduisant à l'établissement d'une adaptation mutuellement bénéfique. Bien que les mécanismes précis et la dynamique temporelle ne soient pas encore connus,

l'hôte développe une tolérance envers les bactéries non pathogènes qui colonisent les surfaces muqueuses et la peau et, en retour, les bactéries contrôlent le développement et le maintien de nombreuses fonctions essentielles de leur hôte. Le microbiote intestinal contribue à la bioconversion des substances non absorbées présentes dans les aliments dans les parties supérieures du tractus digestif. La colonisation par des microorganismes commensaux est essentielle au développement immunitaire [1-4]. En outre, le microbiote joue un rôle direct dans la prévention de la colonisation, en maintenant les populations d'agents pathogènes à un niveau qui les empêche d'exprimer une virulence [5-7]. Plus récemment, un rôle potentiel du microbiote intestinal dans la régulation du stockage des lipides a été décrit chez la souris [8] et son existence chez l'Homme a été suggérée [9, 10].

Il y a peu, notre vision du microbiote intestinal humain a été profondément revisitée avec la mise en œuvre d'outils moléculaires, avec une approche des marqueurs génétiques basée sur l'utilisation de l'ARN ribosomal comme marqueur phylogénétique. Les grandes étapes du développement du microbiote complexe associé à l'Homme sont présentées dans le chapitre approprié de cette monographie. Nous fournissons ici une vue actualisée de la composition et de la stabilité du microbiote intestinal. Nous décrivons ensuite ses rôles bénéfiques et illustrerons l'association entre dysbiose du microbiote et maladie. Enfin, nous fournissons quelques perspectives concernant l'application de l'exploration métagénomique des fonctions du microbiote intestinal humain dominant.

Composition du microbiote intestinal humain

Il est aujourd'hui accepté que le tractus digestif humain, connu comme étant le microbiote, de chaque individu, est constitué de centaines d'espèces. Les densités des populations microbiennes dans ce consortium bactérien complexe atteignent leurs valeurs maximales dans le côlon, avec 10^{11} bactéries par gramme de contenu. Toutefois, il n'existe pas de description approfondie de toutes les bactéries intestinales, pour deux raisons principales :

La caractérisation traditionnelle, basée sur la réalisation de cultures [11-13], ne peut prendre en compte qu'environ 30 % au maximum des microorganismes pouvant être observés et énumérés au microscope.

La diversité mondiale des espèces de bactéries intestinales commensales serait immense. En la matière, l'utilisation d'outils moléculaires a indiqué que la majorité des espèces bactériennes dominantes observées dans le microbiote fécal d'un individu (environ 80 %) est spécifique de cet individu [14-16].

Si la diversité des espèces du microbiote intestinal dominant fournit une empreinte fécale essentiellement spécifique de l'individu, la composition des taxons (genres et/ou grands groupes phylogénétiques) montre les constituants constants, que l'on trouve chez tous les individus. Certains de ces taxons sont connus depuis longtemps et représentés par de nombreuses souches de collection ; d'autres n'ont été mis en évidence que récemment par des approches moléculaires et n'ont pas encore été mis en culture. Les genres cultivables du microbiote fécal dominant des adultes sont *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Clostridium* et *Bifidobacterium* [13, 17]. La prise en compte des microorganismes non cultivables a affiné cette vision et l'a placée dans un cadre phylogénétique. Le phylum des Firmicutes est toujours fortement représenté. Il comprend les *Eubacterium rectale* - *Clostridium coccoïdes*, souvent les plus représentés (14 à 31 % des bactéries totales selon les études) [18-22]. Il est constitué d'espèces appartenant aux genres *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Butyrivibrio*. Le phylum des Firmicutes comprend également le groupe *Clostridium leptum* avec les espèces *Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus albus* et *R. flavefaciens* ; ce groupe est également très souvent dominant (16 à 22 % en moyenne) [20, 23]. Les Bacteroidetes sont représentés par des genres liés à *Bacteroides*. Ils sont toujours présents et

partagent la dominance avec les groupes indiqués ci-dessus (9 à 42 % des bactéries totales en moyenne). Le phylum des Actinobacteria est moins systématiquement détecté comme dominant, mais il représente un petit pourcentage des bactéries totales. Il comprend les bifidobactéries (0,7 à 10 %) et les bactéries du groupe *Collinsella-Atopobium* (0,3 à 3,7 % en moyenne) [21, 24]. Les entérobactéries sont plus rarement observées dans les deux logarithmes supérieurs de la population du microbiote fécal (0,4 à 1 %), comme c'est également le cas des lactobacilles et des streptocoques (2 %) [23]. On trouve également, occasionnellement, des espèces liées à *Clostridium ramosum*, *Eubacterium cylindroides*, *Phascolarctobacterium*, *Verrucomicrobium*, *Sporomusa*, *Selenomonas* ou *Veillonella*.

Les caractères compositionnels hautement conservés des groupes phylogénétiques et des phylums d'une part, et la spécificité des espèces pour un sujet d'autre part, suggèrent qu'il existe, pour des raisons fonctionnelles, un certain degré de redondance entre les espèces, et que des niveaux différents de résolution fournissent des éléments d'information complémentaires.

Enfin, les espèces bactériennes observées sont strictement associées à l'écosystème intestinal. Ceci est le résultat d'une longue coévolution avec l'hôte [9], qui a été confirmée par de récentes études sur l'association croisée du microbiote de/avec différents hôtes [25].

À présent, la réévaluation phylogénétique du microbiote intestinal humain est essentiellement limitée à la fraction dominante et nos connaissances des bactéries subdominantes, c'est-à-dire présentes à moins de 10^8 par gramme de selles, sont peut-être incomplètes et restent limitées aux isolats cultivables. La capacité à isoler et à faire croître des microorganismes *in vitro* demeure une étape clé de l'acquisition de connaissances, en particulier par le fait que la phylogénie ne fournit pas d'informations sur l'activité *in situ* des microbes. D'un point de vue plus ciblé, l'évaluation de la contribution des archéobactéries ou des phages, qui pourrait être très importante en termes de populations, reste anecdotique jusqu'à maintenant.

Colonisation de l'intestin humain

Tout microorganisme de l'environnement, d'un autre Homme ou d'un animal environnant, peut en principe conduire à une colonisation. Il sera néanmoins confronté à une compétition avec d'autres microorganismes et, peu après la naissance, avec une communauté complexe dont la fonction principale est un effet barrière, c'est-à-dire la capacité à empêcher la colonisation d'espèces non établies.

Le fœtus des mammifères se développe *in utero* dans un environnement stérile et il est bien accepté que la colonisation débute au cours de la naissance. Les surfaces muqueuses stériles (digestives, urogénitales, naso-buccales et respiratoires, ainsi que la peau) constituent un ensemble de niches écologiques qui sont très favorables à la colonisation microbienne. En l'absence des mécanismes immunologiques sophistiqués de l'adulte, le tractus digestif du nouveau-né est un environnement particulièrement permissif, dans lequel les niveaux de population ou colonisateurs précoces atteignent rapidement des taux de 10^{11} bactéries par gramme de selles. La colonisation suit un

schéma assez organisé, placé sous le contrôle de facteurs exogènes et endogènes. Les facteurs exogènes incluent l'exposition à des microorganismes d'origine maternelle (fécaux, vaginaux et cutanés) et environnementale, mais également issus de l'alimentation et parfois d'une antibiothérapie susceptible d'induire des perturbations significatives. Un petit nombre d'études récentes a indiqué que le lait maternel pourrait également être un vecteur de microorganismes de la mère à l'enfant. Même lorsqu'il est recueilli dans des conditions stériles, le lait maternel peut contenir des bactéries vivantes et cultivables [26], susceptibles d'être transférées au nourrisson par l'allaitement [27, 28]. Les facteurs exogènes incluent plusieurs sécrétions du tractus digestif, mais également des produits issus des premiers microorganismes colonisateurs, qui conditionnent globalement les caractéristiques physicochimiques de l'écosystème. Les bactéries anaérobies qui dominent dans le microbiote intestinal adulte font partie des premiers microorganismes rencontrés après accouchement par voie basse. Elles se développeront néanmoins et deviendront dominantes dans l'intestin, suivies de bactéries anaérobies facultatives qui prépareront l'écosystème en consommant l'oxygène comme source d'énergie privilégiée. Des travaux récents ont indiqué que les espèces anaérobies dominantes modifient leur métabolisme après le sevrage et la modification de l'exposition alimentaire qui en découle [29]. Cette première succession d'espèces survient au cours des toutes premières heures suivant la naissance (Fig. 1). Des relations antagonistes et synergistes gouvernent ensuite la succession des espèces dominantes, conduisant à l'âge d'environ 2 ans à un microbiote fonctionnellement stable [30]. Au final, les bactéries anaérobies seront environ mille fois plus nombreuses que les bactéries anaérobies facultatives.

L'hygiène à la naissance et au cours des premiers instants de la vie influencera de manière importante la dynamique de la colonisation. Il apparaît aujourd'hui clairement que la colonisation par les espèces commensales colonisatrices précoces habituelles, telles que *E. coli*, est retardée dans les pays industrialisés par rapport au passé (de quelques jours à six mois) et par rapport aux pays en développement, en raison très probablement des conditions d'hygiène appliquées [31, 32]. Les bactéries couramment associées au microbiote cutané pourraient donc temporairement faire partie du microbiote intestinal dominant [33]. La naissance par césarienne, comparativement à l'accouchement par voie basse, conduit le plus souvent à une acquisition retardée des groupes microbiens dominants habituels et à la présence fréquente de bactéries environnementales.

Le lieu géographique de la naissance peut avoir un impact sur le développement du microbiote précoce. Si la comparaison des microbiotes adultes n'indique pas de grande différence d'un pays d'Europe occidentale à un autre, nous avons récemment observé un gradient, du nord vers le sud, de la composition du microbiote fécal de nourrissons âgés de 6 semaines [34] ; ainsi, *Bifidobacterium* est un colonisateur dominant dans le nord (Suède et Écosse), tandis que *Bacteroides* est dominant au sein d'un microbiote caractérisé par une diversification précoce dans le sud (Italie et Espagne) (Fig. 2).

Des questions majeures demeurent en ce qui concerne le processus de développement du microbiote après la naissance. Par exemple, le concept de « fenêtre de permissivité » transitoire, permettant potentiellement à un quelconque microorganisme rencontré de devenir un constituant dominant du microbiote adulte, doit encore être étudié et la durée d'une telle période de permissivité est totalement inconnue.

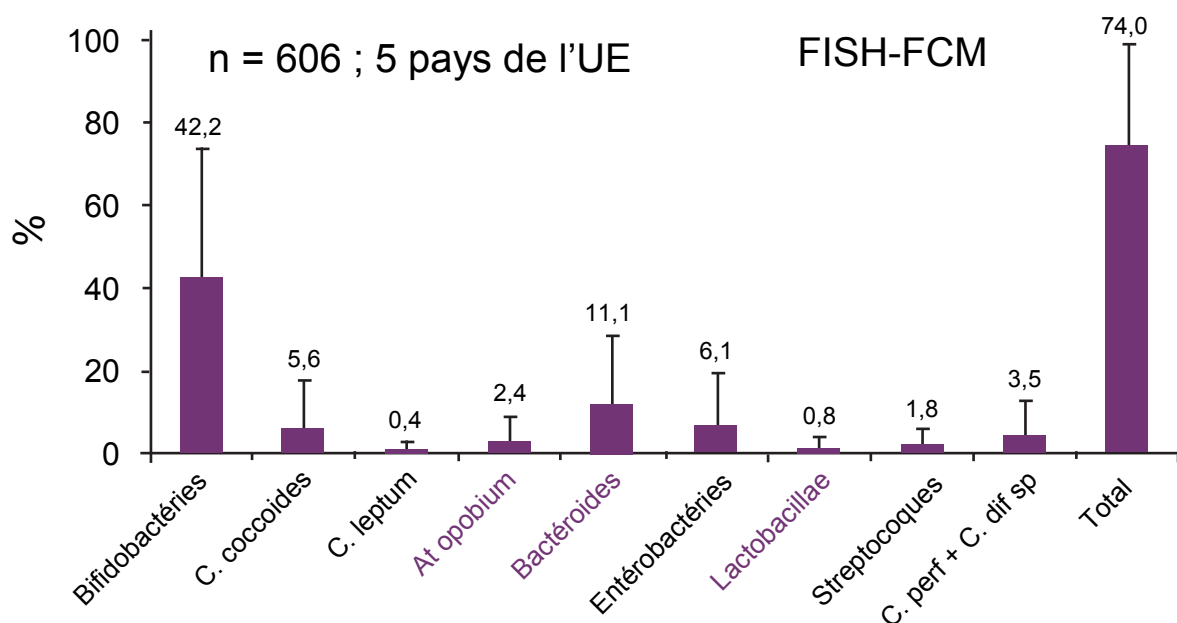


Figure 1 Microbiote fécal de nourrissons européens âgés de 6 semaines. Le microbiote fécal des nourrissons diffère de celui des adultes jusqu'à la 2e année de vie. Le genre *Bifidobacterium* est le plus représenté ; *Bacteroides* et les genres associés sont des colonisateurs précoces, après les entérobactéries. Les groupes phylogénétiques de l'adulte *C. coccoides* et *C. leptum* ne sont pas « encore » dominants [34].

Homéostasie du microbiote intestinal

La dynamique et l'homéostasie du microbiote intestinal pourraient être considérées dans le temps (pour n'importe quel individu donné) et dans l'espace, c'est-à-dire entre individus ou compartiments intestinaux. La composition globale de la communauté microbienne intestinale dominante semble constante entre individus et dans le temps. Les mêmes phylums majeurs sont présents, avec des proportions qui varient entre individus mais, le plus probablement, demeurent au sein du même équivalent d'unités logarithmiques en termes de population. La diversité des espèces dominantes apparaît remarquablement stable dans le temps pour un individu donné d'un jour à l'autre comme à travers les années [22, 35, 36], tandis qu'une large fraction des espèces dominantes apparaît spécifique du sujet. En ce qui concerne les souches, la stabilité est nettement moins claire et dépendra du sujet [37, 38]. Par conséquent, la stabilité observée dans les groupes et les espèces dissimulerait un taux important de renouvellement au niveau des souches. La plasticité génomique pourrait en réalité entrer en jeu. Il a également été montré que la diversité des espèces dans les groupes subdominants, par exemple *Lactobacillus*, est nettement moins stable dans le temps que celle des groupes dominants [36] et que la stabilité des communautés est supérieure dans le côlon comparativement à l'iléon. La possibilité pour les bactéries lactiques apportées par l'ingestion d'aliments fermentés de survivre pendant le transit doit également être envisagée, conduisant à leur passage transitoire dominant dans l'intestin grêle et le côlon.

Par définition, un microorganisme qui colonise une niche donnée persistera et se multipliera sans nécessiter de

réinoculation. Pour un individu, des modifications du microbiote intestinal pourraient venir soit de la colonisation par des microorganismes exogènes, soit d'une modulation des niveaux de population des bactéries commensales. Dans la plupart des cas, elles seront essentiellement la conséquence de relais de dominance en réponse à des facteurs modulant les niches écologiques. De nombreux facteurs peuvent avoir une incidence sur la stabilité des communautés microbiennes, parmi lesquels le temps de transit, le pH, la qualité et la quantité de substrats exogènes et de mucines endogènes. Bien que les communautés microbiennes semblent prêtes à faire face aux modifications du contexte écologique, il semble difficile d'induire des altérations durables des populations dominantes établies, du moins en termes de composition. De nombreuses observations illustrent par conséquent la capacité du microbiote intestinal dominant à résister aux modifications. L'administration d'une souche allochtone comme un probiotique ou d'un substrat exogène non absorbable comme un prébiotique conduit souvent à des modifications transitoires de l'équilibre microbien. Même un stress majeur, comme l'administration d'un antibiotique, peut être suivi du retour de la communauté à son profil initial d'espèces dominantes en un mois environ [39, 40]. Cette capacité à récupérer sa constitution initiale après un stress, connue sous le nom de résilience, suggère une adaptation finement réglée du microbiote à l'intestin et même à l'hôte qui l'héberge. Cela peut être rapproché de l'observation selon laquelle les communautés microbiennes fécales de jumeaux monozygotes ont un profil plus étroitement lié, de manière significative, par comparaison avec celles d'individus n'ayant aucun lien, ce qui suggère que le génotype pourrait jouer un rôle dans le développement et la structuration des populations bactériennes intestinales.

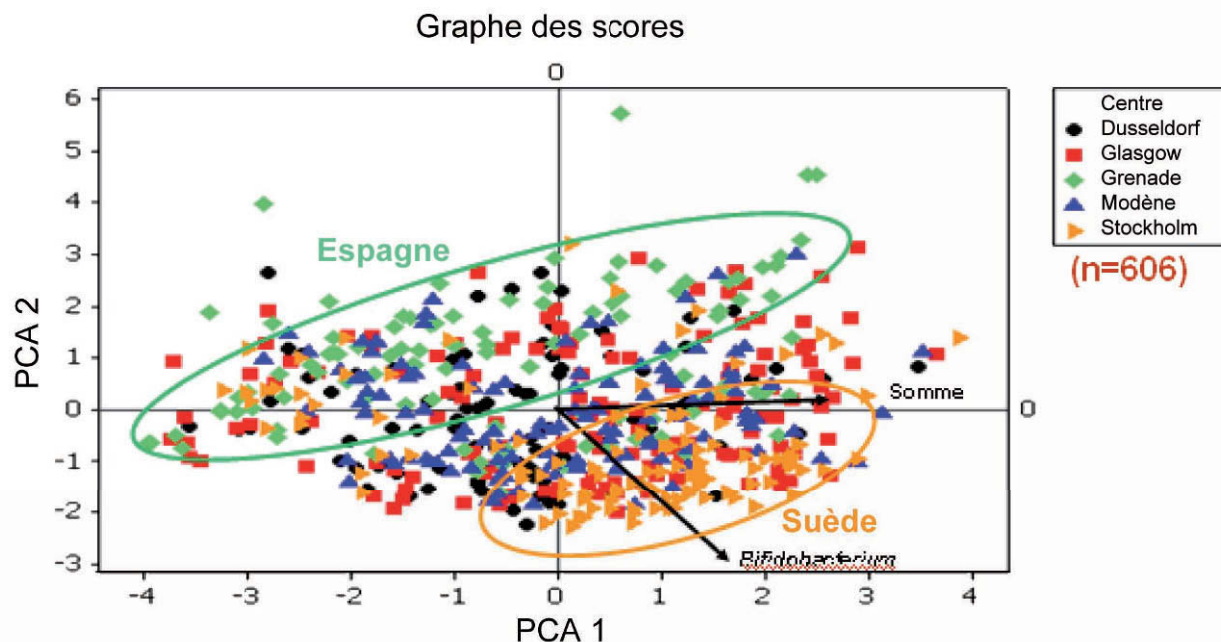


Figure 2 Microbiote fécal de nourrissons européens âgés de 6 semaines. Le lieu de naissance a une incidence sur la composition du microbiote fécal. Gradient nord-sud, de Stockholm (Suède) à Grenade (Espagne) : plus de bifidobactéries dans le nord ; diversification précoce dans le sud [34].

La distribution spatiale des microbes intestinaux selon les sites digestifs nécessite le recueil d'échantillons à l'intérieur et le long de l'intestin au moyen de méthodes invasives et elle est donc difficile à étudier. La préservation des relations topologiques entre les bactéries et l'épithélium est également difficile. Cela explique le plus probablement une certaine controverse persistant en la matière. Le microbiote luminal (à l'intérieur de la cavité intestinale) a été exploré de plusieurs manières. Le microbiote luminal du côlon proximal diffère du microbiote fécal, dont la composition n'est trouvée que dans les parties distales du côlon [41]. Entre le côlon proximal et le côlon distal, les populations microbiennes sont globalement multipliées par 100 et l'augmentation est essentiellement due à une augmentation des bactéries strictement anaérobies. La couche de mucus qui recouvre la paroi intestinale constitue une niche écologique spécifique. Plusieurs études ont montré que la communauté microbienne qui colonise cette niche est stable dans le temps et est remarquablement similaire de l'iléon au rectum pour un individu donné [42, 43]. À l'inverse, les espèces qui dominent dans la couche de mucus diffèrent des espèces dominantes dans la lumière [16, 42].

La capacité des bactéries intestinales commensales à adhérer *in situ* aux cellules épithéliales intestinales n'a pas, jusqu'à maintenant, été documentée de manière non équivoque. Des données indirectes existent, dérivées de la présence de gènes codant les adhésions dans le génome de souches d'*E. coli* capables de coloniser durablement leur hôte. Les adhésions pourraient néanmoins contribuer à la reconnaissance des sites et structures muqueux ou des cellules détachées. En termes écologiques, une souche donnée doit se diviser au moins aussi rapidement qu'elle est éliminée de sa niche pour être maintenue à un niveau de population stable dans l'écosystème [44]. Par conséquent, l'adhésion à l'épithélium ne semble pas être une nécessité absolue, mais la reconnaissance de sites à l'intérieur du mucus ou dans le contenu fournirait un avantage sélectif pour les souches à croissance lente [45]. Si l'adhésion à l'épithélium ne semble pas constituer un critère important pour les bactéries commensales, cette propriété a été associée à des bactéries intestinales chez les patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin et, bien sûr, à de nombreux agents pathogènes intestinaux.

Il reste clair que tous les mécanismes impliqués dans le maintien de l'homéostasie du microbiote intestinal humain ne sont pas encore compris ; c'est le cas en particulier des déterminants de la résistance au changement et de la résilience. Il est donc tout à fait pertinent de s'interroger sur le bon niveau de profondeur phylogénétique et la durée pendant laquelle la stabilité de l'écosystème doit être définie. En ce qui concerne la résilience, il est également raisonnable de supposer qu'un certain niveau de stress perturbera l'équilibre de l'écosystème intestinal, entraînant une perturbation irréversible. Le seuil au-dessus duquel le microbiote intestinal humain perd sa capacité à retrouver son équilibre initial est toujours inconnu aujourd'hui et pourrait différer d'un groupe bactérien à un autre ou d'une niche à une autre.

Enfin, les paramètres de l'homéostasie s'appliqueront à la fois aux fonctions et à la composition ; toutefois, l'importance de ces paramètres d'un point de vue fonctionnel

est totalement inexplorée. La résistance fonctionnelle et la résilience du microbiote intestinal doivent encore être déterminées, tout comme le lien entre phylogénie et fonctions. À présent, il n'existe que des spéculations quant à un lien potentiel entre « quantité de diversité » et résistance fonctionnelle et résilience. Enfin, il semblerait très important d'explorer la capacité des aliments fonctionnels à moduler ces paramètres de l'homéostasie, car l'amélioration de la résistance au changement ou de la résilience en cas de stress (en particulier antibiothérapie) peut être associée à un risque réduit d'infection par exemple.

Normobiose et dysbiose du microbiote intestinal humain

Nous désignerons l'état normal du microbiote intestinal humain par le terme « normobiose ». Sur la base d'évaluations moléculaires indépendante des cultures, il semble possible de définir des critères qualifiant la normobiose. Bien entendu, l'accent a été mis, pour des raisons techniques, sur l'évaluation phylogénétique de la composition, de la diversité, des espèces centrales et de la dynamique de celles-ci dans le temps et l'espace, et il est évident que la définition de la normobiose tirera profit de l'ajout de paramètres fonctionnels. Ce contexte permet en outre d'identifier les écarts spécifiques par rapport à la normobiose, c'est-à-dire la dysbiose, qui peut être spécifiquement explorée dans les maladies immunitaires, métaboliques ou dégénératives. Nous avons récemment validé le concept dans le cas de la maladie de Crohn. La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire de l'intestin d'étiologie encore inconnue, dont la prévalence est d'un cas pour 2 000 habitants dans les pays européens. Nous avons démontré que la maladie de Crohn est associée à une dysbiose intestinale, avec une représentation plus faible du groupe *Clostridium leptum* parmi le phylum des Firmicutes [22, 46-48]. Nous avons en outre montré que les espèces bactériennes *Faecalibacterium prausnitzii*, lorsqu'elles sont détectables dans le microbiote associé à la muqueuse de l'iléon du patient, assurent une protection contre la réapparition postopératoire des signes endoscopiques d'inflammation 6 mois après la résection chirurgicale de la région iléocœcale de l'intestin [47]. Nous avons enfin démontré que *Faecalibacterium prausnitzii* pourrait présenter des propriétés anti-inflammatoires *in vitro* et dans des modèles animaux, avec une inflammation induite chimiquement.

L'exploration de la dysbiose pourrait être vue comme une première étape fournissant des informations clés pour la mise au point de stratégies visant à restaurer ou maintenir l'homéostasie et la normobiose. Bien que limitée jusqu'à maintenant à la composition et/ou la diversité du microbiote, une dysbiose est suspectée et, dans un petit nombre de cas, est déjà bien documentée. Ceci est vrai pour le syndrome de l'intestin irritable [49], la recto-colite hémorragique [47, 50], l'obésité [51, 52], le diabète de type I [53, 54], le diabète de type II [55], la maladie coeliaque [56, 57], l'allergie [58, 59], l'autisme [60, 61], la santé cardiovasculaire [62] et dans des cas d'infections à *Clostridium difficile* [63] ou VIH [64]. Ces observations, tout comme celle de la dysbiose dans la maladie de Crohn ci-dessus, n'indiquent pas un lien de causalité entre le déséquilibre du microbiote et l'apparition de la maladie.

En fait, il est assez raisonnable d'affirmer qu'en raison des perturbations causées par de telles maladies dans le système immunitaire et dans les propriétés physicochimiques du milieu intestinal, la dysbiose pourrait en réalité être une conséquence plutôt qu'une cause. Dans le cas de *Faecalibacterium prausnitzii* dans la maladie de Crohn, nous avons néanmoins une situation dans laquelle la privation dans les populations d'une bactérie commensale normale, qui appartient aux espèces centrales les plus dominantes du microbiote intestinal sain et est potentiellement anti-inflammatoire *in vivo*, est associée à une capacité réduite de l'écosystème à favoriser un retour à l'homéostasie immunitaire. Il peut même être anticipé qu'un cercle vicieux est mis en place, combinant les effets délétères de densités bactériennes supérieures près de la muqueuse [65], de populations plus importantes de bactéries à Gram négatif, pro-inflammatoires produisant des endotoxines, généralement subdominantes chez les sujets sains [66, 67], de proportions réduites de bactéries commensales anti-inflammatoires [47] et même d'une présence accrue de certains biomarqueurs protéiques, favorisant potentiellement une réactivité auto-immune [Juste et Doré, communication personnelle].

Le renforcement actuel du concept de normobiose/dysbiose confirme le rôle majeur joué par le microbiote dans les troubles liés à l'intestin, en particulier les maladies à médiation immunitaire associées à une rupture de l'homéostasie. Il souligne la nécessité d'appliquer les outils émergents de la microbiomique à l'élaboration de modèles diagnostiques et également d'identifier les molécules signal et décrire les mécanismes d'interactions bactérie-hôte en jeu.

Microbiomique intestinale humaine

Au-delà du niveau phylogénétique, qui a été largement exploré jusqu'à maintenant, se trouvent le pool génétique combiné, les transcrits, les protéines et même les métabolites des membres de la communauté microbienne intestinale. Ils sont connus aujourd'hui comme le métagénome, le métatranscriptome, le métaprotéome et, ensemble, sous l'appellation microbiome intestinal humain. La grande majorité des bactéries intestinales dominantes n'ayant pas encore été cultivée, le contenu génomique de cette communauté microbienne et ses composants dérivés aux différents niveaux d'intégration omique est, en majeure partie, inconnu. La métagénomique émerge aujourd'hui comme étant l'approche la plus puissante pour caractériser le répertoire de gènes de tout contexte microbien complexe, que ses constituants puissent être cultivés ou non. Le développement de technologies de séquençage à très haut débit contribue encore à ce développement. En termes pratiques, la communauté microbienne pourrait être extraite de son environnement et son ADN purifié et/ou cloné afin de déterminer sa séquence. Le répertoire génétique complet des microbes dominants cultivables et non cultivables peut donc être obtenu. Cela offre en outre la possibilité de concevoir des outils de profilage à haut débit, pouvant fournir des informations sur les potentiels fonctionnels de la communauté complète. En outre, le clonage de fragments de génomes des bactéries intestinales dans des bibliothèques métagénomiques de grands inserts permet l'utilisation de tests fonctionnels pour rechercher

les fonctions de bactéries non cultivables après expression hétérologue dans *E.coli*, donnant accès à des ressources biologiques jusqu'à maintenant totalement inexplorées. Au-delà de son caractère innovant, le potentiel de la métagénomique a déjà été largement documenté [68, 69].

Les premiers développements de l'approche métagénomique appliquée au microbiote intestinal humain ciblaient la diversité de la communauté microbienne [70, 71] et le répertoire génétique d'un petit nombre de sujets [72, 73]. Les applications fonctionnelles de la métagénomique restent confinées à l'écosystème du sol [74] et aux intestins animaux [75] ; nous avons initié son application à l'environnement intestinal humain [76]. Encore à ses balbutiements, cette approche laisse entrevoir des promesses majeures pour l'amélioration de la compréhension des interactions microbe-aliment, microbe-hôte et microbe-microbe.

L'exploration microbiomique du microbiote intestinal humain est actuellement en cours, grâce à plusieurs programmes tels que le programme MetaHIT financé par la Commission européenne (<http://locus.jouy.inra.fr/metahit/>) et le programme GMGE Micro-Obes (http://www.inra.fr/micro_obes) financé par l'Agence française de la recherche, ainsi que les programmes Roadmap du NIH (<http://nihroadmap.nih.gov/hmp/>) et de nombreux autres à travers le monde. Au niveau international, ces programmes sont structurés au sein du *International Human Microbiome Consortium* (IHMC), co-présidé par le NIH et la Commission européenne. Ces programmes fourniront une quantité considérable d'informations qui, à leur tour, permettront l'identification des caractères génomiques et fonctionnels conservés et variables de l'écosystème, la description de ceux qui sont spécifiques de l'environnement intestinal et associés au meilleur potentiel diagnostique et/ou pronostique, la reconstruction de la chaîne alimentaire métabolique de la communauté microbienne, la description initiale des écotypes et la modélisation de leurs relations dans une initiative d'écologie des systèmes.

Conclusion

L'application des outils d'écologie moléculaire au microbiote intestinal a conduit à des améliorations très significatives de notre compréhension de cet écosystème, en termes de composition et de dynamique de la diversité des espèces. L'approche à un seul gène, basée sur l'ARN ribosomal en tant que marqueur phylogénétique universel, avait néanmoins négligé les fonctions exercées par les microorganismes dans leur environnement.

Il est devenu possible de séquencer des génomes combinés de communautés microbiennes complexes et d'accéder ainsi à leurs activités potentielles. Les étapes suivantes vers la transcriptomique environnementale, les protéines exprimées, les activités et les métabolites, ont débuté. L'exploration fonctionnelle globale du microbiote intestinal humain est donc en cours, avec des perspectives aussi larges et fascinantes que celles du génome humain lui-même.

Conflits d'intérêts

J. Doré : aucun

G. Corthier : aucun

References

- [1] Duarte R, Silva AM, Vieira LQ, Afonso LC, Nicoli JR. Influence of normal microbiota on some aspects of the immune response during experimental infection with *Trypanosoma cruzi* in mice. *J Med Microbiol* 2004;53:741-8.
- [2] Neumann E, Oliveira MA, Cabral CM, Moura LN, Nicoli JR, Vieira EC, et al. Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. *Braz J Med Biol Res* 1998;31:1565-73.
- [3] Souza DG, Vieira AT, Soares AC, Pinho V, Nicoli JR, Vieira LQ, et al. The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses. *J Immunol* 2004;173:4137-46.
- [4] Oliveira MR, Tafuri WL, Afonso LC, Oliveira MA, Nicoli JR, Vieira EC, et al. Germ-free mice produce high levels of interferon-gamma in response to infection with *Leishmania major* but fail to heal lesions. *Parasitology* 2005;131:477-88.
- [5] Freter R. Mechanisms that control the microflora in the large intestine. Hentges DJ, ed. *Human intestinal microflora in health and disease*. New York: Academic press, 1983:33-54.
- [6] Wells CL, Maddaus MA, Simmons RL. Proposed mechanisms for the translocation of intestinal bacteria. *Rev Infect Dis* 1988;10:958-79.
- [7] van der Waaij D, Berghuis-de Vries JM, Lekkerkerk-van der Wees JEC. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *J Hyg (Lond)* 1971;69:405-11.
- [8] Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005;307:1915-20.
- [9] Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006;124:837-48.
- [10] Duncan SH, Belenguer A, Holtrop G, Johnstone AM, Flint HJ, Lobley GE. Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:1073-8.
- [11] Finegold SM, Attebery HR, Sutter VL. Effect of diet on human fecal flora: comparison of Japanese and American diets. *Am J Clin Nutr* 1974;27:1456-69.
- [12] Holdeman LV, Good IJ, Moore WE. Human fecal flora: variation in bacterial composition within individuals and a possible effect of emotional stress. *Appl Environ Microbiol* 1976; 31: 359-75.
- [13] Moore WE, Holdeman LV. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Microbiol* 1974;27:961-79.
- [14] Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, 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;65:4799-807.
- [15] Mangin I, Bonnet R, Seksik P, Rigottier-Gois L, Sutren M, Bouhnik Y, et al. Molecular inventory of faecal microflora in patients with Crohn's disease. *FEMS Microbiol Ecol* 2004;50:25-36.
- [16] Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005;308:1635-8.
- [17] Finegold SM, Molitoris D, Song Y, Liu C, Vaisanen ML, Bolte E, et al. Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism. *Clin Infect Dis* 2002;35(Suppl 1):S6-S16.
- [18] Franks AH, Harmsen HJ, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F, Welling GW. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:3336-45.
- [19] Jansen GJ, Wildeboer-Veloo AC, Tonk RH, Franks AH, Welling GW. Development and validation of an automated, microscopy-based method for enumeration of groups of intestinal bacteria. *J Microbiol Methods* 1999;37:215-21.
- [20] Sghir A, Gramet G, Suau A, Rochet V, Pochart P, Dore J. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:2263-6.
- [21] Rigottier-Gois L, Bourhis AG, Gramet G, Rochet V, Doré J. Fluorescent hybridisation combined with flow cytometry and hybridisation of total RNA to analyse the composition of microbial communities in human faeces using 16S rRNA probes. *FEMS Microbiol Ecol* 2003;43:237-45.
- [22] Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, et al. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 2003;52:237-42.
- [23] Lay C, Sutren M, Rochet V, Saunier K, Doré J, Rigottier-Gois L. Design and validation of 16S rRNA probes to enumerate members of the *Clostridium leptum* subgroup in human faecal microbiota. *Environ Microbiol* 2005;7:933-46.
- [24] Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Grijpstra J, Knol J, Degener JE, Welling GW. Development of 16S rRNA-based probes for the *Coriobacterium* group and the *Atopobium* cluster and their application for enumeration of Coriobacteriaceae in human feces from volunteers of different age groups. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:4523-7.
- [25] Rawls JF, Mahowald MA, Ley RE, Gordon JI. Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection. *Cell* 2006;127:423-33.
- [26] West PA, Hewitt JH, Murphy OM. Influence of methods of collection and storage on the bacteriology of human milk. *J Appl Bacteriol* 1979;46: 269-77.
- [27] Moughan PJ, Birtles MJ, Cranwell PD, Smith WC, Pedraza M. The piglet as a model animal for studying aspects of digestion and absorption in milk-fed human infants. *World Rev Nutr Diet* 1992;67:40-113.
- [28] Perez PF, Doré J, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J, Serrant P, et al. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics* 2007;119:e724-32.
- [29] Bjursell MK, Martens EC, Gordon JI. Functional genomic and metabolic studies of the adaptations of a prominent adult human gut symbiont, bacteroides thetaiotaomicron, to the suckling period. *J Biol Chem* 2006;281:36269-79.
- [30] Midtvedt AC, Midtvedt T. Production of short chain fatty acids by the intestinal microflora during the first 2 years of human life. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992;15:395-403.
- [31] Nowrouzian F, Hesselmar B, Saalman R, Strannegård IL, Aberg N, Wold AE, et al. *Escherichia coli* in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage. *Pediatr Res* 2003;54:8-14.
- [32] Adlerberth I, Lindberg E, Aberg N, Hesselmar B, Saalman R, Strannegård IL, et al. Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: an effect of hygienic lifestyle? *Pediatr Res* 2006;59:96-101.
- [33] Lindberg E, Adlerberth I, Hesselmar B, Saalman R, Strannegård IL, Aberg N, et al. High rate of transfer of *Staphylococcus aureus* from parental skin to infant gut flora. *J Clin Microbiol* 2004;42:530-4.
- [34] Fallani M, Young D, Scott J, Norin E, Amarri S, Rüdiger A, et al. The intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breastfeeding and antibiotics. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010; in press.
- [35] Zoetendal EG, Akkermans AD, De Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:3854-9.
- [36] Vanhoutte T, Huys G, Brandt E, Swings J. Temporal stability analysis of the microbiota in human feces by denaturing gradient gel electrophoresis using universal and group-specific 16S rRNA gene primers. *FEMS Microbiol Ecol* 2004;48:437-46.

- [37] McCartney AL, Wenzhi W, Tannock GW. Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and lactobacillus microflora of humans. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:4608-13.
- [38] Kimura K, McCartney AL, McConnell MA, Tannock GW. Analysis of fecal populations of bifidobacteria and lactobacilli and investigation of the immunological responses of their human hosts to the predominant strains. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:3394-8.
- [39] De La Cochetière MF, Durand T, Lepage P, Bourreille A, Galmiche JP, Doré J. Resilience of the dominant human fecal microbiota upon short-course antibiotic challenge. *J Clin Microbiol* 2005;43:5588-92.
- [40] Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol* 2008;6:e280.
- [41] Marteau P, Pochart P, Doré J, Béra-Maillet C, Bernalier A, Corthier G. Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:4939-42.
- [42] Lepage P, Seksik P, Sutren M, de la Cochetière MF, Jian R, Marteau P, et al. Biodiversity of the mucosa-associated microbiota is stable along the distal digestive tract in healthy individuals and patients with IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:473-80.
- [43] Wang M, Ahrné S, Jeppsson B, Molin G. Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol Ecol* 2005;54:219-31.
- [44] Lee YK, Ho PS, Low CS, Arvilommi H, Salminen S. Permanent colonization by *Lactobacillus casei* is hindered by the low rate of cell division in mouse gut. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:670-4.
- [45] Freter R, Brickner H, Fekete J, Vickerman MM, Carey KE. Survival and implantation of *Escherichia coli* in the intestinal tract. *Infect Immun* 1983;39:686-703.
- [46] Sokol H, Seksik P, Rigottier-Gois L, Lay C, Lepage P, Podglajen I, et al. Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:106-11.
- [47] Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux JJ, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:16731-6.
- [48] Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, et al. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:1183-9.
- [49] Kassinen A, Krogius-Kurikka L, Mäkituokko H, Rinttilä T, Paulin L, Corander J, et al. The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects. *Gastroenterology* 2007;133:24-33.
- [50] Martinez C, Antolin M, Santos J, Torrejon A, Casellas F, Borrue N, et al. Unstable composition of the fecal microbiota in ulcerative colitis during clinical remission. *Am J Gastroenterol* 2008;103:643-8.
- [51] Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:11070-5.
- [52] Kalliomäki M, Collado MC, Salminen S, Isolauri E. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am J Clin Nutr* 2008;87:534-8.
- [53] Dessein R, Peyrin-Biroulet L, Chamaillard M. Intestinal microbiota gives a nod to the hygiene hypothesis in type 1 diabetes. *Gastroenterology* 2009;137:381-3.
- [54] Wen L, Ley RE, Volchkov PY, Stranges PB, Avanesyan L, Stonebraker AC, et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature* 2008;455:1109-13.
- [55] Cani PD, Delzenne NM. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des* 2009;15:1546-58.
- [56] Nadal I, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. *J Med Microbiol* 2007;56:1669-74.
- [57] Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease. *J Clin Pathol* 2009;62:264-9.
- [58] Kirjavainen PV, Arvola T, Salminen SJ, Isolauri E. Aberrant composition of gut microbiota of allergic infants: a target of bifidobacterial therapy at weaning? *Gut* 2002;51:51-5.
- [59] Björkstén B. Disease outcomes as a consequence of environmental influences on the development of the immune system. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2009;9:185-9.
- [60] Finegold SM, Molitoris D, Song Y, Liu C, Vaisanen ML, Bolte E, et al. Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism. *Clin Infect Dis* 2002;35(Suppl 1):S6-S16.
- [61] Parracho HM, Bingham MO, Gibson GR, McCartney AL. Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *J Med Microbiol* 2005;54:987-91.
- [62] Crawford PA, Crowley JR, Sambandam N, Muegge BD, Costello EK, Hamady M, et al. Regulation of myocardial ketone body metabolism by the gut microbiota during nutrient deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:11276-81.
- [63] [63] Hickson M, D'Souza AL, Muthu N, Rogers TR, Want S, Rajkumar C, et al. Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *BMJ* 2007;335:80.
- [64] Gori A, Tincati C, Rizzardini G, Torti C, Quirino T, Haarman M, et al. Early impairment of gut function and gut flora supporting a role for alteration of gastrointestinal mucosa in human immunodeficiency virus pathogenesis. *J Clin Microbiol* 2008;46:757-8.
- [65] Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* 2005;43:3380-9.
- [66] Baumgart M, Dogan B, Rishniw M, Weitzman G, Bosworth B, Yantiss R, et al. Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *ISME J* 2007;1:403-18.
- [67] Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;127:412-21.
- [68] Riesenfeld CS, Schloss PD, Handelsman J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu Rev Genet* 2004;38:525-52.
- [69] National Research Council of the National Academies. The new science of metagenomics: revealing the secrets of our microbial planet. Washington DC. The National Academies Press, 2007
- [70] Manichanh C, Chapple CE, Frangeul L, Gloux K, Guigo R, Dore J. A comparison of random sequence reads versus 16S rDNA sequences for estimating the biodiversity of a metagenomic library. *Nucleic Acids Res* 2008;36:5180-8.
- [71] Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 2006;55:205-211.
- [72] Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 2006;312:1355-9.
- [73] Kurokawa K, Itoh T, Kuwahara T, Oshima K, Toh H, Toyoda A, et al. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res* 2007;14:169-81.
- [74] Williamson LL, Borlee BR, Schloss PD, Guan C, Allen HK, Handelsman J. Intracellular screen to identify metagenomic

- clones that induce or inhibit a quorum-sensing biosensor. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:6335-44.
- [75] Beloqui A, Pita M, Polaina J, Martínez-Arias A, Golyshina OV, Zumárraga M, et al. Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen: biochemical properties, structural analysis, and phylogenetic relationships. *J Biol Chem* 2006;281:22933-42.
- [76] Gloux K, Leclerc M, Illozer H, L'Haridon R, Manichanh C, Corthier G, et al. Development of high-throughput phenotyping of metagenomic clones from the human gut microbiome for modulation of eukaryotic cell growth. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:3734-7.