



**HAL**  
open science

# Optimisation et développement de milieux de culture

Marion Bonnet

► **To cite this version:**

Marion Bonnet. Optimisation et développement de milieux de culture. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-02314918

**HAL Id: dumas-02314918**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02314918v1>**

Submitted on 14 Oct 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



MÉMOIRE  
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES  
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE

Soutenu le vendredi 11 Octobre 2019

Par Mme **Marion Catherine Géraldine BONNET.**  
Née le 10 Février 1991 à Créteil

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 04 octobre 1988  
tenant lieu de

**THÈSE**

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

**TITRE :**

**OPTIMISATION ET DÉVELOPPEMENT DE MILIEUX DE CULTURE**

----oOo----

**JURY :**

Président : Mr le Professeur Jean-Marc ROLAIN- Directeur de thèse

Membres : Pr Jean-Christophe LAGIER – Professeur des Universités-Praticien Hospitalier  
AP-HM.

Pr Pierre-Antoine BONNET– Professeur des Universités-Université de  
Montpellier

Dr Grégory DUBOURG – Pharmacien Assistant Hospitalo-Universitaire AP-HM

MÉMOIRE  
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES  
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE

Soutenu le vendredi 11 Octobre 2019

Par Mme **Marion Catherine Géraldine BONNET.**  
Née le 10 Février 1991 à Créteil

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 04 octobre 1988  
tenant lieu de

**THÈSE**

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

**TITRE :**

**OPTIMISATION ET DÉVELOPPEMENT DE MILIEUX DE CULTURE**

----oOo----

**JURY :**

Président : Mr le Professeur Jean-Marc ROLAIN- Directeur de thèse

Membres : Pr Jean-Christophe LAGIER – Professeur des Universités-Praticien Hospitalier  
AP-HM.

Pr Pierre-Antoine BONNET– Professeur des Universités-Université de  
Montpellier

Dr Grégory DUBOURG – Pharmacien Assistant Hospitalo-Universitaire AP-HM

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05  
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

## **ADMINISTRATION :**

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Jean-Pierre REYNIER, M. Henri PORTUGAL
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

## **DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE**

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

## **PROFESSEURS**

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE	M. Philippe PICCERELLE

## MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI  
Mme Odile RIMET-GASPARINI  
Mme Pascale BARBIER  
M. François DEVRED  
Mme Manon CARRE  
M. Gilles BREUZARD  
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA  
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,  
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE  
M. Emmanuel CAUTURE  
Mme Véronique ANDRIEU  
Mme Marie-Pierre SAVELLI

NUTRITION ET DIETETIQUE

M. Léopold TCHIAKPE

## A.H.U.

THERAPIE CELLULAIRE

M. Jérémy MAGALON

## ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

## DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

## PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Philippe CHARPIOT

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE  
Mme Laurence CAMOIN-JAU  
Mme Florence SABATIER-MALATERRE  
Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN  
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET  
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

## MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET M. Michel DE MEO Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

## A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	M. Maxime LOYENS
----------------------------	------------------

### DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

## PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Philippe GALLICE
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	Mme Evelyne OLLIVIER

**MAITRES DE CONFERENCES**

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

**MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

**A.H.U.**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO
--	-------------------

**ATER**

CHIMIE ANALYTIQUE	M. Charles DESMARCHELIER
-------------------	--------------------------

**DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE**

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

**PROFESSEURS**

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

**MAITRES DE CONFERENCES**

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS- SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

**A.H.U.**

PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD  Mme Nadège NEANT
PHARMACOCINETIQUE	



## **CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE**

Mme Valérie AMIRAT-COMBRAIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 22 février 2018

## REMERCIEMENTS

Je remercie le Pr Didier Raoult de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, de m'avoir appris que le principal dans la recherche est de toujours s'amuser en travaillant. Je le remercie sincèrement de la confiance qu'il m'a accordée et pour tous les précieux conseils qu'il m'a distillés tout au long de cette thèse.

Je remercie sincèrement le Professeur Jean-Marc Rolain d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse de pharmacie et de présider ce jury.

Je remercie le Professeur Jean-Christophe Lagier pour l'aide qu'il m'a apportée au cours de ma thèse d'avoir accepté de faire partie de ce jury et d'être un des rapporteurs de ce travail.

Je remercie le Professeur Pierre-Antoine Bonnet d'avoir accepté de faire partie de ce jury et d'être un des rapporteurs de cette thèse.

Je remercie le Docteur Grégory Dubourg pour sa gentillesse et toute l'aide qu'il m'a apportée durant ma thèse. Je le remercie également d'avoir accepté de faire partie de ce jury et d'avoir accepté d'être un des rapporteurs de ce travail.

Je remercie le Professeur Michel Drancourt pour les conseils qu'il m'a donnés durant ma thèse.

Merci à Saber Khelaifia de l'aide et des conseils qu'il m'a apportés durant ma thèse.

Merci à Marielle, pour sa formation sur les lyophilisateurs, pour avoir rendu plus sympa toutes nos manips et pour nos longues discussions sur tout et rien.

Merci à toute l'équipe de culturomics pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble, et plus particulièrement à Souad pour sa gentillesse et ses bisous pleins de réconfort, à Sabrina pour tous les fous rires qu'on a pu avoir et les bêtises qu'on a pu dire dans notre pièce 018 de Culturomics du RCH, à Sara, sans qui la lyophilisation des bactéries n'aurait pas eu le même charme, à PamPam pour son rire inimitable, à Camille, sans qui nous ne serions jamais au courant des potins de l'IHU, à Sokhna, avec qui j'ai fait les pires nocturnes de ma vie, à repiquer les colonies à la loupe. A tous un grand merci !!

Merci à Elodie, ma binôme de Culture-Top, pour les bons moments qu'on a passé ensemble.

Merci aux membres de la CSUR, Stéphane, Amaël, Anaïs, Maïlys et Afaf, sans qui mes repas du midi n'auraient pas été les mêmes. On se sera bien amusés !!

Merci à tous mes copains de la fac, Constance, Fanny, Laurie, Marine, Maxime, Nicolas et thibaut, sans qui les cours en amphi auraient semblé très longs !

Merci à Eya pour sa bonne humeur et son sourire à toute épreuve. On aura bien rigolé toutes les deux.

Merci à Chloé et Iliona, pour tous les bons moments qu'on a partagé cette dernière année (ou ces derniers 6 mois pour Ilio !!). J'espère qu'on continuera à se voir encore longtemps même si on n'est plus dans la même ville.

Merci à Céline et Sarah, pour avoir toujours été là pour moi ces deux dernières années, à m'écouter râler quand le moral était au plus bas. Je ne pensais pas rencontrer de véritables amies au travail et pourtant c'est ce que vous êtes devenues pour moi. Alors merci pour tous les moments qu'on a partagé et pour tous ceux qui sont encore à venir.

Un grand merci à mes copines de toujours, Clémence, Marine et Delphine ! On a toujours été là les unes pour les autres au cours de toutes ces années et pour encore un très grand nombre. Vivement nos prochaines vacances !!

Un très grand merci à ma sœur de cœur, ma jumelle, Anne-Céline, sans qui toutes ces dernières années n'auraient pas été les mêmes. Tu as été un des piliers de ma vie ces dix dernières années, alors merci pour tous nos moments passés ensemble, pour nos week-ends, nos voyages à l'étranger et toutes nos soirées à refaire le monde. Tu es la sœur que j'aurais rêvée d'avoir.

Merci à toute ma famille, mes grands-pères décédés, pour le soutien qu'ils m'ont toujours témoigné.

Et enfin, un immense merci à mes parents sans qui tout cela n'aurait sans doute jamais été possible. Vous avez toujours été là pour moi, même dans les moments où je n'y croyais plus moi-même. Vous êtes des parents formidables. Merci papa pour tous les précieux conseils que tu me donnes depuis que je suis toute petite et qui m'ont permis d'en arriver là aujourd'hui. Tu es toujours là pour me changer les idées et me remonter le moral avec ton humour qui ne fait rire que nous. Merci maman, tu es mon roc, celle que j'appelle en toute circonstance et qui

trouve toujours les bons mots. Ton soutien infallible depuis toujours est ce qui m'a permis de tenir jusqu'au bout. Je vous aime.

**« L'UNIVERSITE N'ENTEND DONNER AUCUNE  
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES  
DANS LES THESES. CES OPINIONS DOIVENT ETRE  
CONSIDEREES COMME PROPRES A LEURS AUTEURS. »**

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b> .....	15
<b>PARTIE I : Revue de la littérature sur les milieux de culture, de leur invention à aujourd’hui.</b> .....	18
Article 1. Revue : Historical view of culture media .....	20
<b>PARTIE II : Développement d’un milieu de culture permettant la sélection de la bactérie <i>Enterococcus hirae</i>.</b> .....	50
Brevet 1 : Milieu et procédé de culture et isolement sélectif de la bactérie <i>Enterococcus hirae</i> .....	52
<b>PARTIE III : Optimisation d’un milieu de culture, le R-medium, afin de favoriser la croissance de la majorité des bactéries anaérobies en aérobiose.</b> .....	74
Brevet 2 : Milieu de culture polyvalent pour bactéries anaérobies en aérobiose.....	76
<b>PARTIE IV : Elaboration d’un procédé de fabrication d’une gélose bi-phasique.</b> .....	108
Brevet 3 : Procédé de préparation d’un milieu de culture bi-phasique de bactérie. ....	110
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	136
<b>PARTIE V : Annexes</b> .....	139
Article 2 : Genome sequence and description of <i>Traorella massiliensis</i> gen. nov., sp. nov., a new bacterial genus isolated from human left colon .....	141
Article 3 : Genome sequence and description of <i>Coprococcus phoceensis</i> gen. nov., sp. nov., a new bacterial genus isolated from the human left colon.....	154
Article 4 : « <i>Veillonella massiliensis</i> », a new anaerobic species isolated from human colostrum .....	160

<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>163</b>
---	------------

# **INTRODUCTION**



Un milieu de culture est une préparation liquide, semi-solide ou solide qui permet le développement de micro-organismes. Le milieu de culture doit mimer l'environnement naturel de la bactérie pour favoriser sa croissance et son isolement.

La découverte des milieux de culture a permis l'essor de la microbiologie au XIX<sup>ème</sup> siècle (1). La culture bactérienne a ainsi été la première méthode mise au point pour l'étude du microbiote humain (2). La culture des microorganismes sur les milieux de culture va dépendre de plusieurs facteurs tels que les nutriments mis à disposition des bactéries, la température d'incubation, le pH de la gélose ou encore l'atmosphère d'incubation des bactéries (3). La combinaison de chacun de ces paramètres est propre à chaque bactérie et permet sa croissance et son isolement. Obtenir une culture pure est essentiel car cela permet d'étudier les caractéristiques de la bactérie comme sa susceptibilité aux antibiotiques, ses caractéristiques physico-chimiques ou encore son génome (4).

Récemment, les microbiologistes ont délaissé la culture en faveur de nouvelles techniques innovantes. Cela a fait suite à l'apparition de techniques moléculaires dans les années 1970 telles que la PCR, le séquençage et plus particulièrement la métagénomique. En effet, la culture bactérienne est souvent plus fastidieuse et demande un apprentissage plus long que les techniques moléculaires (2). Durant plusieurs décennies, il y a donc eu peu de progrès dans l'élaboration de nouveaux milieux de culture et la découverte de nouvelles espèces bactériennes.

Néanmoins, la métagénomique présente certains désavantages et notamment un biais de profondeur, du fait d'un manque de sensibilité des amorces utilisées, puisqu'elle ne détecte pas les bactéries présentes à des concentrations inférieures à  $10^5$  bactéries par gramme de selle (2). De plus, ces techniques permettent de détecter seulement l'ADN, ne fournissant donc pas d'information sur le caractère vivant ou mort de la bactérie.

Une nouvelle technique de culture, la culturomics, qui consiste à utiliser un très grand nombre de milieux de culture et de conditions de culture pour enrichir le répertoire des bactéries, a été mise au point il y a quelques années dans notre laboratoire (2). Cela a permis un nouvel essor de la culture bactérienne et a nécessité la recherche de nouveaux milieux pour isoler certaines bactéries fastidieuses à cultiver car nécessitant des besoins spécifiques et exigeants pour croître.

La culturomics a également permis de démontrer la complémentarité existante entre la métagénomique et la culturomics. Ainsi, l'identification par métagénomique des espèces bactériennes existantes dans un microbiote donné, peut être exploitée par la culturomics via

l'élaboration et l'optimisation de nouveaux milieux de culture spécifiques pour l'isolement de ces espèces. Cette complémentarité a permis à la culturomics de devenir une technique d'isolement bactérien ciblé.

Par ailleurs, depuis quelques années, des études ont mis en évidence que le microbiote intestinal pouvait jouer un rôle dans la réponse au traitement de certaines pathologies et plus particulièrement dans la réponse au traitement de certains cancers (5, 6, 7). Une étude réalisée par une équipe de l'hôpital Gustave Roussy a mis en évidence que les bactéries *Enterococcus hirae* et *Barnesiella intestinihominis* avaient une action favorisant la réponse au traitement anti-cancéreux par cyclophosphamide (8). L'élaboration de nouveaux milieux de culture pour sélectionner spécifiquement ces bactéries apparaît donc importante car isoler rapidement ces bactéries d'intérêt à partir d'échantillons de selles des malades pourrait permettre un gain de temps dans la prise en charge de leur cancer. Ainsi, ces patients auront plus de chance de répondre positivement au traitement.

Ce manuscrit est composé de quatre parties principales, la première reprend à travers une revue bibliographique l'évolution des milieux de culture, de leur création à aujourd'hui. La deuxième partie porte sur le développement d'un milieu de culture qui permet la sélection d'une bactérie, *Enterococcus hirae*, qui favorise la réponse au traitement anti-cancéreux, le cyclophosphamide. Dans une troisième partie, nous avons optimisé un milieu de culture permettant la culture des bactéries anaérobies en aérobie, précédemment mis au point dans notre laboratoire. Celui-ci présentait un manque de sensibilité pour certaines bactéries anaérobies. Enfin dans la dernière partie, nous avons développé une technique de fabrication d'une gélose bi-phasique, afin de lutter contre la déshydratation des géloses lors d'une incubation prolongée à l'étuve.

**PARTIE I : Revue de la littérature  
sur les milieux de culture, de leur  
invention à aujourd'hui.**

## AVANT-PROPOS

La culture bactérienne a un rôle fondamental dans la microbiologie. Il s'agit de la première méthode qui a permis d'étudier le microbiote humain. Elle permet d'isoler et de caractériser les bactéries qui composent nos différents microbiotes et notre environnement. Cependant, elle a été délaissée pendant longtemps par un grand nombre de microbiologistes car cette méthode était considérée comme ancestrale et dépassée. Les techniques innovantes moléculaires ont été favorisées et considérées comme remplaçantes de la culture. Cependant, ces techniques, telle que la métagénomique, présentent un biais de profondeur.

De nos jours, le microbiote occupe une place de plus en plus importante dans la recherche médicale. La métagénomique et la culture sont complémentaires l'une de l'autre pour l'étude de ce microbiote. En effet, il a été démontré que lors de l'analyse du microbiote par ces deux techniques, seules 15% des espèces bactériennes mises en évidence étaient communes aux deux méthodes (2). La culture connaît ainsi un nouvel essor.

Cette revue décrit dans une première partie l'approche empirique de la microbiologie avec la découverte des premiers microorganismes et l'élaboration des premiers milieux de culture. Dans une deuxième partie nous avons mis en évidence les ingrédients nécessaires pour obtenir un milieu enrichi et donc une croissance bactérienne. Certaines bactéries ont besoin de nutriments et facteurs de croissance spécifiques pour pouvoir croître de manière optimale. La troisième partie répertorie les agents qui permettent de sélectionner une bactérie par rapport à une autre. L'objectif est ainsi d'éliminer les bactéries que l'on ne souhaite pas isoler et qui sont présentes dans l'échantillon étudié. Enfin, dans une dernière partie, nous avons étudié les désavantages de certains agents gélifiants les uns par rapport aux autres.

**Article 1. Revue : Historical view of culture media**

Marion Bonnet, Jean-Christophe Lagier, Saber Khelaifia,  
Didier Raoult

Soumis à *New Microbes and New Infections*

# Historical view of culture media

Marion Bonnet<sup>1</sup>, Jean Christophe Lagier<sup>1,2</sup>, Saber Khelafia<sup>1,2</sup> and Didier Raoult<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Aix-Marseille Univ, IRD, APHM, MEPHI, Marseille, France

<sup>2</sup> Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée Infection 19-21 Boulevard Jean Moulin 13005 Marseille, France.

\*Corresponding author: Prof Didier Raoult : didier.raoult@gmail.com; Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée Infection, 19-21 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 5, France.

**Keywords:** Culture media, liquid and solid media, enriched media, selective media, gelling agents.

## **Abstract**

Microbiology has been largely developed thanks to the discovery and optimization of culture media. The first liquid artificial culture medium was created by Louis Pasteur in 1860. Previously, bacterial growth on daily materials such as some foods had been observed. These observations thus highlighted the importance of the bacteria's natural environment and their nutritional needs in the development of culture media for their isolation. A culture medium is essentially composed of basic elements (water, nutrients), to which must be added different growth factors that will be specific to each bacterium and necessary for their growth.

The evolution of bacterial culture through the media used for their culture began with the development of the first solid culture medium by Koch, allowing not only the obtaining of bacterial colonies but also the possibility of purifying a bacterial clone. The main gelling agent used in solid culture media is agar. However, some limits were observed in the use of agar because of some extremely oxygen sensitive bacteria do not grow on agar media and other alternatives were proposed and tested. Then the discovery of antimicrobial agents and their specific target induced the emergence of selective media. These inhibiting agents thus make it possible to eliminate undesirable bacteria from microbiota and select the desired bacteria. Thanks to a better knowledge of the bacterial environment, it will be possible to develop new culture media and new culture conditions, better adapted to certain fastidious bacteria, difficult to isolate.

## **Introduction**

The discovery of culture media allowed the development of microbiology in the 19th century (1). Bacterial culture was the first method developed to study the human microbiota (2) using an artificial medium that allows growth and isolation of bacteria. The first to have cultured a bacterium in a reproducible way was Louis Pasteur in 1860 thanks to the development of the first so-called artificial culture medium (3). Recently, after the emergence of molecular techniques in the 1970s such as PCR, sequencing and more particularly metagenomics, microbiologists have favoured these innovative techniques to the detriment of culture. Nevertheless, metagenomics presents certain disadvantages and in particular a depth bias, due to the lack of sensitivity of the primers used, since it does not detect bacteria present at concentrations below  $10^5$  bacteria per gram of stool (2). Moreover, these techniques only detect DNA: it is impossible with these techniques to differentiate DNA belonging to living bacteria, from that of the transient bacteria of the microbiota studied or from that of dead bacteria.

A few years ago, culturomics, a new culture technique, which uses a very large number of culture media and culture conditions to extend the repertoire of bacteria, was developed in our laboratory (2). This technique demonstrates the complementarity between metagenomics and culturomics. Therefore, the metagenomical identification of bacterial species existing in a given microbiota can be exploited by culturomics through the optimization of new specific culture media for the isolation of these species. This complementarity allows culturomics to become a targeted technique.

Nowadays, new culture media mimic the natural environment of bacteria by adding different elements in culture medium to cultivate previously uncultivated bacteria.

We propose here a bibliographical review of culture media and techniques evolution through the development of microbiology over time.



## **I. Empirical approach of microbiology**

### **I.1. Observational microbiology**

Microbiology is defined by the organisms it studies but also by the tools used to study them. The first observation of a bacterium was made around 1673 by the German microscopist Anton van Leeuwenhoek thanks to the microscopes he had developed. Those enlarged from 50 to 300 times what he observed (1, 3).

In the course of his research, he highlighted small structures that he called "animacules" (4), because he thought he was observing small animals (5). Throughout his observations, he described and designed yeast cells, filiform fungi, microscopic algae and protozoa (4). Leeuwenhoek was also the first to observe a parasite, *Giardia lamblia* (3). However, microscopy alone cannot address all the questions about the microorganisms studied. For about 200 years, microbiology has been stagnating until the development of microbial isolation techniques in pure cultures. This is another important milestone in the history of microbiology.

### **I.2. Cultural microbiology**

#### **I.2.1. The birth of culture broth**

In the 13th century AD, 400 years before Leeuwenhoek, a blood-like substance appeared on the communion bread and into beliefs this red substance was assimilated the blood of Christ. Bartholomeo Bizio, an Italian pharmacist, solved this mystery in 1817 thanks to advances in microbiology and showed that it was not blood, but a microorganism that he named *Serratia marcescens*. This bacterium appeared as red colonies on bread when was kept in a hot and humid atmosphere (6). It is one of the first natural cultures of a bacterium. The origins of culture media is traceable to the 19th century. Many bacteriologists have tried, with varying degrees of success, to grow bacteria on the food or material on which the microorganism was developed in the first place.

The evolution of microbiology was made possible by challenging the theory of spontaneous generation, according to which living organisms could develop from dead or decaying matter and thus appear spontaneously in cultures. So it was inconceivable to obtain pure cultures. In 1861, Louis Pasteur, a French microbiologist (3), solved this problem through an experiment. He placed nutrient solutions in flasks, heated their necks with flame and stretched them in various ways, keeping the end open to the air. Then Pasteur boiled the solutions for a few minutes and cooled them. No growth appeared even if the contents of the flasks had been exposed to the air. Pasteur noticed that there was no growth because dust and germs had been trapped on the walls of the curved tubes. If the tubes were broken, growth began immediately. Pasteur thus demonstrated the spontaneous generation nonsense and also found ways to keep sterile solutions (3).

The first to have cultured bacteria reproducibly in a liquid culture medium was Louis Pasteur. In 1860, he developed a culture medium containing "yeast soup", ashes, sugar and ammonium salts (7, 8). His objective was to create a fermentation medium to demonstrate that each fermentation (alcoholic, acetic, lactic ...) was associated with the development of a particular microorganism (9). The presence of these different elements in the medium allowed him to observe that some of these components could promote or inhibit the growth of certain bacteria and that they could also allow the emergence of certain bacteria compared to others (8).

Indeed, in the course of the study of fermentation of beer, he was confronted with a problem: when the beer was healthy, the microscope only showed brewer's yeast but when the beer was acid, Pasteur noticed that the tanks contained "tiny rod-shaped objects" producing lactic acid. This fermentation medium therefore made it possible to highlight the multiplication of this bacterium (1, 3).

In 1881, Robert Koch demonstrated optimal growth of bacteria when they were incubated in a broth composed of fresh beef serum or meat extract. However, the use of a liquid culture medium did not produce pure bacterial cultures. Koch therefore sought a way to solidify the media (8) (figure 1).

### **I.2.2. Emergence of pure cultures in solid media**

First, he tested coagulated egg albumin, starch paste or an aseptically cut slice of potato. However, not all these techniques allowed him to isolate colonies. Koch then added gelatin to his broth and poured it all over a flat glass plate. However, gelatin had disadvantages since it liquefied at temperatures above 25°C and could be consumed by gelatinase, an enzyme produced by certain bacteria. Thanks to the wife of one of his assistants, Fannie Hesse, who used agar to solidify his jams, he replaced gelatin with agar, which allowed him to obtain firm agars and isolate bacteria. In 1887, Julius Richard Petri replaced the glass plate with a circular culture box, the Petri box has just been created, and is still used today (8). This allowed him to obtain and observe isolated colonies and to limit contamination.

## **II. How to design an enriched culture medium?**

An enriched culture medium is a medium to which elements essential for the growth of bacteria have been added.

### **The nutrients**

To grow, bacteria need a minimum of nutrients: water, a carbon source, a nitrogen source and some mineral salts (10).

### **Water**

Water plays a fundamental role in solubilizing nutrients, transporting them and ensuring hydrolysis reactions. Some bacteria need free water for their growth. If evaporation occurs

during the incubation of the agar, there may be a loss of this water, resulting in a decrease in colony size and inhibition of bacterial growth (10, 11).

### **Carbon sources**

Carbon is the most abundant constituent element in bacteria. It is essential for bacteria to produce carbon molecules such as fats, carbohydrates, proteins and nucleic acids. Bacteria can use inorganic carbon sources, such as carbon dioxide, or organic sources such as sugars and alcohols (10, 12).

### **Nitrogen sources**

As for nitrogen sources, they are numerous and can be found in a large number of compounds used in the composition of a culture medium. It is found in the organic form, corresponding to protein hydrolysates, particularly in casein hydrolysate, proteose-peptone or tryptone (12) but also in an inorganic form, nitrates (13). Nitrogen allows bacteria to synthesize their proteins.

Finally, among the common mineral salts, phosphate, sulphate, magnesium or calcium (11) are regularly found.

### **Energy sources**

There are two types of bacteria, phototrophic bacteria, such as *Thiocapsa roseopersicina* (14) which uses light as an energy source by transforming it into an electrochemical gradient of protons (14) and chemotrophic bacteria which uses the energy of oxidation of mineral or organic compounds as energy sources (15, 9). Among these bacteria, we can find *Listeria monocytogenes* (16).

### **Growth factors**

The use of a minimal medium does not allow the growth of certain bacteria that need specific elements to grow. It is sometimes necessary to add growth factors to culture media in order to

boost the multiplication of bacteria. Growth factors are elements that bacteria are unable to synthesize from the nutrients available in the environment (10, 17). Growth factors are required in small quantities in the culture medium and their need is justified by the absence or blocking of a metabolic pathway in the bacterium.

### **Purine and pyrimidine bases**

There are different categories of growth factors among which we find purine and pyrimidine bases. They are necessary for synthesis of nucleic acids. Indeed, some lactic acid bacteria need adenine, guanine, thymine or uracil for growth (17). This is the case in particular for the bacterium *Leuconostoc mesenteroides*, for which guanine is essential for its growth (18).

### **Amino acids**

Amino acids are also growth factors and are used for protein synthesis. Dunn et al (19) showed in 1946 that only 2 amino acids were essential for *Leuconostoc mesenteroides*, glutamic acid and valine while for *Lactobacillus brevis*, no less than 15 amino acids were necessary for its growth. This high requirement for amino acids can be explained by the fact that the base medium used at the time was not rich in common nutrients. Indeed, nowadays, *Lactobacillus brevis* grows on a COS agar (Columbia Blood Agar) (Biomérieux, France), not supplemented with amino acids (20) but composed of casein hydrolysate and peptone proteose, themselves sources of amino acids (11).

### **Vitamins**

Vitamins are also part of growth factors. They are coenzymes or precursors of coenzymes. A vitamin is an organic substance, necessary in small quantities for the metabolism of a living organism, which cannot be synthesized in sufficient quantity by that organism. *Faecalibacterium prausnitzii*, which is a tedious bacterium, requires a large number of vitamins to grow, such as biotin, folic acid, riboflavin or vitamin B12 (21). This bacterium also requires

the presence of other growth factors such as volatile fatty acids (acetic acid, propionic acid or valeric acid) (21).

### **Blood use and its derivatives**

Blood and its derivatives will also boost the growth of certain bacteria. In culture media, it is common to use sheep's blood or horse's blood. The role of blood is to act as a protective agent against toxic oxygen radicals (22) but also as a nutritional supplement. For example, sheep's blood provides the factor X (heme) necessary for the growth of many pathogenic species, including *Haemophilus influenzae* (23). Most often, 5% blood is added to culture media (22). Serum, such as fetal calf or lamb serum, can also be used as a growth factor by providing a large number of elements such as lipids, vitamins, triglycerides, minerals and others (24). This blood that has been cleared of cells, platelets and clotting factors. Fetal calf serum, which is most commonly used in microbiology (25, 26), must be inactivated by heat before use (56°C for 30 min) in order to inactivate all components of the complement system present in this serum (27, 28). It must be stored at -20°C and heated to room temperature rather than in a water bath to avoid deterioration of the proteins it contains.

### **Rumen fluid**

Finally, it is also possible to use the rumen fluid (29, 2) to promote the growth of certain bacterial species by mimicking their natural environment. The rumen fluid used corresponds to the rumen of the sheep. To prepare it, it is first necessary to recover the juice from the fermented plants in the stomach by filtering it through a fine cloth. This juice is then centrifuged (10,000 rpm for 90 min) and the supernatant is collected. Then, it undergoes 3 successive filtrations at 0.8µm, 0.45µm and 0.22µm (2, 30). 5% rumen juice is usually added to the culture media. The rumen fluid can promote the growth of certain *Treponema* such as *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens* (31).

## **Antioxidants**

Some anaerobic bacteria are fastidious to grow and new culture strategies have been developed to isolate them. Indeed, anaerobic bacteria are most abundant in the human intestinal microbiota, accounting for up to 99.9% of total bacteria (32) and are extremely sensitive to oxygen, which is toxic to it. Antioxidants have therefore been added to culture media to allow the culture of strict anaerobic bacteria under aerobic conditions (33, 34). A number of antioxidants have been tested and have shown satisfactory results. This is the case for ascorbic acid and glutathione (34) or uric acid (35). The addition of these antioxidants to the culture medium and its incubation under aerobic conditions allowed the growth of 135 strict anaerobic bacteria, 12 microaerophilic bacteria and 22 strict aerobic bacteria (35).

### **III. How can we have a selective culture medium?**

A selective culture medium is used to isolate a particular bacterial species or genus. After the addition of a number of inhibitors to the culture medium, the objective of this type of media, is to eliminate unwanted microbial flora. The selective medium is composed of a basic medium to which antibiotics, chemicals, dyes, antiseptics, sodium salts or phages can be added (36).

## **Antibiotics**

Antibiotics are the most commonly used selective agents. Their spectrum of action being well known, so it's easier to anticipate their action on bacteria. There are a large number of antibiotics that can be used in culture media, some of which are called antibacterial because they target bacteria and others antifungal because they eliminate fungi and yeasts (37). Some molecules target Gram positives, such as penicillin G, bacitracin or vancomycin, while others target Gram negatives such as colistin or polymixin B. Amphotericin B, cycloheximide or

nystatin have an action against fungi and yeasts. (cf Table 1 and 2) (39, 10). Several antibiotics can be combined to obtain a more selective medium (37).

### **Antiseptics**

Antiseptics are more rarely used in culture media. However, cetrimide (43, 44) or acriflavin (10) can be found in some culture media. Chlorhexidine can be used to select *Mycobacterium tuberculosis* (45, 46) (cf Table 3). Ethanol can also select bacterial species, including sporulated bacteria (51, 52) such as *Clostridium difficile* (51).

Cetrimide Agar Base is a culture medium used to selectively isolate and identify *Pseudomonas aeruginosa*. Cetrimide is a quaternary ammonium that inhibits a large number of bacteria including those of the genus *Pseudomonas*, other than *P. aeruginosa* (10).

### **Sodium salts**

Sodium salts are known for their inhibitory properties. The best known is sodium chloride, which is used to select halophilic bacteria that resist very high amounts of salts (53). In addition, sodium deoxycholate has a strong solvent action on bacteria (54) (cf Table 4).

The Marine Agar 2216E culture medium is used to enumerate marine heterotrophic bacteria. It is composed of a high concentration of salt, which eliminates a large number of bacteria and preserves marine bacteria of interest (55).

### **Chemical substances**

Chemical substances can be added to culture media to inhibit certain bacteria. These inhibiting substances include potassium tellurite and bile salts which inhibit Gram-positive bacteria (47, 10, 39) or lithium chloride (10, 39), which eliminates Gram-negative bacteria (cf Table 5).

Brayton *et al* (48) have created a selective culture medium for *Vibrio vulnificus*, which is a pathogenic halophilic bacterium. This medium, VV agar, consists, among other things, of potassium tellurite as selective agent for inhibiting *Enterobacteriaceae*.



## **Dyes**

Dyes can be used as a color indicator in a culture medium or as a selective agent against certain bacteria. Cristal violet is one of the most commonly used dyes to inhibit bacteria (37, 49). Malachite green and methylene blue are also used to inhibit Gram positive and negative bacteria and Gram positive bacteria respectively (10, 50) (*cf* Table 6).

A selective medium of *Streptococcus pneumoniae* has been developed, containing crystal violet. This dye is used to select *Streptococci* and inhibit *Staphylococci* and other Gram-positive bacteria (49).

## **Phages**

Bacteriophages are specific virus of bacteria that can infect and even destroy bacteria, in the case of lytic phages. In order to isolate *Mycobacterium tuberculosis*, the use of phage lysin decontaminates the sputum of other bacteria present in the pulmonary microbiota (56).

Sillankorva *et al* (57) worked on permanent urinary tract infections due to *Escherichia coli*. In order to treat these infections, they tested different phages (T1, T4, and phiX174 like phages) against *E. coli*. After 2 hours of treatment, phage T1 reduced the *E. coli* population by 45%, thus demonstrating the efficacy of this selective agent.

## **IV. Disadvantages of gelling agents use**

### **IV.1 Liquid culture media versus solid culture media**

There are two main types of culture media, liquid and solid culture media.

In liquid culture media, also called culture broths, nutrients are dissolved in water. The growth of bacteria in this type of medium can be demonstrated by the appearance of a turbidity in the medium, although this is not always the case. It's difficult to isolate a bacterium specifically in this type of medium. Indeed, bacteria obtained from a sample inoculated into the culture broth

are all mixed with each other. In addition, this type of culture medium does not allow the morphological characteristics of bacterial species to be identified (9).

However, liquid culture media facilitate access to nutrients for bacteria. These nutrients are all the more accessible as culture media are incubated under agitation, allowing a renewal of nutrients for bacteria.

Solid culture media are obtained by adding a gelling agent, such as agar, to the culture broth. They make it possible to obtain isolated colonies of different bacterial species, which can be identified. The different morphological characteristics of the bacterium can be described from these cultures (9, 58). However, in solid culture media, access to nutrients for bacteria may be limited. Media with a high gel content, such as agar, will form smaller colonies than low gel content media because nutrient flow and toxin removal are reduced (7).

In addition, it has been shown that agar, in excessive quantities, can inhibit the growth of certain bacteria, demonstrating the need to find other gelling agents (9).

#### **IV.2 Different gelling agents**

One of the first gelling agents used in culture media was gelatin. The problem with this gelling agent is that it melts at 37°C, which is the incubation temperature of most bacteria. Moreover, the presence of an enzyme in certain bacteria, gelatinase, causes the digestion of gelatin and therefore its degradation. Agar was then used in culture media. However, over-consumption of agar has led to a reduction in its source, red algae (59), thus increasing costs. In addition, agarase, present in some bacteria, destroys agar, thus preventing the isolation of these bacteria (60). Finally, agar can cause inhibition of PCR of fungal DNA when extracted directly from the solid culture medium (61). For all these reasons, new gelling agents have been sought. These gelling agents include  $\kappa$ -carrageenan,  $\iota$ -carrageenan, sodium alginate, HM and LM pectins,

gellan gum (60, 62). All these gelling agents have different properties and particular needs to gel (*cf* Table 7).

### **Carrageenan gums**

$\kappa$ -carrageenan and  $\iota$ -carrageenan are part of the carrageenan gums.

The first will form a firm gel with a rapid mass build-up when combined with potassium ions. It allows the growth of some bacteria. This gelling agent resists very alkaline pH values above 12.5, thus isolating highly very alkalineophilic bacteria (63). It can be used to replace agar because many bacteria grow on  $\kappa$ -carrageenan-based media (64).

$\iota$ -carrageenan is rarely used because it gives elastic gels that make difficult bacterial culture (64).

### **Sodium alginate**

This gelling agent is produced from brown seaweed extract and form a flexible gel in the presence of calcium ions. However, this gelling agent does not provide a gel firm enough to grow bacteria (62).

### **HM and LM pectins**

HM pectins require sugar and high acidity to gel, gel setting is slow and results in the formation of a "spreadable" gel.

LM pectins form brittle gels in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  (61).

### **Gellan gum**

Gellan gum is a polysaccharide produced by a bacterial genus, *Sphingomonas spp.* According to Tamaki *et al* (65), 108 bacteria tested on media with gellan gum as gelling agent showed growth.

The use of these different gelling agents could allow the culture of new bacteria, which do not grow on the agar, because of the presence of an agarase for example or because the agar forms a network too dense to allow motility and optimal growth of certain bacteria (9).

### **IV.3 Colony size**

The amount of nutrients available in a culture medium will determine the size of bacterial colonies (58). An overly firm culture medium, due to a high concentration of gelling, causes a decrease in the flow of nutrients and thus a decrease in the access of these nutrients to bacteria (7, 9). On the other hand, in some culture media, the amount of nutrients available is too high and can be toxic for certain bacteria that need a poor culture medium to grow (67). Microcolonies are colonies that are barely visible to the naked eye (between 100 and 300  $\mu\text{m}$  in diameter). To obtain larger colonies, it is sometimes necessary to mimic the bacterium's natural environment by providing it with specific elements. This is the case, for example, for *Phascolarctobacterium faecium* and *Phascolarctobacterium succinatutens*, which form microcolonies, but when the medium is supplemented with succinate, the colonies have a diameter ranging from 0.8 to 1.2 mm (68, 69).

## **Conclusion**

After a stagnation in the development of new culture techniques, due to the rapid evolution of new microbiological methods such as metagenomics, bacterial culture is experiencing a new boom. In recent years, culturomics, with the use of new culture media and new culture conditions, has enabled the enrichment of the bacterial repertoire through the isolation of new bacterial species. This shows that despite the abandonment of culture by a large number of microbiologists, culture media remain a fundamental tool for bacteriologists for the isolation of commensal but also pathogenic bacteria.

Studying the natural environment of bacteria that remain uncultivated to date would be interesting because it would provide the essential element for the bacteria to grow. Indeed, although there are many enriched culture media, each bacterium is unique and requires specific needs. The use of new gelling agents could also allow the isolation of new species for which agar was not suitable for their growth. Although many gelling agents have been tested, few are still used in commercial culture media and therefore in laboratories. Many developments in bacterial culture are therefore still to come, making it possible to enrich the bacterial repertoire and gain a better understanding of certain diseases.

## References

- 1) Wainwright M., Lederberg J. History of microbiology. *Encyclopedia of microbiology*, 1992. 2, 419-37.
- 2) Lagier J. C., Hugon P., Khelaifia S., Fournier P. E., La Scola B., Raoult D. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clin Microbiol Rev.* 2015; 28(1), 237-64.
- 3) Prescott L. M., Willey J. M., Sherwood L. M., Woolverton C. J. *Microbiologie*. 5ème édition. Louvain-la-Neuve: De Boeck Supérieur; 2018.
- 4) Pommerville J. C. *Fundamentals of microbiology*. 10th edition. Burlington: Jones & Bartlett; 2013.
- 5) Weeks, B. *Alcamo's Microbes and Society*. 3<sup>rd</sup> edition. Sudbury: Jones & Bartlett; 2012.
- 6) Gillen Allan, Rebekah Gibbs. *Serratia Marcescens: The Miracle Bacillus*. Answers in Genesis, 20 July 2011 [en ligne]. 2011 [cite le 20 mai 2019]. Disponible: <https://answersingenesis.org/biology/microbiology/serratia-marcescens-the-miracle-bacillus/>
- 7) Murray P. R., Rosenthal K. S., Pfaller M. A. *Medical microbiology*. 8<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2015.
- 8) Sandle T. History and development of microbiological culture media. *The Journal (Institute of Science and Technology)*. 2011; 10-4
- 9) Institut Pasteur. La génération spontanée, le grand débat [en ligne]. [consulté le 21 mai 2019]. Disponible : <https://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/notre-histoire/deuxieme-epoque-1862-1877>.
- 10) Kumar S. *Textbook of microbiology*. New Delhi: JP Medical Ltd; 2012.
- 11) Power, D. A., & Johnson, J. A. *Difco™ & BBL™ manual*. 2<sup>nd</sup> edition. Sparks: Becton, Dickinson and Company; 2009.
- 12) Atlas R. M. *Handbook of microbiological media*. 3rd edition. CRC press ; 2010.
- 13) Latge, J. P. Croissance et sporulation de 6 espèces d'Entomophthorales II. Influence de diverses sources d'azote. *Mycopathologia*, 1975 ; 57(1), 53-7.
- 14) Yurkov V. V., Beatty J. T. Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria. *Microbiol Mol. Biol Rev.* 1998; 62(3), 695-724.
- 15) Thauer R. K., Jungermann K., Decker K. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev.* 1977, 41(1), 100.
- 16) Van der Horst M. A., Key J., Hellingwerf K. J. Photosensing in chemotrophic, non-phototrophic bacteria: let there be light sensing too. *Trends Microbiol.* 2007; 15(12), 554-62.
- 17) Werkman C. H., Wilson P. W. *Bacterial physiology*. New-York: Academic Press Inc; 1951.

- 18) Snell E. E., Mitchell H. K. Purine and Pyrimidine as Growth Substances for Lactic Acid Bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1941; 27(1), 1.
- 19) Dunn M. S., Shankman S., Camien M. N., Block H. The amino acid requirements of twenty-three lactic acid bacteria. *J Biol Chem*. 1947; 168(1), 1-22.
- 20) Magdoub M. N., Hassan Z. M., Effat B. A., Sadek Z. I., Tawfik N. F., Mabrouk A. M. Probiotic properties of some lactic acid bacteria isolated from Egyptian dairy products. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2015; 4(12), 758-66.
- 21) DSMZ. YCFA MEDIUM (modified). [en ligne]. 2015 [consulté le 21 mai 2019]. Disponible: [https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium1611.pdf](https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium1611.pdf)
- 22) Collins C. H., Lyne P. M. *Microbiological methods*. 3rd edition. London: Arnold; 1970
- 23) Becton Dickinson. BD Columbia Agar with 5 % Sheep Blood. Mode d'emploi : milieux en boites de Petri prêts à l'emploi [en ligne]. 2013 April [consulté le 21 mai 2019]. Disponible: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8816>.
- 24) Gemini Bio-Products. Care and Use of Animal Sera [en ligne]. [consulté le 21 mai 2019]. Disponible : <https://www.gembio.com/product/sheep-serum>.
- 25) Merck. Fetal Bovine Serum (FBS) for cell culture [en ligne]. [consulté le 21 mai 2019] Disponible: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/cell-culture-products.html?TablePage=9628642>.
- 26) Northoff, H., & Flegel, W. A. Fetal Calf Serum. In: Hinnak Northoff, Willy A. Flegel. *Encyclopedia of Immunology*. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 1998. 896-7.
- 27) Meenakshi A. Fetal Bovine Serum. *Cell Culture Media: A Review* [en ligne]. 2013 [consulté le 22 mai 2019]. Disponible : <https://www.labome.com/method/Cell-Culture-Media-A-Review.html>
- 28) Rahman H., Qasim M., Schultze F. C., Oellerich M., Asif, A. R. Fetal calf serum heat inactivation and lipopolysaccharide contamination influence the human T lymphoblast proteome and phosphoproteome. *Proteome Sci*. 2011; 9(1), 71.
- 29) Lagier J. C., Armougom F., Million M., Hugon P., Pagnier I., Robert C., *et al.* Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18(12), 1185-93.
- 30) Goodman A. L., Kallstrom G., Faith J. J., Reyes A., Moore A., Dantas G., *et al.* Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice. *Proc Natl Acad Sci*. 2011; 108(15), 6252-7.
- 31) Szykiewicz ZM, Binek M. Evaluation of selective media for primary isolation of *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 1986; 9, 71-7.
- 32) Bennett J. E., Dolin R., Blaser M. J. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 8<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2014. Vol. 1.
- 33) Lagier J. C., Edouard S., Pagnier I., Mediannikov O., Drancourt M., Raoult D. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect*. 2015; 28(1), 208-36.

- 34) La Scola B., Khelaifia S., Lagier J. C., Raoult D. Aerobic culture of anaerobic bacteria using antioxidants: a preliminary report. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014; 33(10), 1781-3.
- 35) Dione N., Khelaifia S., La Scola B., Lagier J. C., Raoult D. A quasi-universal medium to break the aerobic/anaerobic bacterial culture dichotomy in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect.* 2016 ; 22(1), 53-8.
- 36) Harrigan W. F. *Laboratory methods in food microbiology.* 3<sup>rd</sup> edition. California: Academic Press; 1998.
- 37) Entis, P. *Food Microbiology: The Laboratory.* Washington D. C: The Food Processor Institute; 2002.
- 38) ECN Pilly, *Maladies infectieuses et tropicales.* 5<sup>ème</sup> edition. Paris : Alinéa ; 2018. 324.
- 39) Delarras, C. *Pratique en microbiologie de laboratoire? Recherche de bactéries et de levures-moisissures.* Paris : Lavoisier; 2014.
- 40) Sachan N., Agarwal R. K. Selective enrichment broth for the isolation of *Aeromonas* sp. from chicken meat. *Int J Food Microbiol.* 2000; 60(1), 65-74.
- 41) Corry J. E., Curtis G. D., Baird R. M. 3<sup>rd</sup> edition. *Handbook of culture media for food and water microbiology.* Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2011.
- 42) Bartram J., Chartier Y., Lee J. V., Pond K., Surman-Lee S. *Legionella and the prevention of legionellosis.* Switzerland: World Health Organization; 2007.
- 43) Brown V. I., Lowbury E. J. L. Use of an improved cetrinide agar medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Pathol.* 1965; 18(6), 752-6.
- 44) Oa O. Eabomo O. Antimicrobial activities of chlorhexidine gluconate and cetrinide against pathogenic microorganisms isolated from slaughter houses in rivers state, Nigeria. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2015; 7(3), 322-8.
- 45) Asmar S., Drancourt, M. Chlorhexidine decontamination of sputum for culturing *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Microbiol.* 2015; 15(1), 155.
- 46) Asmar S., Chatellier S., Mirande C., van Belkum A., Canard I., Raoult D., *et al.* A chlorhexidine-agar plate culture medium protocol to complement standard broth culture of *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Microbiol.* 2016 ; 7, 30.
- 47) Becton Dickinson. *BD Tellurite Agar (Hoyle). Mode d'emploi : milieux en boites de Petri prêts à l'emploi [en ligne].* 2003 June [consulté le 26 mai 2019]. Disponible: <https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/FR-PA-256044.pdf>
- 48) Brayton P. R., West P. A., Russek E., Colwell R. R. New selective plating medium for isolation of *Vibrio vulnificus* biogroup 1. *J Clin Microbiol.* 1983; 17(6), 1039-44.
- 49) Nichols T., Freeman R. A new selective medium for *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Pathol.* 1980; 33(8), 770-3.
- 50) Arroyo G., Arroyo J. A. Selective action of inhibitors used in different culture media on the competitive microflora of *Salmonella*. *J Appl Microbiol.* 1995; 78(3), 281-9.



- 51) Browne H. P., Forster S. C., Anonye B. O., Kumar N., Neville B. A., Stares M. D., *et al.* Culturing of 'unculturable' human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature*. 2016; 533(7604), 543.
- 52) Koransky J. R., Allen S. D., Dowell V. R. Use of ethanol for selective isolation of sporeforming microorganisms. *Appl Environ Microbiol*. 1978; 35(4), 762-5.
- 53) Seck E. H., Dufour J. C., Raoult D., Lagier, J. C. Halophilic & halotolerant prokaryotes in humans. *Future Microbiol*. 2018; 13(07), 799-812.
- 54) Leifson E. New culture media based on sodium desoxycholate for the isolation of intestinal pathogens and for the enumeration of colon bacilli in milk and water. *J Pathol Bacteriol*. 1935; 40(3), 581-99.
- 55) Patrick F. M. The use of membrane filtration and marine agar 2216E to enumerate marine heterotrophic bacteria. *Aquac*. 1978; 13(4), 369-72.
- 56) Subramanyam B., Sivaramakrishnan G. N., Dusthacker A., Nagamiah S., Kumar, V. Phage lysin as a substitute for antibiotics to detect *Mycobacterium tuberculosis* from sputum samples with the BACTEC MGIT 960 system. *Clin Microbiol Infec*. 2012; 18(5), 497-501.
- 57) Sillankorva S., Oliveira D., Moura A., Henriques M., Faustino A., Nicolau A., *et al.* Efficacy of a broad host range lytic bacteriophage against *E. coli* adhered to urothelium. *Curr Microbiol*. 2011; 62(4), 1128-32.
- 58) Denyer S. P., Hodges N. A., Gorman S. P. Hugo and Russell's pharmaceutical microbiology. 7<sup>th</sup> edition. Massachusetts: Blackwell science; 2008.
- 59) McLachlan, J. Macroalgae (seaweeds): industrial resources and their utilization. In *Biosalinity in Action: Bioproduction with Saline Water*. Dordrecht: Springer; 1985. 137-57.
- 60) Das N., Triparthi N., Basu S., Bose C., Maitra S., Khurana, S. Progress in the development of gelling agents for improved culturability of microorganisms. *Front Microbiol*. 2015; 6, 698.
- 61) Schmidt D., Rath, P. M. Faster genetic identification of medically important aspergilli by using gellan gum as gelling agent in mycological media. *J Med Microbiol*. 2003; 52(8), 653-5.
- 62) Doublier J. L. Les systèmes alimentaires gélifiés: structure et propriétés fonctionnelles. 9<sup>ème</sup> Colloque de l'Alliance 7 / CEDUS : Le sucre et la conservation des produits à base de fruits [en ligne]. 2001 Fev [consulté le 26 mai 2019]. Disponible : <https://www.cultures-sucre.com/document/les-systemes-alimentaires-gelifies-structure-et-proprietes-fonctionnelles/>.
- 63) Datta S., Mody K., Gopalsamy G., Jha B. Novel application of  $\kappa$ -carrageenan: as a gelling agent in microbiological media to study biodiversity of extreme alkaliphiles. *Carbohydr Polym*. 2011; 85(2), 465-8.
- 64) Abbott I. A., Chapman, F. A. Evaluation of kappa carrageenan as a substitute for agar in microbiological media. *Arch Microbiol*. 1981; 128(4), 355-9.

- 65) Tamaki H., Hanada S., Sekiguchi Y., Tanaka Y., Kamagata Y. Effect of gelling agent on colony formation in solid cultivation of microbial community in lake sediment. *Environ Microbiol.* 2009; 11(7), 1827-34.
- 66) Tako, M. The principle of polysaccharide gels. *Adv Biosci Biotechnol.* 2015; 6(01), 22.
- 67) Ferrari B. C., Binnerup S. J., Gillings M. Microcolony cultivation on a soil substrate membrane system selects for previously uncultured soil bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(12), 8714-20.
- 68) Del Dot T., Osawa R., Stackebrandt E. *Phascolarctobacterium faecium* gen. nov, spec. nov., a novel taxon of the *Sporomusa* group of Bacteria. *Syst Appl Microbiol.* 1993; 16(3), 380-4.
- 69) Watanabe Y., Nagai F., Morotomi M. Characterization of *Phascolarctobacterium succinatutens* sp. nov., an asaccharolytic, succinate-utilizing bacterium isolated from human feces. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78(2), 511-8.

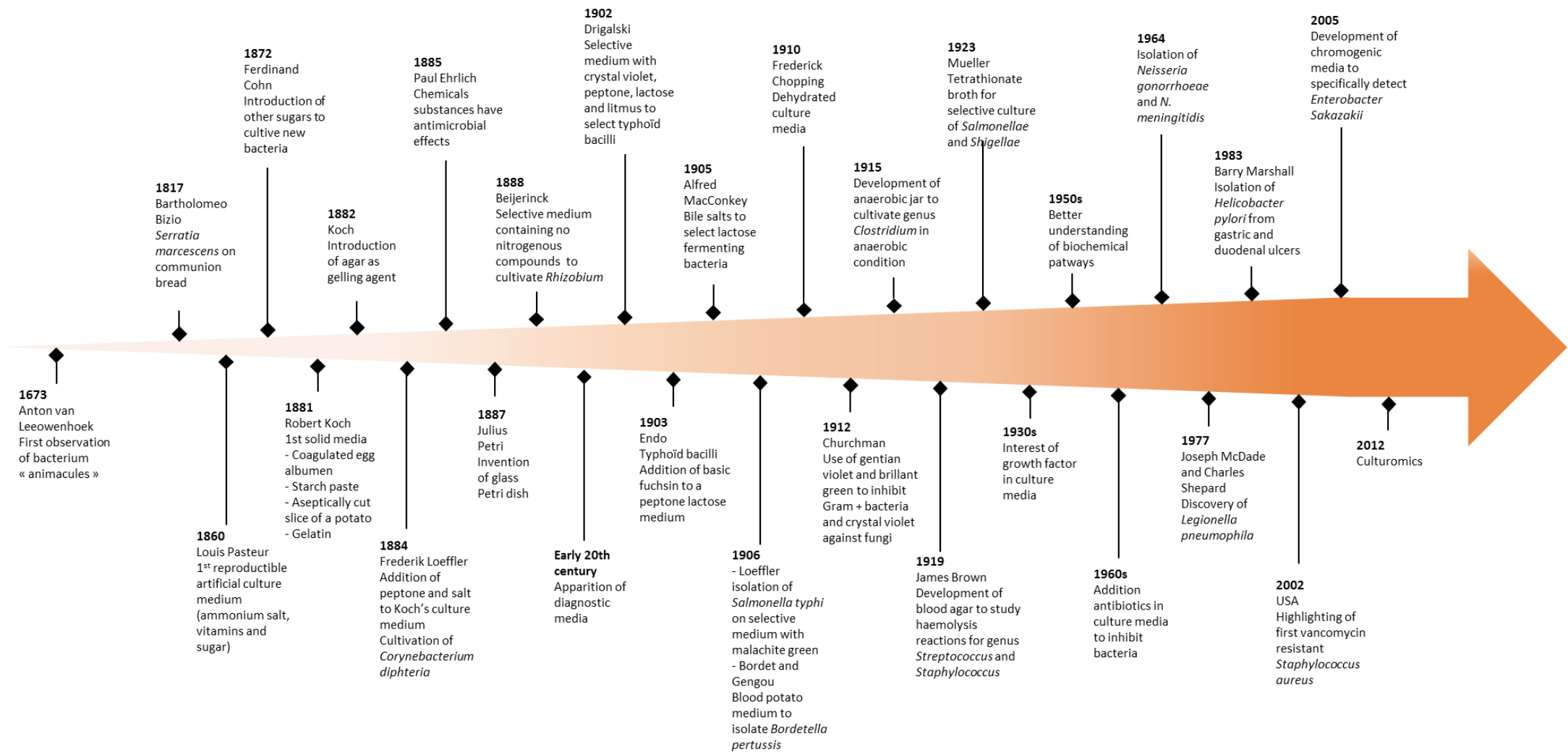


Figure 1: Evolution of culture media over time

Table 1: Antibiotics ✓ Action against bacteria or fungi ✗ No action against bacteria or fungi

Inhibitors		Microorganisms			Example of culture media	References
		Gram +	Gram -	Fungi, yeast		
Antibiotics	Penicillins	Penicillin G	✓	✗	✗	*A7 Agar modified ECN Pilly 2018 (38) Power et al, 2009 (11)
	Cephalosporins	Cefalotin (1ère gen)	✓	✓ <i>Enterobacteria</i>	✗	*Cefalotin buffered dextrin broth Sachan and Agarwal, 2000 (40) Corry et al, 2012 (41)
		Cefamandole (2ème gen)	✓	✓ <i>Enterobacteria</i>	✗	*BCYE supplemented with Cefamandole Bartram et al, 2007 (42)
		Cefixime (3ème gen)	✓ Cocci	✓ Bacillus	✗	*MacConkey Sorbitol agar (CT-SMAC) Delarras, 2014 (39)
		Ceftazidime (3ème gen)		✓	✗	*Palcam medium Delarras, 2014 (39)
	Carboxypenicillins	Ticarcillin	✓	✓ Aerobic bacillus	✗	*PC agar Power et al, 2009 (11)
	Diaminopyrimidines	Trimethoprim	✓	✓	✗	*Bolton broth * Preston Agar and Broth Delarras, 2014 (39)
	Nitrofurane	Nitrofurantoin	✓ Especially those of the urinary tract	✓ Especially those of the urinary tract	✗	*Differentiation test Delarras, 2014 (39)
	Phenicolés	Chloramphenicol	✓	✓	✗	*Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar *Chloramphenicol Sabouraud Agar Delarras, 2014 (39)
	Rifamycines	Rifampicine	✓	✓ Other than Enterobacteria	✗	*Preston Agar and Broth Delarras, 2014 (39)
Tetracyclines	Oxytetracycline	✓	✓	✗	*OGYE Agar Base Power et al, 2009 (11)	
Macrolides	Erythromycin	✓	✓	✗	Gallery API Campy Biomérieux Delarras, 2014 (39)	

Table 2: Rest of antibiotics

✓ Action against bacteria or fungi ✗ No action against bacteria or fungi

Inhibitors		Microorganisms			Example of culture media	References	
		Gram +	Gram -	Fungi, yeast			
Antibiotics	Polypeptides	Polymyxin B	✗	✓ Aerobic	✗	*PALCAM Medium Base *SPS Agar *TSN Agar	Power et al, 2009 (11)
		Colistin	✗	✓ Aerobic	✗	* Oxford Agar *Campyloset Agar *Thayer-Martin Selective Agar	Power et al, 2009 (11)
		Bacitracin	✓		✗	*Chocolate II Agar with Bacitracin *Haemophilus Isolation Agar with Bacitracin	Power et al, 2009 (11)
	Quinolones	Nalidixic acid	✗	✓ Enterobacteria	✗	*Todd Hewitt Broth with Gentamicin and Nalidixic Acid *UVM Modified Listeria Enrichment Broth *Columbia CNA Agar	Power et al, 2009 (11)
	Aminosides	Neomycin	✓ Aerobic	✓ Aerobic	✗	*Lecithin Lactose Agar *Neomycin Blood Agar *TSN Agar	Power et al, 2009 (11)
		Gentamycin	✓ Aerobic	✓ Aerobic	✗	*Todd Hewitt Broth with Gentamicin and Nalidixic Acid	Power et al, 2009 (11)
	Glycopeptides	Vancomycin	✓	✗	✗	*Vancomycin Screen Agar *Anaerobe Laked Sheep Blood Agar with Kanamycin and Vancomycin	Power et al, 2009 (11)
		Fosfomycin (Natural antibiotic)	✓ Aerobic	✓ <i>Enterobacteria</i>	✗	*Oxford Agar	Power et al, 2009 (11)
		Novobiocin	✓	✓ Cocci	✗	*CIN Agar *Yersinia Antimicrobial Supplement CN *EC Medium, Modified	Power et al, 2009 (11)
	Antibiotics Antifungal	Amphotericin B	✗	✗	✓	*Campylobacter Antimicrobial Supplement Blaser *Butzler Agar *Campyloset Agar	Power et al, 2009 (11) Delarras, 2014 (39)
		Cycloheximide	✗	✗	✓	*Brain Heart CC Agar *Dermatophyte Test Medium Base *m E Agar	Power et al, 2009 (11)
		Nystatin	✗	✗	✓	*Thayer-Martin Selective Agar	Power et al, 2009 (11)

Table 3: Antiseptics

Inhibitors		Microorganisms			Example of culture media	References
		Gram +	Gram -	Fungi, yeast		
Antiseptics	chlorhexidine	✓	✓	✗	*Selection of <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Asmar et al, 2015 (44) Asmar et al, 2016 (45)
	Cetrimide	✓	✓	✗	*Cetrimide Agar Base *CN Agar	Power et al, 2009 (11) Delarras, 2014 (39)
	Acriflavin	✓	✗	✗	*Fraser Broth Base *Listeria Enrichment Broth *PALCAM Medium Base	Power et al, 2009 (11)

✓ Action against bacteria or fungi    ✗ No action against bacteria or fungi

Table 4: Sodium salts

Inhibitors		Microorganisms			Example of culture media	References
		Gram +	Gram -	Fungi, yeast		
Sodium Salts	Sodium azide	✘	✓	✘	*Azide Blood Agar Base *Azide Dextrose Broth *m E Agar *EVA Broth	Power et al, 2009 (11)
	Sodium chloride	✓ Except halophilic and halotolerant bacteria	✓ Except halophilic and halotolerant bacteria	✘	*Fraser Broth Base *Mannitol Salt Agar *Marine Agar 2216	Power et al, 2009 (11)
	Sodium deoxycholate	✓	✓	✘	*m TEC Agar *TT Broth Base, Hajna *XLD Agar	Power et al, 2009 (11)
	Sodium citrate	✓	✘	✘	*APT Agar *DCLS Agar *Desoxycholate Citrate Agar	Power et al, 2009 (11)
	Sodium selenite	✓	✓ Other than <i>Salmonella</i>	✘	*Selenite Cystine Broth *Selenite Broth	Power et al, 2009 (11)
	Sodium tetrathionate	✘	✓ Other than <i>Salmonella</i> and <i>Proteus</i>	✘	*MKTTn Broth	Delarras, 2014 (39)

✓ Action against bacteria or fungi    ✘ No action against bacteria or fungi

Table 5: Chemical substances

Inhibitors		Microorganisms			Example of culture media	References
		Gram +	Gram -	Fungi, yeast		
Chemical substances	Bile salts	✓	✗	✗	*Bile Esculin Agar *EC Medium *m FC Agar and Broth	Power et al, 2009 (11)
	Oxgall	✓	✗	✗	*Bile Esculin Agar *Brilliant Green Bile Agar	Power et al, 2009 (11)
	Lithium chloride	✗	✓	✗	*VJ Agar *Baird-Parker Agar Base *Giolitti-Cantoni Broth Base	Power et al, 2009 (11)
	D-cycloserine	✓	✓	✗	*Cycloserine-cetoxitin-fructose agar *Tryptose Sulfite Cycloserine Agar	Power et al, 2009 (11)
	Irgasan	✓	✓ Other than <i>Pseudomonas</i>	✗	*CIN Agar *Pseudomonas Isolation Agar	Power et al, 2009 (11)
	Tergitol 7	✓	✓	✗	*TTC and Tergitol 7 Lactose Agar	Delarras, 2014 (39)
	Potassium tellurite	✓	✗	✗	*Serum Tellurite Agar *Tellurite Glycine Agar	Power et al, 2009 (11)
	Lauryl sulfates	✓	✗	✗	*m Endo Agar LES *Lauryl Tryptose Broth *Lauryl Sulfate Broth	Power et al, 2009 (11)

✓ Action against bacteria or fungi    ✗ No action against bacteria or fungi



Table 6: Dyes

Inhibitors		Microorganisms			Example of culture media	References
		Gram +	Gram -	Fungi, yeast		
Dyes	Methylen blue	✓	✗	✗	*Eosin Methylene Blue Agar *Levine EMB Agar	Power et al, 2009 (11) Delarras, 2014 (39)
	Eosin	✓	✗	✗	*Eosin Methylene Blue Agar *Levine EMB Agar	Power et al, 2009 (11) Delarras, 2014 (39)
	Cristal violet	✓ Cocci	✗	✗	*MacConkey Agar *Mitis Salivarius Agar *Drigalski medium	Power et al, 2009 (11) Delarras, 2014 (39)
	Ethyl violet	✓	✗	✗	*EVA Broth *Litsky Broth	Power et al, 2009 (11) Delarras, 2014 (39)
	Brilliant green	✓	✓	✗	*Brilliant Green Bile Broth *SS Agar	Power et al, 2009 (11) Delarras, 2014 (39)
	Malachite green	✓	✓	✗	*Mycobacteria 7H11 Agar *Wallenstein Medium	Power et al, 2009 (11) Delarras, 2014 (39)

✓ Action against bacteria or fungi    ✗ No action against bacteria or fungi

Table 7: Gelling agents used in culture media (60, 62, 66)

Origin	Type	Gel texture	Necessary ions	Gelling temperature	Melting temperature
Red seaweed extracts	Agar	Firm, brittle, transparent Acid-resistant (up to pH 3.5)		< 35°C	> 80°C
Red seaweed extracts	Carrageenans (kappa, iota)	· Kappa Elastic or firm (depending on concentration), transparent, glossy Very fast gel setting	K <sup>+</sup>	< 40°C	> 65°C
		· Iota Elastic, transparent, reformable	Na <sup>+</sup> ou K <sup>+</sup>		
Brown seaweed extracts	Sodium alginate	Flexible gel	Ca <sup>2+</sup>	Whatever the temperature	Thermo-irreversible
Extracts of vegetable by-products	HM Pectin	Gels in an acidic environment (pH<3) and in the presence of sugar. Slow gel setting "Spreadable" gel		< 65°C	Thermo-irreversible
Extracts of vegetable by-products	LM Pectine	Brittle, transparent	Ca <sup>2+</sup>		Thermo-reversible
Biosynthetics	Gellan gum	Transparent, shiny, firm. Stable up to pH=3		< 90°C	> 90°C
Animale	Gelatin	Elastic gel, transparent		< 20°C	> 40°C
<i>Xanthomonas campestris</i> bacteria	Xanthan gum (+ carob bean gum)	Stable over a wide temperature and pH range Soft elastic gel in combination with carob bean gum and in the presence of salts			270°C thermo-reversible
Plant exudates	Arabic gum	Soft gel (>10% of final volume) Stable in acidic medium Heating must be limited in time as there is a risk of loss of the gum's gelification capacity			
Animale	Egg			Thermo-irreversible	

**PARTIE II : Développement d'un  
milieu de culture permettant la  
sélection de la bactérie *Enterococcus  
hirae*.**

## AVANT-PROPOS

Le milieu de culture développé a pour but la culture spécifique et l'isolement sélectif d'*Enterococcus hirae* (*E. hirae*), une bactérie d'intérêt médical qui joue un rôle dans la stimulation du système immunitaire chez des personnes atteintes de cancer du poumon ou ovarien, à partir d'échantillons biologiques. Il a été démontré que la présence d'*E. hirae* chez les personnes atteintes de ces types de cancer favorisait la réponse au traitement par cyclophosphamide (8).

Dans un premier temps, le milieu de culture va permettre un isolement sélectif des trois espèces du genre *Enterococcus* les plus communément rencontrées dans les prélèvements de selles humaines, à savoir: *E. faecalis*, *E. faecium* et *E. hirae*. Pour cela, des inhibiteurs des bactéries Gram négatif et positif (autres que ces trois bactéries) ont été ajoutés au milieu. Dans un deuxième temps, la distinction entre ces espèces se fait sur un changement de couleur du milieu de culture sous les colonies bactériennes, qui se produit lors de la consommation d'un sucre par *E. faecalis* et *E. faecium*. *E. hirae* ne consommant pas ce sucre, elle apparaît transparente sur le milieu alors que les deux autres prennent une coloration jaunâtre.

Un tel milieu de culture pourra permettre d'orienter le choix du médecin pour un traitement par cyclophosphamide plutôt qu'un autre, en cas de présence de la bactérie *E. hirae* dans le microbiote intestinal du patient.

**Brevet 1 : Milieu et procédé de culture et isolement sélectif  
de la bactérie *Enterococcus hirae***

Marion Bonnet, Saber Khelaifia, Didier Raoult

Brevet 1H53316 cas 24 FR1755310

Juin 2017

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
COURBEVOIE

①① N° de publication :

**3 067 360**

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national :

**17 55310**

⑤① Int Cl<sup>8</sup> : **C 12 N 1/20** (2006.01), C 12 N 1/32, C 12 Q 1/04, 1/  
10

①②

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 13.06.17.

③① Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 14.12.18 Bulletin 18/50.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : FONDATION MEDITERRANEE  
INFECTION — FR, ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE  
MARSEILLE Etablissement public — FR,  
INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE  
LA RECHERCHE MEDICALE) — FR.

⑦② Inventeur(s) : RAOULT DIDIER, KHELAIFIA SABER  
et BONNET MARION.

⑦③ Titulaire(s) : FONDATION MEDITERRANEE INFECTION,  
UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE Etablissement  
public, ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE  
MARSEILLE Etablissement public, CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) Etablissement public, INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE).

⑦④ Mandataire(s) : CABINET BEAU DE LOMENIE  
Société civile.

⑤④ MILIEU ET PROCEDE DE CULTURE ET ISOLEMENT SELECTIF DE LA BACTERIE ENTEROCOCCUS HIRAE.

⑤⑦ La présente invention concerne un milieu de culture solide spécifique pour la culture et l'isolement sélectif d'une bactérie *Enterococcus hirae* constitué de nutriments autres que des sucres d'un milieu de culture de base pour la culture des entérocoques dépourvu d'esculine, comprenant des inhibiteurs de bactéries Gram négatif et de bactéries Gram positif autres que les entérocoques et de préférence au moins un composé antifongique caractérisé en ce qu'il comprend:

- comme seul sucre du mannitol, et

- comme seul colorant, un indicateur coloré qui change de couleur à un pH inférieur au pH dudit milieu de culture spécifique correspondant à l'acidification dudit milieu de culture spécifique résultant de la consommation du mannitol.

FR 3 067 360 - A1



MILIEU ET PROCEDE DE CULTURE ET ISOLEMENT SELECTIF DE LA BACTERIE  
*ENTEROCOCCUS HIRAE*

La présente invention concerne un nouveau milieu et procédé de culture et d'isolement sélectif de la bactérie commensale *Enterococcus hirae* au sein d'un échantillon biologique, notamment de selles.

Les bactéries du genre *Enterococcus* sont des cocci à Gram positif, retrouvés sous forme de diplocoques. Ce sont des germes commensaux du tube digestif, le plus souvent responsables d'endocardites et d'infections urinaires [1]. Le genre *Enterococcus* est rangé dans le domaine des Bacteria, le phylum des Firmicutes, la classe des Bacilli, l'ordre des Lactobacillales, la famille des Enterococcaceae et enfin la branche des Clostridium. A l'heure actuelle, il existe 58 espèces d'entérocoques différentes [1].

Les entérocoques les plus souvent retrouvés dans les échantillons cliniques sont *Enterococcus faecalis* qui représentent 75 à 85 % des souches cliniques d'entérocoques et *Enterococcus faecium*. *faecalis* qui représentent 10 à 20 % des souches cliniques d'entérocoques, les autres espèces des souches cliniques du genre *Enterococcus* représentant environ 5 % à savoir *Enterococcus hirae*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* et *E. raffinosus* [14].

*Enterococcus hirae* est un pathogène zoonotique, retrouvé chez les mammifères et les oiseaux, qui a rarement été isolé à partir d'une infection chez l'homme [2].

Actuellement, différents milieux de culture solides sont utilisés pour sélectionner les bactéries du genre *Enterococcus*, tel que le milieu BEA (Bile Esculine Azide) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) [3], qui permet l'isolement sélectif des bactéries du genre *Streptococcus* appartenant au groupe D et les bactéries du genre *Enterococcus*. Il existe également les milieux mEI Agar (Difco, BD, Franklin Lakes, New Jersey, Etats-Unis), Chromocult® enterococci (Merck, Darmstadt, Allemagne), et m-*Enterococcus* agar (Sigma-Aldrich), qui permettent d'isoler les entérocoques [4].

L'objectif de la présente invention est de sélectionner spécifiquement *E. hirae*, parmi les autres bactéries du genre *Enterococcus*. En effet, cette bactérie *E. hirae* joue un rôle important dans l'immunité, notamment dans le traitement du cancer du sein [5]. Il a été démontré que la présence d'*E. hirae* chez les femmes atteintes d'un cancer du sein favorisait la réponse au traitement par chimiothérapie. *E. hirae* est un « oncomicrobiotique », elle favorise l'effet thérapeutique anti-cancéreux du cyclophosphamide (CTX). En effet, elle active l'immunité anti-tumorale via l'induction de cellules Th17 et en augmentant le ratio des cellules cytotoxiques sur les cellules T régulatrices [5].

10 Le but de la présente invention est de sélectionner *E. hirae* à partir de prélèvements biologiques, en particulier de selles de patients, afin de mettre en évidence la présence ou non de cette bactérie dans le microbiote de ces patients et ainsi prédire leur possible réponse au traitement thérapeutique par cyclophosphamide [5].

15 La présente invention a consisté tout d'abord à sélectionner spécifiquement les bactéries du genre *Enterococcus* et plus particulièrement *E. faecalis*, *E. faecium* et *E. hirae* sur un milieu de culture puis différencier *E. hirae* des autres entérocoques par une technique de coloration.

20 On comprend que le milieu de culture pour *Enterococcus* selon l'invention est constitué d'un milieu de culture de base, connu pour la culture sélective des entérocoques, comprenant notamment différents inhibiteurs des bactéries Gram négatif et de la plupart des bactéries Gram positif, autres que les entérocoques.

Un milieu couramment utilisé pour la mise en évidence des entérocoques est le milieu bile-esculine qui comprend :

- 25
- 10 % de bile de bœuf (les entérocoques tolèrent jusqu'à 40 % de bile contrairement à de nombreux autres germes) ;
  - de l'azoture de sodium (un antiseptique élimine toutes les bactéries Gram négatifs) ;
  - de l'esculine et du citrate de fer ammoniacal (un composé qui permet le virage vers le noir du milieu de culture lorsque l'esculine est hydrolysée).
- 30



Les entérocoques se développent en hydrolysant l'esculine de sorte que les entérocoques poussent en faisant virer le milieu au noir : le noircissement du milieu traduisant l'hydrolyse par le citrate de fer ammoniacal de l'esculine en esculétine qui se lie avec le fer.

5 Un milieu de culture solide spécifique des entérocoques, dénommé milieu m-Enterococcus agar [3] comprend de préférence dans les quantités et proportions pondérales suivantes pour 1L:

	- Extrait pancréatique de gélatine:	10 g (1%)
	- Extrait de levure :	30 g (3%)
10	- Chlorure de sodium :	15 g (1,5%)
	- Esculine :	1 g (0,1%)
	- Azoture de sodium :	0,15 g (0,015%)
	- Cycloheximide :	0,05 g (0,005%)
	- Acide nalidixique :	0,25 g (0,025%)
15	- Agar :	15 g (1,5%)

L'azoture de sodium présente une action inhibitrice sur les bactéries Gram négatif et sur tous les streptocoques sauf ceux du groupe D.

Le cycloheximide présente une son action antifongique.

20 L'acide nalidixique est un antibiotique de la classe des quinolones, utilisé pour son action sur les bactéries Gram négatif.

Le chlorure de sodium permet d'inhiber les bactéries gram positifs autres qu'Enterococcus, en particulier le sous-genre Streptococcus D peut être inhibé par la salinité d'un milieu de culture. Ainsi Les Enterococcus peuvent être cultivées sélectivement sur un milieu hypersalé.

25 L'extrait pancréatique de gélatine et l'extrait de levure apportent les nutriments nécessaires.

La présente invention fournit un milieu de culture solide spécifique pour la culture et l'isolement sélectif d'une bactérie *Enterococcus hirae* constitué de nutriments autres que des sucres d'un milieu de culture de base pour la culture des

entérocoques dépourvu d'esculine, comprenant des inhibiteurs de bactéries Gram négatif et de bactéries Gram positif autres que les entérocoques et de préférence au moins un composé antifongique caractérisé en ce qu'il comprend :

- comme seul sucre du mannitol, et

5 - comme seul colorant, un indicateur coloré qui change de couleur à un pH inférieur au pH dudit milieu de culture spécifique correspondant à l'acidification dudit milieu de culture spécifique résultant de la consommation du mannitol.

On évite en particulier la mise en œuvre d'esculine dans le milieu de base car  
10 celle-ci colore en noir tous les entérocoques comme indiqué ci-dessus.

Selon la présente invention on tire parti du fait que *E. hirae* ne consomme pas de mannitol alors que le mannitol est consommé en provoquant une baisse du pH ou acidification dudit milieu de culture spécifique, par toutes les principales autres bactéries *Enterococcus* susceptibles d'être présentes dans des échantillons cliniques  
15 de patients humains, notamment de selles, à savoir *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* et *E. raffinosus* [14].

Plus particulièrement, le pH dudit milieu de culture spécifique selon l'invention est de 7,3 +/- 0,2 et l'indicateur coloré est le pourpre de bromocrésol.

Cet indicateur coloré vire à un pH de 5,2-6,8, un pH dans cette fourchette de  
20 5,2-6,8 correspondant à l'acidification d'un milieu de culture de PH 7,3 +/- 0,2; ensemencé par au moins une colonie isolée de bactérie *Enterococcus* autre que *Enterococcus hirae*.

Plus particulièrement encore, le milieu de culture spécifique selon l'invention comprend au moins 10 g/L de mannitol.

25 Plus particulièrement encore, ledit milieu de culture spécifique selon l'invention comprend des nutriments autres que le mannitol dans une concentration de pas plus de 20g/L, de préférence d'au moins au moins 10g/L. Cette concentration relativement élevée en mannitol par rapport aux autres nutriments permet de favoriser la consommation prioritaire dudit sucre par les *Enterococcus* autres que *E.*  
30 *hirae* d'une part offre suffisamment de nutriment pour la croissance de *E. hirae*.

Plus particulièrement encore, ledit milieu de culture spécifique selon l'invention comprend comme indicateur coloré du pourpre de bromocrésol à une concentration d'au moins 25 mg/L.

5 Plus particulièrement encore, ledit milieu de culture spécifique selon l'invention comprend comme indicateur coloré du pourpre de bromocrésol à une concentration d'au moins 50mg/L.

De façon connue, lesdits nutriments sont des sources d'énergie et source de carbone, azote ou phosphore.

10 Plus particulièrement encore, ledit milieu de culture spécifique selon l'invention comprend comme nutriments autres que des sucres d'un milieu de culture de base pour la culture des entérocoques : des vitamines, des sels minéraux métalliques, notamment de métaux tels que Cu, Zn, Co, Ni, Bi, Ti, et des composés azotés.

Plus particulièrement encore, ledit milieu de culture spécifique selon l'invention comprend comme source de vitamines, sels essentiels et composés azotés :

- 15
- un extrait de viande de bœuf, et
  - la protéose-peptone.

La peptone permet d'apporter des acides aminés et des peptides comme source d'énergie et de carbone autre que sucres.

20 Plus particulièrement encore, ledit milieu de culture spécifique selon l'invention comprend :

- un extrait de viande de bœuf à la concentration de 1 g/L, et
- la protéose-peptone à la concentration de 10 g/L.

25 Plus particulièrement encore, ledit milieu de culture spécifique selon l'invention comprend un produit gélifiant choisi de préférence parmi les géloses et agar, de préférence dans une proportion pondérale de 0,5 à 5%, de préférence encore de 1 à 2%.

Plus particulièrement encore, ledit milieu de culture spécifique selon l'invention comprend inhibiteurs de bactéries Gram négatif et de bactéries Gram positif autres que les entérocoques :

- du chlorure de sodium à une concentration d'au moins 20g/L, et
- de l'azoture de sodium, et
- de l'acide nalidixique.

Plus particulièrement encore, ledit milieu de culture spécifique selon l'invention  
 5 comprend les composants suivants, de préférence dans les quantités et proportions pondérales suivantes pour 1L:

-	Protéose-peptone :	10 g (1%)	
-	Extrait de viande de bœuf :	1 g (0,1%)	
-	Chlorure de sodium :	60 g (6%)	
10	-	Mannitol	10 g (1%)
-	Azoture de sodium :	0,15 g (0,015%)	
-	Cycloheximide :	0,05 g (0,005%)	
-	Acide nalidixique :	0,25 g (0,025%)	
-	Pourpre de bromocrésol :	0,05 g (0,005%)	
15	-	Agar :	15 g (1,5%)

La présente invention fournit également un procédé de culture et isolement sélectif d'une bactérie *Enterococcus hirae* caractérisé en ce qu'on cultive un échantillon de prélèvement biologique contenant ou susceptible de contenir une bactérie *Enterococcus hirae* et/ou des bactéries *Enterococcus* autres que  
 20 *Enterococcus hirae*, à une température de 37°C durant un temps suffisant pour faire apparaître une coloration de bactéries *Enterococcus* autres qu'*Enterococcus hirae* par ledit colorant dans undit milieu de culture spécifique selon l'invention.

Plus particulièrement encore, ledit milieu de culture spécifique selon l'invention permet de sélectionner une bactérie *Enterococcus hirae* dans un échantillon testé  
 25 comprenant d'autres bactéries choisies parmi *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* et *E. raffinosus*.

Plus particulièrement encore, le procédé selon l'invention comprend les étapes suivantes dans lesquelles:

a) on effectue une série de plusieurs dilutions du prélèvement de départ, de préférence d'au moins  $10^{-5}$  à partir d'un échantillon de selle, notamment prélevé à l'aide d'une oëse, à raison de 0,10 à 0,50 g/mL de tampon PBS, et

b) un échantillon de chacune des dilutions est ensemencé sur le dit milieu de culture spécifique solide selon l'invention, de préférence d'un échantillon de 100 microlitres de selle diluée sur le dit milieu de culture spécifique solide, et

c) au bout de 72 heures d'incubation à 37°C, on détecte une dite bactérie *Enterococcus hirae* si on identifie une colonie de bactérie non décolorée par rapport audit colorant de pourpre de bromocrésol, et

d) de préférence, on confirme que la dite colonie de bactérie non décolorée est de l'espèce *Enterococcus hirae* par une technique d'identification par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.

L'identification d'*Enterococcus hirae* par une technique d'identification par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF a été décrite [15].

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lumière de la description détaillée de l'invention et des exemples illustratifs ci-après.

Du fait que les entérocoques sont résistants aux fortes concentrations salines [1], afin d'éliminer une partie des bactéries Gram positif autres qu'entérocoques et les bactéries Gram négatif, résistantes aux inhibiteurs cités précédemment, il a été testé différentes concentrations de sel (chlorure de sodium) pour trouver la plus adéquate à ajouter à la formulation de la présente invention. Quatre concentrations ont été expérimentées (60 g/L, 65 g/L, 70 g/L et 75 g/L). Les résultats ont montrés que les 3 souches d'entérocoques – *E. hirae*, *E. faecium* et *E. faecalis* – testées sur ces milieux ont eu une croissance pour chacune des concentrations testées. Cependant, après lecture des géloses à 24 heures, il a été observé que plus les concentrations en sel étaient augmentées, plus les colonies des bactéries *E. hirae* obtenues étaient de petite taille.

Pour permettre une meilleure visibilité des colonies, la concentration en chlorure de sodium retenue pour un milieu sélectif selon la présente invention est d'au moins 20g/L mais pas plus de 60 g/L.

Les entérocoques les plus représentés dans les prélèvements biologiques, en particulier les selles, sont *E. faecalis* et *E. faecium* [2, 6, 7]. Les autres espèces d'entérocoques étant sous-dominantes, aucun inhibiteur des autres entérocoques n'a été ajouté à la formulation de la présente invention. Cependant, certains entérocoques - *Enterococcus casseliflavus*, *enterococcus gallinarum* et *Enterococcus raffinosus* - sont présents en quantité comparable à *Enterococcus hirae* [8] dans les selles. La présente invention permet toutefois de les différencier d'*Enterococcus hirae*, comme démontré ci-après.

Le principal objectif de la présente invention est d'isoler *E. hirae* parmi *E. faecium* et *E. faecalis*. Ces deux dernières espèces bactériennes étant résistantes à un grand nombre d'inhibiteurs auxquels *E. hirae* résiste, il n'a pas été possible de les éliminer des prélèvements. Les inventeurs ont alors cherché à les différencier en fonction de leur profil métabolique. Pour cela, les inventeurs ont recherché des sucres consommés soit exclusivement par *E. hirae*, soit exclusivement par *E. faecium* et *E. faecalis*. Après étude des données de la littérature, trois sucres ont été retenus : le mélibiose, le raffinose et le mannitol. En effet, le mélibiose est consommé par *E. hirae* et de façon variable par *E. faecium*. On entend par variable le fait que la consommation de ce sucre par *E. faecium* est souche-dépendante. Quant au raffinose et au mannitol, ils sont exclusivement consommés par *E. faecalis* et *E. faecium* et non pas par *E. hirae* (cf tableau 1) [9, 10, 11].

Pour mettre en évidence la consommation du sucre par les bactéries, les inventeurs ont ajouté au milieu de la présente invention un indicateur coloré dont la couleur va varier en fonction du pH du milieu. En effet, lors de la consommation du sucre par la bactérie, il y a une acidification du milieu, ce qui entraîne un virage de l'indicateur coloré. Pour déterminer l'indicateur coloré le plus approprié, les inventeurs en ont testé plusieurs dont les trois suivants : le rouge phénol, le vert de bromocrésol et le pourpre de bromocrésol. En se basant sur les concentrations dans des milieux contenant déjà un de ces indicateurs colorés, les inventeurs ont choisi,

dans un premier temps, de tester une concentration de 25 mg/L [12] pour chacun des indicateurs choisis.

### 1) Tests des différents indicateurs colorés

Le rouge phénol est de couleur rouge ; il vire vers le jaune lorsque le pH est dans la zone de virage de l'indicateur, qui est comprise entre 6.6 et 8. Le milieu ayant un pH compris entre  $7.3 \pm 0.2$ , l'indicateur a commencé à virer vers le jaune dès l'autoclavage, ne permettant pas son utilisation dans un milieu selon la présente invention.

Le vert de bromocrésol a une couleur bleue ; il vire vers le jaune lorsque le pH est dans la zone de virage de l'indicateur, qui est comprise entre 3.8 et 5.4. Cet indicateur coloré nécessite une acidification du milieu trop importante pour pouvoir visualiser un véritable changement de couleur. Les inventeurs ont ainsi observé un virage davantage vers le vert que vers le jaune. Le contraste entre les colonies de *E. faecalis* et *E. faecium* et le milieu de culture n'a donc pas été assez important pour les différencier.

Le pourpre de bromocrésol est de couleur violet ; il vire vers le jaune lorsque le pH est dans la zone de virage de l'indicateur, qui est comprise entre 5.2 et 6.8. L'avantage de cet indicateur coloré est qu'il ne nécessite pas un fort abaissement du pH pour laisser apparaître des colonies jaunes avec un halo jaune dessous. De plus, cette zone de virage est idéale puisque le pH de la présente invention est de  $7.3 \pm 0.2$ . Les inventeurs ont donc choisi ce dernier indicateur coloré pour la formulation de la présente invention. Voulant améliorer davantage le contraste, les inventeurs ont augmenté la concentration du pourpre de bromocrésol jusqu'à 50 mg/L.

### 2) Détermination du sucre

Une fois l'indicateur coloré choisi, les inventeurs ont pu déterminer quel sucre était le plus adapté à la présente invention.

Le mélibiose a donné des résultats variables, du fait de la consommation variable de ce sucre par *E. faecium*. Ce sucre ne peut donc pas être utilisé pour isoler

les *E. hirae*.

Concernant le raffinose, le test n'a pas été concluant car aucun changement de couleur des colonies de *E. faecalis* et *E. faecium* n'a pu être observé.

Enfin, le dernier sucre testé a été le mannitol. Pour ce sucre, les inventeurs ont constaté qu'il y avait bien un changement de couleur du milieu et des colonies pour *E. faecalis* et *E. faecium*, mais pas pour celles d'*E. hirae* qui sont restées incolores. Les inventeurs ont donc choisi le mannitol comme sucre pour la formulation de la dite invention, à une concentration de 10 g/L, concentration fréquemment retrouvée dans les milieux de culture [12].

10

	Mélibiose	Raffinose	Mannitol
<i>Enterococcus hirae</i>	+	+	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	+
<i>Enterococcus faecium</i>	V	-	+

**Tableau 1** : Consommation des sucres par les 3 entérocoques étudiés

De plus, il a été montré dans la littérature que certaines souches d'entérocoques - *Enterococcus casseliflavus*, *enterococcus gallinarum* et *Enterococcus raffinosus* - sont présentes en quantité comparable à *E. hirae*. Etant donné que les bactéries appartenant au genre *Enterococcus* sont dans l'ensemble sensibles et résistantes aux mêmes inhibiteurs, les inventeurs ont recherché la consommation des sucres pour ces différents entérocoques. Il s'est avéré qu'ils consommaient tous le mannitol (*cf* tableau 2). Il est donc possible de distinguer *E. hirae* parmi ces entérocoques.

20

	Mannitol
<i>Enterococcus hirae</i>	-
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	+
<i>Enterococcus gallinarum</i>	+



*Enterococcus raffinosus* | +

**Tableau 2** : Consommation du mannitol par les espèces d'entérocoques présents en quantité comparable à *E. hirae* dans les selles.

Ledit milieu de culture comprend également une source de vitamines, de sels essentiels et de composés azotés par la présence d'extrait de viande de bœuf [13] à la concentration de 1 g/L et la protéose-peptone ajoutée à 10 g/L à ladite invention qui permet d'apporter des acides aminés et des peptides (source d'énergie et de carbone). Aucun autre élément nutritif n'a été apporté à la présente invention car l'objectif est que *E. faecalis* et *E. faecium* se servent en priorité du sucre, le mannitol, comme source de nutrition pour permettre leur croissance. Ces sources ne peuvent cependant pas être supprimées puisque *E. hirae*, n'utilisant pas le sucre sélectionné comme source d'énergie, a besoin de nutriments pour croître.

Ledit milieu de culture est un milieu de culture solide contenant un produit gélifiant choisi de préférence parmi les géloses et agar, de préférence dans une proportion pondérale de 0.5 à 5%, de préférence encore de 1 à 2%.

Un milieu de culture permettant la sélection des *Enterococcus hirae* selon l'invention comprend les composants suivants, de préférence dans les quantités et proportions pondérales suivantes pour 1L d'eau.

Exemple A :

	- Protéose-peptone :	10 g (1%)
20	- Extrait de viande de bœuf :	1 g (0,1%)
	- Chlorure de sodium :	60 g (6%)
	- Mannitol	10 g (1%)
	- Azide de sodium :	0,15 g (0,015%)
	- Cycloheximide :	0,05 g (0,005%)
25	- Acide nalidixique :	0,25 g (0,025%)
	- Pourpre de bromocrésol :	0,05 g (0,005%)
	- Agar :	15 g (1,5%)

Tous les composés de ce milieu sont référencés chez Sigma-Aldrich.

Plus particulièrement, on cultive un échantillon contenant une bactérie

*Enterococcus hirae* à une température de 37 °C durant 72 heures dans ledit milieu de culture de sélection d'*Enterococcus hirae*.

Plus particulièrement encore, on réalise les étapes suivantes :

- 5 - on effectue la culture d'un échantillon de prélèvement biologique pouvant contenir *Enterococcus hirae*. Dans un premier temps, on effectue une série de six dilutions au dixième à partir d'une solution mère du prélèvement de départ. Cent microlitres de chacune des dilutions sont ensemencés sur une gélose, correspondant à la présente invention, et
- 10 - au bout de 72 heures d'incubation à 37°C, on identifie que la bactérie détectée non colorée est une bactérie de l'espèce *Enterococcus hirae* par une technique de spectrométrie de masse, de type MALDI-TOF[15]. Un milieu de culture d'*Enterococcus hirae* selon l'invention permet de sélectionner *E. hirae* au bout de 72 heures.

15 Aux exemples 1 à 3 ci-après, on fournit des résultats de l'ensemencement d'une série de six dilutions de divers échantillons contenant trois entérocoques - *E. hirae*, *E. faecalis* et *E. faecium* – sur un milieu de culture solide selon la présente invention, au bout de 72 heures d'incubation à 37 °C.

Mode opératoire :

20 Dans les 3 exemples, on réalise une série de six dilutions de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$  d'un échantillon de départ comme suit :

- à l'exemple 1, une colonie d'une souche d'*Enterococcus hirae*, d'une souche d'*Enterococcus faecalis* et d'une souche d'*Enterococcus faecium*, ont été mélangées dans un millilitre de PBS (Phosphate Buffered Saline),
- 25 - à l'exemple 2, une selle est artificiellement enrichie en *E. hirae*, une colonie d'une souche d'*Enterococcus hirae* a été mélangée dans un millilitre de PBS avec l'équivalent d'une oëse bleue (10 microlitres) de selle, à savoir environ 0,15 g, et
- à l'exemple 3, l'équivalent d'une oëse bleue (10 microlitres) de selle clinique, à savoir environ 0,15 g que l'on sait riche en *E. hirae* a été
- 30 mélangé dans un millilitre de PBS.

Pour réaliser ces dilution, les inventeurs ont préparé six tubes eppendorf (Sigma-Aldrich), qui ont été remplis avec 900 microlitres de PBS et, à partir du tube mère, contenant les colonies et le cas échéant les échantillons de selles, 100 microlitres ont été prélevés et mélangés au 2<sup>ème</sup> tube contenant les 900 microlitres de PBS, et des dilutions en cascade ont été réalisées jusqu'à obtenir six dilutions de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ .

Puis, on réalise l'ensemencement de 100  $\mu$ L sur un milieu de culture solide selon l'exemple A ci-dessus, de la série des six dilutions et on observe le résultat après que les géloses aient été incubées dans une étuve à 37 °C pendant 72 heures.

10 Pour les 3 exemples, on observe l'apparition de colonies jaunes pour *E. faecium* et *E. faecalis* et de colonies transparentes pour *E. hirae*. Les colonies isolées sont les plus visibles sur les dilutions  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$ . Les autres dilutions sont trop concentrées en bactéries pour que l'on puisse observer des colonies isolées et ainsi bien distinguer *Enterococcus hirae* des autres entérocoques pour l'analyse de la  
15 richesse en *Enterococcus hirae* de la selle testée.

## REFERENCES

1. Aguilar-Galvez A, Dubois-Dauphin R, Destain J, Campos D, Thonart P.  
5 Les entérocoques : avantages et inconvénients en biotechnologie  
(synthèse bibliographique). *Biotechnologie. Agronomie. Société.  
Environnement*. 2012 16(1), 67-76
2. Bourafa N, Loucif L, Boutefnouchet N and Rolain J-M. *Enterococcus hirae*,  
an unusual pathogen in humans causing urinary tract infection in a patient  
10 with benign prostatic hyperplasia: first case report in Algeria. *New Microbe  
and New Infect*. 2015; 8: 7–9
3. Rodier J, Legube B, Merlet N, Brunet R. *L'analyse de l'eau - 10e éd.: Eaux  
naturelles, eaux résiduaires, eau de mer*. In : Dunod, editor. 2016 p 611
4. Maheux A, Bouchard S, Bérubé E and Bergeron M. Rapid molecular  
15 identification of fecal origin-colonies growing on *Enterococcus* spp.-specific  
culture methods. *Journal of water and health*. 2017; doi:  
10.2166/wh.2016.199
5. Daillère R *et al.* *Enterococcus hirae* and *Barnesiella intestinihominis*  
Facilitate Cyclophosphamide-Induced Therapeutic Immunomodulatory  
20 Effects. *Immunity*. 2016 ; 45 : 931-943
6. Savini V, Bonfini T, Marrollo R, Argentieri AV, Riccioni S, Astolfi D, Fazii  
P, D'Antonio D, Gherardi G. *Enterococcus hirae*: a zoonotic microorganism  
in human umbilical cord blood. *World Journal of Microbiology and  
Biotechnology*. April 2014; 30(4):1423-6
7. Zhanel G, Hoban D and Karlowsky J. Nitrofurantoin Is Active against  
25 Vancomycin-Resistant Enterococci. *Antimicrobial Agents and  
Chemotherapy*. January 2001; 45(1): 324–326.
8. Pinto B, Pierotti R, Canale G, Reali D. Characterization of 'faecal  
streptococci' as indicators of faecal pollution and distribution in the  
30 environment. *Letters in Applied Microbiology*. October 1999; 29(4):258-63

9. Berger S. GIDEON Guide to Medically Important Bacteria: 2017 edition. In : GIDEON Informatics Inc, editor. 2017 p 761-782
10. Devriese L, Van De Kerckhove A, Kilpper-Bälz R, Schleifer K. Characterization and Identification of *Enterococcus* Species Isolated from the Intestines of Animals. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. July 1987 ; 37: 257-259
11. Schleifer K, Kilpper-Bälz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. January 1984; 34: 31-34
12. Les milieux de culture en microbiologie [Internet]. Disponible sur : <http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio/milieus.html>
13. Extrait de viande de bœuf [Internet]. Disponible sur : [http://www.mastgrp.com/IFUS/IFU606\\_FR.pdf](http://www.mastgrp.com/IFUS/IFU606_FR.pdf)
14. Leclercq R. Faut-il identifier les entérocoques, et comment ? La Lettre de l'Infectiologue - Tome XVI - n° 7 - septembre 2001
15. Seng P, Abat C, Rolain JM, Colson P, Lagier J-C, Gouriet F, Pierre Edouard Fournier, Michel Drancourt, Bernard La Scola and Didier Raoult. Identification of rare pathogenic bacteria in a clinical microbiology laboratory: Impact of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. J Clin Microbiol. 2013; 51(7):2182-94.

## REVENDEICATIONS

1. Milieu de culture solide spécifique pour la culture et isolement sélectif d'une  
5 bactérie *Enterococcus hirae* constitué de nutriments autres que des sucres d'un  
milieu de culture de base pour la culture des entérocoques dépourvu d'esculine,  
comprenant des inhibiteurs de bactéries Gram négatif et de bactéries Gram positif  
autres que les entérocoques et de préférence au moins un composé antifongique  
caractérisé en ce qu'il comprend :
- 10 - comme seul sucre du mannitol, et
- comme seul colorant, un indicateur coloré qui change de couleur à un pH  
inférieur au pH dudit milieu de culture spécifique correspondant à l'acidification dudit  
milieu de culture spécifique résultant de la consommation du mannitol.
2. Milieu de culture spécifique selon la revendication 1 caractérisé en ce que le  
15 pH dudit milieu de culture spécifique est de 7,3 +/- 0,2 et l'indicateur coloré est le  
pourpre de bromocrésol.
3. Milieu de culture spécifique selon l'une des revendications 1 ou 2  
caractérisé en ce qu'il comprend au moins 10 g/L de mannitol.
4. Milieu de culture spécifique selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé  
20 en ce qu'il comprend des nutriments autres que le mannitol dans une concentration  
de pas plus de 20g/L, de préférence d'au moins 10 g/L.
5. Milieu de culture spécifique selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé  
en ce qu'il comprend comme indicateur coloré du pourpre de bromocrésol à une  
concentration d'au moins 25 mg/L.
- 25 6. Milieu de culture spécifique selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé  
en ce qu'il comprend comme indicateur coloré du pourpre de bromocrésol à une  
concentration d'au moins 50 mg/L.

7. Milieu de culture spécifique selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce qu'il comprend comme nutriments autres que des sucres d'un milieu de culture de base pour la culture des entérocoques : des vitamines, des sels minéraux métalliques et des composés azotés.

5 8. Milieu de culture spécifique selon la revendication 7 caractérisé en ce qu'il comprend comme source de vitamines, sels essentiels et composés azotés :

- un extrait de viande de bœuf, et
- la protéose-peptone.

10 9. Milieu de culture spécifique selon la revendication 8 caractérisé en ce qu'il comprend :

- un extrait de viande de bœuf à la concentration de 1 g/L, et
- la protéose-peptone à la concentration de 10 g/L.

15 10. Milieu de culture spécifique selon l'une des revendications 1 à 9 caractérisé en ce qu'il comprend un produit gélifiant choisi de préférence parmi les géloses et agar, de préférence dans une proportion pondérale de 0,5 à 5%, de préférence encore de 1 à 2%.

11. Milieu de culture spécifique selon l'une des revendications 1 à 10 caractérisé en ce qu'il comprend inhibiteurs de bactéries Gram négatif et de bactéries Gram positif autres que les entérocoques :

20 - du chlorure de sodium à une concentration d'au moins 20 g/L, et  
 - de l'azoture de sodium, et  
 - de l'acide nalidixique.

25 12. Milieu de culture spécifique selon l'une des revendications 1 à 10 caractérisé en ce qu'il comprend les composants suivants, de préférence dans les quantités et proportions pondérales suivantes pour 1L:

-Protéose-peptone :	10 g (1%)
-Extrait de viande de bœuf :	1 g (0,1%)
-Chlorure de sodium :	60 g (6%)
-Mannitol	10 g (1%)

	-Azoture de sodium :	0,15 g (0,015%)
	-Cycloheximide :	0,05 g (0,005%)
	-Acide nalidixique :	0,25 g (0,025%)
	-Pourpre de bromocrésol :	0,05 g (0,005%)
5	-Agar :	15 g (1,5%)

13. Procédé de culture et isolement sélectif d'une bactérie *Enterococcus hirae* caractérisé en ce qu'on cultive un échantillon de prélèvement biologique contenant ou susceptible de contenir une bactérie *Enterococcus hirae* et/ou des bactéries *Enterococcus* autres que *Enterococcus hirae*, à une température de 37°C durant un  
10 temps suffisant pour faire apparaître une coloration de bactéries *Enterococcus* autres que *Enterococcus hirae* par ledit colorant dans undit milieu de culture spécifique selon l'une des revendications 1 à 12.

14. Procédé de culture selon la revendication 13 caractérisé en ce qu'on sélectionne une bactérie *Enterococcus hirae* dans un échantillon testé comprenant  
15 d'autres bactéries choisies parmi *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* et *E. raffinosus*.

15. Procédé selon l'une des revendications 13 ou 14 caractérisé en ce qu'on réalise les étapes suivantes :

a) on effectue une série de plusieurs dilutions du prélèvement de départ, de  
20 préférence d'au moins  $10^{-5}$  à partir d'un échantillon de selle à raison de 0,10 à 0,50 g/mL de tampon PBS, et

b) un échantillon de chacune des dilutions est ensemencé sur le dit milieu de culture spécifique solide, de préférence d'un échantillon de 100 microlitres de selle diluée sur le dit milieu de culture spécifique solide, et

25 c) au bout de 72 heures d'incubation à 37°C, on détecte une dite bactérie *Enterococcus hirae* si on identifie une colonie de bactérie non décolorée par rapport audit colorant de pourpre de bromocrésol, et

d) de préférence, on confirme que la dite colonie de bactérie non décolorée est de l'espèce *Enterococcus hirae* par une technique d'identification par  
30 spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 840640  
FR 1755310

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	L. A. DEVRIESE ET AL: "Enterococcus hirae infections in psittacine birds: Epidemiological, pathological and bacteriological observations", AVIAN PATHOLOGY, vol. 24, no. 3, 1 septembre 1995 (1995-09-01), pages 523-531, XP055431463, GB ISSN: 0307-9457, DOI: 10.1080/03079459508419091 * page 525, alinéa 1 *	1-15	C12N1/20 C12N1/32 C12Q1/04 C12Q1/10
X	MARIA L G QUILOAN ET AL: "Enterococcus faecalis can be distinguished from Enterococcus faecium via differential susceptibility to antibiotics and growth and fermentation characteristics on mannitol salt agar", FRONTIERS IN BIOLOGY, vol. 7, no. 2, 16 mars 2012 (2012-03-16), pages 167-177, XP035030840, ISSN: 1674-7992, DOI: 10.1007/S11515-012-1183-5 * abrégé *	1-12	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)  C12N C12Q
A	Albert Manero ET AL: "Identification of Enterococcus spp. with a Biochemical Key", Applied and Environmental Microbiology, 1 octobre 1999 (1999-10-01), pages 4425-4430, XP055250005, UNITED STATES Extrait de l'Internet: URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91588/pdf/am004425.pdf">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91588/pdf/am004425.pdf</a> [extrait le 2016-02-15] * tableau 2 *	1-15	
----- -/--			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
5 décembre 2017		Lejeune, Robert	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... & : membre de la même famille, document correspondant	

**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 840640  
FR 1755310

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
T	AZIZA TOKHTAKHUNOVA ET AL: "Physiological and biochemical features of local strains of lactic acid bacteria", IOSR JOURNAL OF AGRICULTURE AND VETERINARY SCIENCE, vol. 10, no. 10, 1 octobre 2017 (2017-10-01), pages 54-57, XP055431559, ISSN: 2319-2372, DOI: 10.9790/2380-1010035457 * tableau 1 *	2	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
A	J. B. EVANS ET AL: "Method for Determining Anaerobic Fermentation of Mannitol by Staphylococci", INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, vol. 30, no. 3, 1 juillet 1980 (1980-07-01), pages 557-558, XP055431603, GB ISSN: 0020-7713, DOI: 10.1099/00207713-30-3-557 * le document en entier *		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
5 décembre 2017		Lejeune, Robert	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			

**PARTIE III : Optimisation d'un milieu de culture, le R-medium, afin de favoriser la croissance de la majorité des bactéries anaérobies en aérobiose.**

## AVANT-PROPOS

Actuellement, pour cultiver les bactéries anaérobies en diagnostic hospitalier, on utilise des flacons d'hémoculture anaérobies, ne contenant pas d'oxygène ; pour cultiver les bactéries aérobies on se sert des flacons d'hémoculture aérobies.

Récemment, nous avons démontré dans notre laboratoire qu'il était possible de cultiver les 10 bactéries anaérobies les plus communément retrouvées en pratique hospitalière à cette période (Dubourg *et al*, données non publiées), à savoir : *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides nordii*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium massiliaamazoniensis*, *Clostridium irregulare*, *Fingoldia magna*, *Propionibacterium acnes* et *Propionibacterium avidum*, en aérobie dans des flacons d'hémoculture Versatrek, (I2a, Montpellier, France).

La présente invention concerne l'optimisation d'un milieu de culture liquide (R-medium) (9) supplémenté par un cocktail de 6 antioxydants (acide ascorbique, glutathion, L-cystéine, catalase, ubiquinol et acide lipoïque). Ce milieu a pour but de cultiver les 10 bactéries anaérobies citées précédemment dans des flacons d'hémocultures aérobies contenant notre milieu. L'acide urique, qui fait l'objet d'un brevet d'invention, a été exclu de la formule finale de ce nouveau milieu.

L'utilisation de ce milieu représente un intérêt primordial pour le diagnostic hospitalier car il pourra raccourcir considérablement le temps de manipulation des techniciens et donc un rendu plus précoce des résultats.

**Brevet 2 : Milieu de culture polyvalent pour bactéries  
anaérobies en aérobie.**

Marion Bonnet, Saber Khelaifia, Didier Raoult

Brevet 1H53316 cas 28 FR1757574

Août 2017

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
COURBEVOIE

11 N° de publication : **3 070 046**  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

21 N° d'enregistrement national : **17 57574**

51 Int Cl<sup>8</sup> : **C 12 N 1/20 (2017.01), C 12 P 39/00**

12

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 08.08.17.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la demande : 15.02.19 Bulletin 19/07.

56 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

60 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

Demande(s) d'extension :

71 Demandeur(s) : FONDATION MEDITERRANEE INFECTION — FR, ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE MARSEILLE Etablissement public — FR, INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) — FR.

72 Inventeur(s) : RAOULT DIDIER, KHELAIFIA SABER et BONNET MARION.

73 Titulaire(s) : FONDATION MEDITERRANEE INFECTION, UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE, ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE MARSEILLE, CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS), INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE).

74 Mandataire(s) : CABINET BEAU DE LOMENIE Société civile.

54 MILIEU DE CULTURE POLYVALENT POUR BACTERIES ANAEROBIES EN AEROBIE.

57 La présente invention concerne un milieu de culture polyvalent pour bactéries anaérobies en aérobie dans des flacons d'hémoculture.

La présente invention fournit un milieu de culture polyvalent pour culture en atmosphère aérobie de bactéries anaérobies ou bactéries aérobies comprenant un milieu de culture de base pour bactéries caractérisé en ce qu'il comporte en outre le mélange de composés antioxydants suivants: hydrosulfure de sodium (Na<sub>2</sub>S), L-Cystéine, acide ascorbique, glutathion, catalase, ubiquinol et acide lipoïque.

FR 3 070 046 - A1



## MILIEU DE CULTURE POLYVALENT POUR BACTERIES ANAEROBIES EN AEROBIE

La présente invention concerne un milieu de culture polyvalent pour bactéries anaérobies en aérobie dans des flacons d'hémoculture.

Les bactéries anaérobies sont des bactéries sensibles à l'oxygène. Il existe les  
5 bactéries anaérobies strictes (extrêmement sensible à l'oxygène), qui ne doivent en  
aucun cas être au contact de l'oxygène pour avoir une croissance, et les bactéries  
aéro-anaérobies tolérantes, qui peuvent être exposées à une faible concentration en  
oxygène, sans que leur croissance ne soit inhibée. Cette sensibilité à l'oxygène est  
liée au fait qu'il manque à ces bactéries des systèmes enzymatiques. Ces derniers  
10 permettent normalement la détoxification des espèces réactives de l'oxygène ;  
l'absence de cette détoxification conduit à une action toxique de l'oxygène sur ces  
bactéries. Pour permettre la croissance de ces bactéries anaérobies strictes ou aéro-  
anaérobies tolérantes, des procédés de culture « sans oxygène » ont été mis en  
place [1].

15 Raccourcir le délai pour le diagnostic des bactériémies reste un défi majeur  
pour les microbiologistes. La fiabilité et la rapidité du diagnostic sont des éléments  
clés pour une amélioration de la prise en charge des patients. A cet égard, malgré la  
commercialisation de nombreux systèmes moléculaires, la culture en milieu de  
culture liquide demeure à ce jour le standard optimal dans le diagnostic des  
20 bactériémies dans des échantillons cliniques de prélèvement de fluide ou sécrétions  
corporels tel que échantillon de selles, de crachats, de sécrétions vaginales, ou  
échantillons sanguins. Il repose sur l'incubation de deux flacons en contenant, pour  
bactéries anaérobie et respectivement aérobie dans des systèmes de culture  
automatisés détectant la croissance bactérienne.

25 Actuellement, le diagnostic hospitalier des bactéries anaérobies se fait le plus  
généralement en culture liquide dans des flacons de culture en milieu liquide  
contenant une atmosphère anaérobie, c'est-à-dire une atmosphère qui ne contient  
pas d'oxygène, où l'oxygène atmosphérique est remplacé par de l'azote, en utilisant  
un procédé de dégazage. Les bactéries anaérobies et aérobies sont cultivées dans  
30 des flacons de culture différents, à savoir qu'on réalise l'incubation de deux flacons,

anaérobie et aérobie dans des systèmes de culture automatisés détectant la croissance bactérienne.

Afin de minimiser le nombre de flacons à prélever pour diagnostiquer une bactériémie ou pour cultiver des bactéries dans le cadre de la recherche, les inventeurs ont cherché à fournir un milieu de culture liquide qui permettrait à la fois la croissance des bactéries aérobies et des anaérobies en atmosphère aérobie.

Il a été récemment rapporté la mise en évidence de la croissance en atmosphère aérobie d'espèces de bactéries strictement anaérobies comprenant un milieu de culture de base supplémenté par des composés antioxydants [2].

Dans WO2014/064359 et WO2015/162377, on a décrit des milieux de culture enrichis en agents antioxydants à savoir l'acide urique, l'acide ascorbique, le glutathion et l'hydrosulfure de sodium qui permettent d'améliorer et faciliter les conditions de croissance en culture acellulaire des bactéries anaérobies strictes ou des bactéries dont la croissance est sensible à la tension en oxygène et notamment des bactéries qui tolèrent mal des tensions élevées d'oxygène et pour lesquelles une croissance optimale de la dite bactérie requière une atmosphère d'incubation à teneur en oxygène relativement réduite par rapport à la teneur en oxygène de l'air. Les meilleurs résultats décrits dans WO 2015/162377 concernaient des milieux de culture supplémentés en un mélange d'antioxydants incluant l'acide urique.

Après avoir testé les milieux de culture supplémentés par des composés antioxydants décrits dans WO2014/064359 et WO2015/162377 sous forme liquide pour hémoculture, les inventeurs ont remarqué que certaines bactéries anaérobies, incluant des bactéries parmi les plus communément retrouvées en pratiques hospitalières, n'avaient pas de croissance en aérobie, à savoir *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides nordii*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium massilioamazoniensis*, *Clostridium irregulare*, *Fingoldia magna*, *Propionibacterium acnes* et *Propionibacterium avidum*.

Sur la base des mélanges de composés antioxydants décrits antérieurement, le meilleur mélange apparaissait être la combinaison de hydrosulfure de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}$ ), L-Cystéine, acide ascorbique, acide urique et glutathion. Mais, les milieux de



culture pour bactéries anaérobies supplémentés par ce mélange de composés antioxydant ne permettaient pas la croissance des bactéries anaérobies difficiles à cultiver en aérobies décrites ci-dessus.

En outre, selon la présente invention, les inventeurs ont recherché un nouveau milieu de culture liquide polyvalent pour les cultures de bactéries aérobies et anaérobies en atmosphère aérobie en l'absence d'acide urique car celui-ci présente des propriétés de dilution réduite ce qui se traduit par des taux de dissolution en solution aqueuse non reproductibles de façon déterminée quantitativement d'échantillon à échantillon.

Selon la présente invention, les inventeurs ont donc recherché un nouveau milieu de culture liquide polyvalent pour les cultures de bactéries aérobies et anaérobies en atmosphère aérobie en l'absence d'acide urique et présentant en outre des propriétés améliorées de croissance notamment vis-à-vis des bactéries anaérobies fastidieuses communément rencontrées telles que *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides nordii*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium massilioamazoniensis*, *Clostridium irregulare*, *Fingoldia magna*, *Propionibacterium acnes* et *Propionibacterium avidum*.

Pour ce faire, les inventeurs ont testé un grand nombre de combinaisons de divers composés antioxydants rapportés ci-après (cf tableau 2) qui ont permis de définir de manière surprenante un milieu de culture liquide supplémenté en composés antioxydants présentant des propriétés de croissance de bactéries anaérobies en aérobie améliorées par rapport à la combinaison de hydrosulfure de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}$ ), L-Cystéine, acide ascorbique et glutathion avec ou sans acide urique, à savoir le mélange de 7 composés antioxydants suivants : hydrosulfure de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}$ ), L-Cystéine, acide ascorbique, glutathion, et trois antioxydants supplémentaires, à savoir la catalase, l'ubiquinol et l'acide lipoïque. Ces milieux ont été testés pour la culture des 13 bactéries anaérobies fastidieuses incluant les bactéries anaérobies citées ci-dessus et 20 bactéries aérobies les plus communément rencontrées en routine hospitalière décrites ci-après.

La présente invention fournit un milieu de culture liquide polyvalent pour culture en atmosphère aérobie de bactéries anaérobies ou bactéries aérobies

comprenant un milieu de culture de base pour bactéries aérobies et anaérobies caractérisé en ce qu'il comporte en outre le mélange de composés antioxydants suivants: hydrosulfure de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}$ ), L-Cystéine, acide ascorbique, glutathion, catalase, ubiquinol et acide lipoïque.

5 Plus particulièrement, le milieu de culture selon l'invention comprend les dits composés antioxydants aux quantités et proportions pondérales suivantes pour 1L :

- Hydrosulfure de sodium : au moins 0,25 g (0,025%), de préférence de 0,25 g à 0,5 g (0,025 à 0,05 %)
- L-Cystéine : au moins 0,25 g (0,025%), de préférence de 0,25g à 0,5 g (0,025 à 0,05 %)
- Acide ascorbique : au moins 0,5 g (0,05%), de préférence de 0,5 à 1 g (0,05 à 0,1 %)
- Glutathion : au moins 0,1 g (0,01%), de préférence de 0,1 à 0,5 g (0,01 à 0,05 %)
- Catalase : au moins 0,06 g (0,006%), de préférence de 0,06 à 0,16 g (0,006 à 0,016 %)
- Ubiquinol : au moins 0,06 g (0,006%), de préférence de 0,06 à 0,16 g (0,006 à 0,016 %)
- Acide lipoïque : au moins 0,01 g (0,001%), de préférence de 0,01 à 0,015 g (0,001 à 0,0015 %)

Plus particulièrement encore, le milieu de culture selon l'invention comprend les composants nutritifs suivants dans le dit milieu de culture de base :

- plusieurs sources de carbone et d'azote, de préférence choisies parmi un extrait de levure, un sel d'acétate et une peptone tryptique,
- une source de phosphore, de préférence un sel de phosphate,
- au moins un sucre, et
- au moins un sel de métaux choisis parmi K, Mg, Na et Ca, de

préférence NaCl,

- ainsi que

- au moins une substance tampon régulateur de pH pour ajuster le pH de 7 à 8, de préférence K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ou NaHCO<sub>3</sub> pour ajuster le pH à 7,5, et

5 - au moins une vitamine ou facteur de croissance.

Plus particulièrement encore, ledit milieu de culture de base est un milieu acellulaire conventionnel de bactérie comprenant des composants nutritifs choisis parmi un extrait de broyat ou lysat de tissu pluricellulaire, un digestat enzymatique, notamment un digestat enzymatique de caséine, soja et/ou de tissu animal, une  
10 peptone, un extrait de levure, un sucre tel que dextrose ou glucose, un sel NaCl et/ou Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Plus particulièrement encore, ledit milieu de culture de base est un milieu acellulaire choisi parmi un milieu axénique constitué de substances chimiques ou biologiques défini qualitativement et quantitativement, et un milieu acellulaire  
15 comprenant un extrait de broyat ou lysat de tissu pluricellulaire.

Plus particulièrement encore, ledit milieu de culture est un milieu acellulaire conventionnel de bactérie anaérobie, notamment un milieu comprenant des composants choisis parmi un extrait de broyat ou lysat de tissu pluricellulaire, un digestat enzymatique, notamment un digestat enzymatique de caséine, soja et/ou de  
20 tissu animal, une peptone, un extrait de levure, un sucre tel que dextrose ou glucose, un sel NaCl et/ou Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Plus particulièrement encore, ledit milieu de culture de base est un milieu conventionnel de culture de bactéries anaérobies tel que les milieux dits bouillon de type cœur-cerveau, milieux Columbia à 5% de sang de mouton ou milieu Schaedler  
25 tels que décrits ci-après. D'autres milieux conventionnels appropriés sont les milieux Brucella ou Wilkins-Chagren. De tels milieux de culture acellulaires sont bien connus de l'homme de l'art.

On peut utiliser en particulier des milieux de culture polyvalents pour microorganismes anaérobies, notamment le milieu de Schaedler, ledit milieu étant

complémenté en composés hydrocarbonés, de préférence de l'amidon et de(s) sucre(s), et en dit(s) composé(s) antioxydant(s).

Plus particulièrement encore, ledit milieu de culture de base est un milieu de culture liquide pour culture de bactéries anaérobies dans un échantillon sanguin, selle, crachat ou sécrétion vaginale.

Plus particulièrement encore, ledit milieu de culture de base comprend les composants nutritifs suivants:

- Hydrolisat de caséine ;
- Protéose peptone ;
- 10 - Extrait de levure ;
- Chlorure de sodium (NaCl) ; et
- Glucose, et
- un facteur de croissance :  $\alpha$ -cétoglutarate.

Plus particulièrement encore, ledit milieu de culture de base comprend les composants suivants dans les quantités et proportions pondérales suivantes pour 1L :

- |    |  |                  |
|----|--|------------------|
|    | - Hydrolisat de caséine:                                     | 15 g (1,5 %)     |
|    | - Proteose peptone:  | 15 g (1,5 %)     |
|    | - Extrait de levure:   | 10 g (1 %)       |
| 20 | - $\alpha$ -cétoglutarate :                                  | 2 g (0,2 %)      |
|    | - Chlorure de sodium (NaCl) :                                | 5 g (0,5 %)      |
|    | - Glucose:   | 10 g (1 %)       |
|    | - Dipotassium phosphate (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) : | 0,83 g (0,083 %) |
|    | - Hydrosulfure de sodium (Na <sub>2</sub> S) :               | 0,5 g (0,05 %)   |
| 25 | - L-Cystéine :   | 0,5 g (0,05 %)   |

- Acide ascorbique : 1 g (0,1 %)
- Glutathion : 0,1 g (0,01 %)
- Catalase : 0,16 g (0,016 %)
- Ubiquinol : 0,16 g (0,016 %)
- 5 - Acide lipoïque : 0,010 g (0,001 %)

Le pH de la solution étant ajusté à  $7,5 \pm 0,2$  avec du KOH 10M.

La présente invention a également pour objet un procédé de culture *in vitro* d'une bactérie aérobie ou anaérobie sous atmosphère aérobie avec un milieu de culture selon l'invention.

10 Plus particulièrement, on réalise une culture d'une dite bactérie dans un échantillon de sang, selle, crachat ou sécrétion vaginale.

Plus particulièrement encore, on réalise une culture d'une dite bactérie anaérobie stricte fastidieuse choisie parmi *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides nordii*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Clostridium beijerinckii*,  
 15 *Clostridium butyricum*, *Clostridium massiliaamazoniensis*, *Clostridium irregulare*, *Fingoldia magna*, *Propionibacterium acnes* et *Propionibacterium avidum*, *Prevotella denticola* et *Prevotella histicola*.

Plus généralement, le milieu selon la présente invention permet aussi la culture de bactéries dont la croissance est sensible à la tension en oxygène et  
 20 notamment des bactéries qui tolèrent mal des tensions élevées d'oxygène et pour lesquelles une croissance optimale de la dite bactérie requière une atmosphère d'incubation à teneur en oxygène relativement réduite par rapport à la teneur en oxygène de l'air en l'absence de milieu de culture spécifique tel qu'un milieu selon la présente invention. On distingue donc parmi les bactéries sensibles à l'oxygène :

25 - les bactéries microaérophiles c'est-à-dire qu'elles ne sont pas capables de cultiver sous une atmosphère comprenant la concentration d'oxygène ambiante qui est de environ 21%, notamment entre 1% et 20%, le plus communément à environ 2-2,5%, et

- les bactéries anaérobies strictes c'est-à-dire qu'elles ne sont pas capables de cultiver en présence d'oxygène ou dans des concentrations inférieures aux concentrations de microaérophilie, notamment strictement inférieure à 1%, le plus communément inférieure à 0.1%, idéalement 0%. Pour cultiver les bactéries anaérobies strictes, en l'absence de milieu de culture spécifique tel qu'un milieu selon la présente invention, il faut soit les cultiver dans des étuves ne comportant pas d'oxygène, soit dans des tubes qui ont été désoxygénés et elles ne poussent alors qu'au fond du tube.

Parmi les bactéries anaérobies strictes, on cite plus particulièrement les bactéries extracellulaires, c'est-à-dire des bactéries qui ne peuvent vivre qu'à l'extérieur de cellules.

Parmi les bactéries cultivables en atmosphère microaérophile, on distingue plus particulièrement, les bactéries intracellulaires, mais aussi des bactéries extracellulaires. On entend ici par «bactérie intracellulaire», une bactérie qui a la capacité de se multiplier au sein d'une cellule hôte. Les bactéries intracellulaires, ayant la faculté de croître dans certaines conditions dans des milieux acellulaires, sont dénommées "bactéries intracellulaires facultatives".

On entend ici par :

- «bactérie intracellulaire facultative », une bactérie qui a la capacité de se multiplier au sein d'une cellule hôte en milieu acellulaire, et

- «bactérie extracellulaire », une bactérie qui n'a pas la capacité de se multiplier au sein d'une cellule hôte et se cultive exclusivement en milieu acellulaire.

On entend ici par «milieu de culture acellulaire», un milieu de culture qui ne comprend pas de cellules entières notamment qui ne comprend pas de cellules hôtes entières au sein desquelles la dite bactérie peut se multiplier, lorsque ladite bactérie est intracellulaire ou intracellulaire facultative. On comprend que les cellules entières doivent être vivantes pour permettre une multiplication de la bactérie en leur sein.

Plus particulièrement, la présente invention concerne la culture de bactéries anaérobies et la culture de bactéries microaérophiles intracellulaires.

Plus particulièrement encore, on peut cultiver la dite bactérie dans une dite atmosphère d'incubation comprenant une proportion molaire en oxygène supérieure à la tension maximale tolérée en l'absence de composé antioxydant pour un même niveau de croissance dans une même durée de culture.

5 En pratique, plus particulièrement encore, on peut cultiver la dite bactérie dans une dite atmosphère d'incubation comprenant une proportion molaire en oxygène supérieure à 2.5% et inférieure ou égale à 20%

Avantageusement toutefois, on cultive lesdites bactéries selon la présente invention dans une atmosphère comprenant une teneur en oxygène supérieure à  
10 5%, notamment dans de l'air contenant 5% de CO<sub>2</sub> (soit une teneur en oxygène inférieure à 16%).

De préférence, on cultive lesdites bactéries selon la présente invention dans une atmosphère d'air.

Les bactéries anaérobies peuvent être des bactéries anaérobies strictes ou  
15 bactéries anaérobies facultatives aussi dénommées aéro-anaérobies c'est-à-dire des bactéries anaérobies qui tolèrent de l'oxygène mais n'en n'ont pas besoin pour croître ou bactéries aérobies qui supportent l'absence d'oxygène pour croître.

Parmi les bactéries anaérobies strictes, on cite plus particulièrement les autres bactéries anaérobies strictes appartenant aux genres *Acidaminococcus*, *Alistipes*,  
20 *Anaerococcus*, *Anaerosalibacter*, *Amazonia*, *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Blautia*, *Bacteroides*, *Barnesiella*, *Clostridium*, *Collinsella*, *Dielma*, *Eggerthella*, *Fingoldia*, *Flavonifractor*, *Fusobacterium*, *Gordonibacter*, *Guyana*, *Holdemania*, *Odoribacter*, *Parabacteroides*, *Parvimonas*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, *Peptoniphilus*, *Porphyromonas*, *Prevotella*,  
25 *Solobacterium*, *Tissierella*, *Turicibacter*, *Ruminococcus* et *Veillonella*.

Parmi les bactéries anaérobies facultatives, on cite plus particulièrement les autres bactéries anaérobies facultatives appartenant aux genres *Actinomyces*, *Aerococcus*, *Aeromonas*, *Aneurinibacillus*, *Bacillus*, *Bartonella*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Corynebacterium*, *Derambacter*, *Eikenella*, *Enterobacter*,  
30 *Enterococcus*, *Escherichia*, *Eubacterium*, *Gardnerella*, *Gemella*, *Granulicatella*, *Hafnia*, *Haemophilus*, *Kingella*, *Klebsellia*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*,

*Lysinibacillus, Morganella, Paenibacillus, Pasteurella, Pediococcus, Propionibacterium, Proteus, Providencia, Serratia, Raoultella, Rothia, Staphylococcus, Streptococcus et Weissella.*

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention ressortiront mieux à la lecture de la description détaillée qui va suivre, faite de manière illustrative et non limitative.

La figure 1 représente la comparaison de la croissance des bactéries anaérobies dans les trois milieux A, B et C testés à l'exemple 3.

Afin de comparer l'efficacité des différents milieux testés ci-après de culture, on a réalisé la culture de 10 bactéries anaérobies et 20 bactéries aérobies les plus communément rencontrées en routine hospitalière en utilisant les méthodes de références (utilisation des flacons anaérobies pour cultiver les bactéries anaérobies et les flacons aérobies pour cultiver les bactéries aérobies). La liste de ces bactéries ainsi que leurs conditions de cultures sont détaillées dans le tableau 1 ci-après. Ces souches sont dans la collection de souches du laboratoire, la CSUR (Collection de Souches de l'Unité Rickettsies).

Tableau 1. Liste des microorganismes utilisés dans cette étude

<b>Bactéries aérobies</b>	<b>Bactéries anaérobies</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> P412	<i>Bacteroides nordii</i> P3192
<i>Enterobacter aerogenes</i> P455	<i>Propionibacterium avidum</i> P3346
<i>Escherichia coli</i> P430	<i>Clostridium irregulare</i> P1913
<i>Klebsiella oxytoca</i> P1603	<i>Clostridium massilioamazoniensis</i> P1360
<i>Streptococcus agalactiae</i> P4162	<i>Clostridium butyricum</i> P344
<i>Serratia marcescens</i> P587	<i>Clostridium beijerinckii</i> P883
<i>Enterococcus faecalis</i> P2282	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> P575
<i>Proteus mirabilis</i> P2711	<i>Propionibacterium acnes</i> P637



<i>Pseudomonas aeruginosa</i> P2378	<i>Finegoldia magna</i> P588
<i>Streptococcus mitis</i> P4157	<i>Bacteroides fragilis</i> P444
<i>Staphylococcus epidermidis</i> P4227	<i>Akkermansia muciniphila</i> P4531 et P3284
<i>Morganella morganii</i> P4358	<i>Prevotella histicola</i> P1055
<i>Citrobacter freundii</i> P4462	<i>Prevotella denticola</i> P1023
<i>Enterobacter cloacae</i> P4822	
<i>Bacillus circulans</i> P655	
<i>Neisseria meningitidis</i> P782	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> P3582	
<i>Staphylococcus hominis</i> P3863	
<i>Acinetobacter baumannii</i> P1976	
<i>Haemophilus influenzae</i> P4027	

---

Pour tester la croissance des bactéries dans les différents milieux, en atmosphère aérobie, les inventeurs ont vidé des flacons d'hémoculture et les ont remplis avec le milieu de culture. Une fois le mélange homogène et les poudres dissoutes, le milieu a été filtré à travers un filtre de 0,2 µm d'épaisseur, afin de le  
5 stériliser. 40 millilitres de ce milieu a ensuite été transféré dans chacun des flacons de culture, contenant une atmosphère aérobie. .

Afin d'ensemencer les flacons de culture avec les bactéries, les inventeurs ont dilué pour chaque bactérie une colonie, ce qui correspond à environ  $10^6$  bactéries,  
10 dans 1 millilitre du même milieu de culture. Après avoir vortexé le tube contenant ce mélange, afin de diluer correctement la colonie dans le liquide, les inventeurs ont injecté le millilitre dans le flacon de culture à l'aide d'une seringue et d'une aiguille stérile et ont mis le flacon à incuber à 37°C pendant 72 heures pour les bactéries anaérobies et 24 heures pour les bactéries aérobies. Le même protocole a été réalisé

pour chaque bactérie. Un millilitre de milieu contenant  $10^6$  bactéries ayant été introduit dans un flacon de culture de 40 millilitres, la quantité finale de bactéries dans le flacon de culture est de  $2,5 \times 10^4$  bactéries.

Les bactéries aérobies utilisées pour réaliser cette étude sont cultivées et repiquées sur le milieu gélosé Columbia agar + 5% de sang de mouton incubées dans une étuve maintenue à température constante de  $37^\circ\text{C}$  sans ajout de  $\text{CO}_2$ . Les bactéries anaérobies ont été cultivées sur ce même milieu et déposées dans des jarres anaérobies équipées de générateurs d'anaérobiose. Après leur croissance, les bactéries aérobies et anaérobies ont été identifiées par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF comme précédemment décrit [4].

Les inventeurs ont étudié la croissance des souches de bactéries aérobies, et des souches de bactéries anaérobies, du tableau 1, dans 3 milieux liquides différents.

Pour l'inoculation des bactéries dans les flacons d'hémocultures, les inventeurs ont réalisés des suspensions bactériennes de chacune des souches testées. Pour cela, 1 mL de chaque milieu de culture respectivement a été distribué dans chaque tube eppendorf, sachant qu'il y a trois tubes eppendorf par bactérie (un tube pour chaque milieu différent).

Pour chaque bactérie, une colonie, correspondant à environ  $10^6$  bactéries, a été introduite dans le tube eppendorf contenant 1 mL du milieu de culture. Les inventeurs ont vortexé le tube afin d'obtenir un mélange homogène de la colonie dans le milieu de culture. Ils ont ensuite inoculé la bactérie dans le flacon de culture à l'aide d'une seringue et d'une aiguille stérile.

Le flacon de culture a ensuite été mis à incuber pendant 72 heures à  $37^\circ\text{C}$ .

Ce protocole a été réalisé pour chacune des bactéries et chacun des milieux.

Sur la figure 1, on rapporte les résultats de la croissance des bactéries anaérobies en aérobie. Après 72 heures d'incubation, les inventeurs ont mesuré la densité optique (DO) de chaque flacon de culture. Pour avoir une mesure objective, ils ont fait le témoin sur du milieu de culture non inoculé, afin de mettre en évidence la croissance bactérienne.

La DO a été mesurée pour chacune des bactéries dans chacun des milieux. Par exemple, pour le milieu testé, le témoin ou zéro a été fait avec ce même milieu non inoculé, puis la mesure de DO a été faite pour chacune des bactéries. Le témoin est toujours fait avec le milieu qui a été introduit dans la culture dont on veut mesurer la DO. L'appareil de mesure (Fisher scientifique, Illkirch, France) ne permet pas de mesurer des DO au-delà de 2 qui correspondent à des fortes croissances de bactéries.

### Exemple 1

Les inventeurs ont testé différents antioxydants, ainsi que différents mélanges et sélectionné le mélange décrit ci-dessus, dans la formule du milieu de culture selon l'invention.

Afin de sélectionner le meilleur mélange d'antioxydants, les inventeurs ont testé un total de 13 antioxydants.

Dans un premier temps, les inventeurs ont testé le mélange de base d'antioxydants, déjà connu, à savoir l'hydrosulfure de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}$ ), la L-Cystéine, l'acide ascorbique et le glutathion, avec la peroxydase. Puis, ce même mélange avec la super oxyde dismutase et enfin avec l'oxydase. Cependant, les inventeurs n'ont pas observé d'amélioration dans la croissance des bactéries anaérobies en aérobie.

Ils ont alors testé 6 autres antioxydants avec le mélange de base décrit ci-dessus. Pour cela, ils ont expérimenté 58 combinaisons différentes de tous ces antioxydants (cf tableaux 2A-2C ci-après).

Ils ont testé ces mélanges en milieu liquide, sur des plaques de culture 24 puits (Greiner Bio-One International, Kremsmünster, Autriche) avec plusieurs bactéries aérobies et anaérobies dont la bactérie *Fingoldia magna*, car c'est la bactérie qui avaient montré le plus de difficulté à croître lors des tests réalisés dans le laboratoire sur le milieu Versatrek™ avec antioxydants.

Pour chaque plaque, les inventeurs ont utilisé trois puits comme témoin négatif, ces puits contenaient 1 mL du milieu R-medium avec les antioxydants de base mais sans bactéries et trois puits contenant 1 mL du même milieu mais avec

ensemencement de la bactérie *Finegoldia magna* pour montrer qu'il n'y avait pas une croissance optimale de cette bactérie dans le mélange initial. De plus, pour avoir un témoin positif, les inventeurs ont dupliqué chaque plaque et ont mis le duplicata en condition d'anaérobie, les bactéries testées étant anaérobie stricte.

5 Afin de tester chaque antioxydant et différentes combinaisons de ces antioxydants, les inventeurs ont préparé des solutions mères des 6 antioxydants testés en plus du mélange d'antioxydants de base.

Du milieu R-medium avec les antioxydants de base a été distribué dans chaque puits et à ces puits, un certain volume de la solution mère de chaque  
10 antioxydant, correspondant à la concentration souhaitée, a été ajouté dans les puits. La répartition des antioxydants dans les puits a suivi le tableau 2. Le volume de R-medium avec les antioxydants de base, ajouté dans les puits est la différence entre les 1 mL, souhaité comme volume final et les volumes des antioxydants ajoutés. En effet, pour ne pas créer de biais, les inventeurs ont souhaité que le volume final,  
15 après ajout des antioxydants, dans chaque puits soit de 1 mL

Les solutions mères des 6 antioxydants ont été préparées dans les quantités et proportions pondérales suivantes:

- Catalase : Dissolution de 100 mg de catalase dans 100 mL d'eau distillée. Obtention d'une solution mère à une concentration de 1 g/L. Pour obtenir une  
20 concentration finale, dans chaque puits, de 160 mg/L, 160 µL de la solution mère ont été ajoutée dans les puits concernés.

- Ubiquinol : Dissolution de 100 mg d'ubiquinol dans 100 mL d'eau distillée. Obtention d'une solution mère à une concentration de 1 g/L. Pour obtenir une  
25 concentration finale, dans chaque puits, de 160 mg/L, 160 µL de la solution mère ont été ajoutée dans les puits concernés.

- BHT : Dissolution de 50 mg de BHT dans 10 mL d'éthanol car le BHT n'est pas soluble dans l'eau. Obtention d'une solution mère à une concentration de 5 g/L. Pour obtenir une concentration finale, dans chaque puits, de 100 mg/L, 20 µL de la solution mère ont été ajoutée dans les puits concernés.

30 - Vitamine E : Dissolution de 10 mg de vitamine E dans 10 mL d'éthanol car la vitamine E n'est pas soluble dans l'eau. Obtention d'une solution mère à une

concentration de 1 g/L. Pour obtenir une concentration finale, dans chaque puits, de 100  $\mu\text{M}$  soit 43 mg/L, 43  $\mu\text{L}$  de la solution mère ont été ajoutée dans les puits concernés.

5 - Acide lipoïque : Dissolution de 100 mg d'acide lipoïque dans 10 mL d'éthanol car l'acide lipoïque n'est pas soluble dans l'eau. Obtention d'une solution mère à une concentration de 10 g/L. Pour obtenir une concentration finale, dans chaque puits, de 100 mg/L, 10  $\mu\text{L}$  de la solution mère ont été ajoutée dans les puits concernés.

10 - NAD : Dissolution de 10 mg de NAD dans 10 mL d'eau distillée. Obtention d'une solution mère à une concentration de 1 g/L. Pour obtenir une concentration finale, dans chaque puits, de 15 mg/L, 15  $\mu\text{L}$  de la solution mère ont été ajoutée dans les puits concernés.

Les inventeurs ont mesuré le pH de chaque solution mère et l'ont ajusté au pH de  $7,3 \pm 0,2$  quand cela était nécessaire.

15 Les inventeurs ont préparé une suspension de la bactérie *Fingoldia magna* concentrée à  $10^4$  et ont prélevé 100  $\mu\text{L}$  de cette solution qu'ils ont introduit dans chacun des puits, afin d'obtenir une concentration bactérienne finale de  $10^3$  bactéries par millilitre. Ils ont ensuite incubé les boîtes témoin positif en anaérobie et les plaques testées en aérobie, durant 72h et à  $37^\circ\text{C}$ .

20 Après 72 h d'incubation, les inventeurs ont observé les plaques et sélectionné la combinaison en antioxydants qui avait entraîné la turbidité la plus importante du milieu liquide. Ils n'ont pas mesuré de manière quantitative la croissance bactérienne, ils se sont basés sur une observation d'un trouble éventuel reflétant la croissance bactérienne. Certains autres puits ont montré un léger trouble  
25 mais rien de comparable à la turbidité surprenante de la combinaison la plus favorable sélectionnée des 7 antioxydants du tableau 2B avec ajout de - catalase, ubiquinol et acide lipoïque au mélange de base d'antioxydants, déjà connu, à savoir l'hydrosulfure de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}$ ), la L-Cystéine, l'acide ascorbique et le glutathion .

30 La combinaison la plus favorable à la croissance de cette bactérie a été le mélange antioxydants de base comprenant les antioxydants, l'hydrosulfure de

sodium (Na<sub>2</sub>S), la L-Cystéine, l'acide ascorbique et le glutathion, combiné avec les 3 antioxydants supplémentaires : l'ubiquinol, la catalase et l'acide lipoïque.

Tableaux 2A-2C : Combinaisons des différents antioxydants, avec pour milieu de base le R-medium avec les 4 antioxydants de base (hydrosulfure de sodium (Na<sub>2</sub>S), L-Cystéine, acide ascorbique, glutathion) (3 tableaux 2A, 2B et 2C, chaque tableau représentant une plaque).

Dans les tableaux 2A à 2C :

- BHT = Butylhydroxytoluène
- NAD = Nicotinamide adénine dinucléotide

10 Le BHT est un antioxydant synthétique, E321 listé comme antioxydant au Codex alimentarius. [5]).

Le NAD est un antioxydant endogène Co-Enzyme 1 A de Niacine présent dans toute cellule vivante de mammifère.

Tableau 2A = ajout de 2 antioxydants

Témoin négatif	Témoin négatif	Témoin négatif	Base R-medium sans acide urique avec F.magna	Base R-medium sans acide urique avec F.magna	Base R-medium sans acide urique avec F.magna
Catalase 160 mg/L	Ubiquinol 160 mg/L	BHT 100 mg/L	Vitamine E 100 µM soit 43 mg/L	NAD 15 mg/L	Acide lipoïque 10 mg/L
Catalase Ubiquinol	Catalase BHT	Catalase Vitamine E	Catalase NAD	Catalase Acide lipoïque	Ubiquinol BHT
Ubiquinol Vitamine E	Ubiquinol NAD	Ubiquinol Acide lipoïque	BHT Vitamine E	BHT NAD	BHT Acide lipoïque

Tableau 2B = ajout de 3 ou 4 antioxydants

Témoïn négatif	Témoïn négatif	Témoïn négatif	Base R- medium sans acide urique avec F.magna	Base R- medium sans acide urique avec F.magna	Base R- medium sans acide urique avec F.magna
- Vitamine E - NAD - BHT	- Vitamine E - Acide lipoïque - NAD	- Catalase - Ubiquinol - BHT	- Catalase - Ubiquinol - Vitamine E	- Catalase - Ubiquinol - NAD	<b>- Catalase</b> <b>- Ubiquinol</b> <b>- Acide lipoïque</b>
- Ubiquinol - BHT - Vitamine E	- Ubiquinol - BHT - NAD	- Ubiquinol - BHT - Acide lipoïque	- Ubiquinol - Vitamine E - NAD	- Ubiquinol - Vitamine E - Acide lipoïque	- Ubiquinol - NAD - Acide lipoïque
- Catalase - Ubiquinol - Acide lipoïque - BHT	- Catalase - BHT - Vitamine E - NAD	- Catalase - BHT - Vitamine E - Acide lipoïque	- Catalase - Vitamine E - NAD - Acide lipoïque	- Ubiquinol - BHT - Vitamine E - NAD	- Ubiquinol - BHT - Vitamine E - Acide lipoïque

Tableau 2C = ajout de 5 antioxydants

Témoïn négatif	Témoïn négatif	Témoïn négatif	Base R- medium sans acide urique avec F.magna	Base R- medium sans acide urique avec F.magna	Base R- medium sans acide urique avec F.magna
- Ubiquinol - BHT - NAD - Acide lipoïque	- Ubiquinol - Vitamine E - NAD - Acide lipoïque	- BHT - Vitamine E - NAD - Acide lipoïque	- Catalase - Ubiquinol - BHT - Vitamine E	- Catalase - Ubiquinol - BHT - Vitamine E - Acide lipoïque	- Catalase - Ubiquinol - BHT - NAD - Acide lipoïque

- Catalase - Ubiquinol - NAD - Acide lipoïque Vitamine E	- Catalase - Vitamine E - BHT - NAD - Acide lipoïque	- Ubiquinol - Vitamine E - BHT - NAD - Acide lipoïque	- NAD - Acide lipoïque - Catalase - Ubiquinol - Vitamine E - BHT		
--	--	---	---	--	--

### Exemple 2

Afin de démontrer que cette meilleure croissance des bactéries anaérobies testées, en aérobie, était due seulement au mélange d'antioxydants et non pas au milieu de culture de base utilisé, les inventeurs ont testé l'ancienne version d'antioxydants (hydrosulfure de sodium (Na<sub>2</sub>S), L-Cystéine, acide ascorbique, glutathion) dans le milieu Versatrek™ commercialisé (société I2a, Montpellier, France) et la nouvelle version d'antioxydants dans ce même milieu (hydrosulfure de sodium (Na<sub>2</sub>S), L-Cystéine, acide ascorbique, glutathion, catalase, ubiquinol et acide lipoïque.

Concernant le milieu Versatrek™ + 4 antioxydants de l'art antérieur, les flacons VersaTREK™ supplémenté (société I2a, Montpellier, France) ont été supplémentés en composés antioxydants conventionnels suivants dans les quantités et proportions pondérales suivantes pour 25 mL :

15	- Hydrosulfure de sodium (Na <sub>2</sub> S) :	0,25 g (0,025 %)
	- Acide urique :	0,2 g (0,02 %)
	- Acide ascorbique :	0,5 g (0,05 %)
	- Glutathion :	0,05 g (0,005 %)

Concernant le milieu Versatrek + 7 antioxydants selon l'invention, les flacons VersaTREK™ supplémenté (société I2a, Montpellier, France) ont été supplémentés en composés antioxydants conventionnels suivants dans les quantités et proportions pondérales suivantes pour 1L :



	- Hydrosulfure de sodium (Na <sub>2</sub> S) :	0,5 g (0,05 %)
	- Acide urique :	0,4 g (0,04 %)
	- Acide ascorbique :	1 g (0,1 %)
	- Glutathion :	0,1 g (0,01 %)
5	- Catalase :	0,16 g (0,016 %)
	- Ubiquinol :	0,16 g (0,016 %)
	- Acide lipoïque :	0,010 g (0,001 %)

Les bactéries anaérobies citées précédemment ont été testées dans ces deux milieux et incubées à 37°C pendant 72h et les inventeurs ont pu observer une  
10 meilleure croissance de ces bactéries dans le mélange milieu Versatrek + 7 antioxydants.

Les inventeurs ont pu en déduire que le milieu nutritionnel de base utilisé importe peu, si le mélange des 7 antioxydants est ajouté au milieu, les bactéries anaérobies auront une meilleure croissance en aérobie.

15 Exemple 3 : Tests comparatifs sur la croissance de bactéries anaérobies fastidieuses courantes.

On évalue ci-après les performances de croissance des différents milieux de culture en culture incubés dans une étuve à 37°C, à savoir le milieu du flacon universel de culture selon la présente invention et des milieux connus comparatifs  
20 comprenant un milieu de culture en aérobie et anaérobie classiques BD BACTEC™ à base de bouillon Trypticase soja enrichi ( milieu A sur la figure 1) et un milieu de flacons d'hémoculture VersaTREK™ supplémenté avec des antioxydants décrits ci-après ( milieu B sur la figure 1) (référence 191401, VersaTREK REDOX 1 aérobie de la société I2a, Montpellier, France) [3].

25 Le milieu de culture selon l'invention dénommé « R medium » ( milieu C sur la figure 1) comprend les composants suivants dans les quantités et proportions pondérales suivantes pour 1L :

Milieu de base:

	- Hydrolisat de caséine:	15 g (1,5 %)
	- Proteose peptone:	15 g (1,5 %)
	- Extrait de levure:	10 g (1 %)
	- $\alpha$ -cétoglutarate :	2 g (0,2 %)
5	- Chlorure de sodium (NaCl) :	5 g (0,5 %)
	- Glucose:	10 g (1 %)
	- Dipotassium phosphate ( $K_2HPO_4$ ) :	0,83 g (0,083%)

Composés antioxydants :

	- Hydrosulfure de sodium ( $Na_2S$ ) :	0,5 g (0,05 %)
10	- L-Cystéine :	0,5 g (0,05 %)
	- Acide ascorbique :	1 g (0,1 %)
	- Glutathion :	0,1 g (0,01 %)
	- Catalase :	0,16 g (0,016 %)
	- Ubiquinol :	0,16 g (0,016 %)
15	- Acide lipoïque :	0,010 g (0,001 %)

Les deux autres milieux testés, à savoir les flacons de culture anaérobies BD BACTEC™ et les flacons VersaTREK™ supplémenté (société I2a, Montpellier, France) supplémentés en composés antioxydants conventionnels suivants dans les quantités et proportions pondérales suivantes pour 25 mL :

20	- Hydrosulfure de sodium ( $Na_2S$ ) :	0,25 g (0,025 %)
	- Acide urique :	0,2 g (0,02 %)
	- Acide ascorbique :	0,5 g (0,05 %)
	- Glutathion :	0,05 g (0,005 %)

Les résultats ont montré que pour un même temps d'incubation, la DO mesurée pour les bactéries anaérobies incubées en atmosphère aérobie est supérieure avec le milieu de culture de la présente invention ( milieu C de la figure 1), par rapport aux milieux VersaTREK™ supplémenté en antioxydants (milieu B de la figure 1), et le flacon de culture avec le milieu de culture anaérobie BD BACTEC™ ( milieu A de la figure 1), utilisé communément comme montré sur la figure 1.

La figure 1 représente les DO illustrant la croissance des bactéries anaérobies dans les trois milieux A, B et C testés à 72h d'incubation à 37°C pour les 10 bactéries anaérobies fastidieuses suivantes communément rencontrées en pratiques hospitalières : *Bacteroides nordii*, *Propionibacterium avidum*, *Clostridium irregular*, *Clostridium massilioamazoniensis*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium beijerinckii*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Propionibacterium acnes*, *Finegoldia magna* et *Bacteroides fragilis*.

Des résultats similaires ont été obtenus pour les bactéries aérobies dans les trois milieux testés.

Exemple 4 : Test de croissance de différentes autres bactéries fastidieuses retrouvées chez l'homme dans la cavité orale ou le tractus gastro-intestinal

Le milieu de culture de la présente invention R medium et le milieu Versatek™ supplémenté restent identiques à ceux décrits dans l'exemple 3.

Les inventeurs ont testés 2 souches de *Prevotella* : *P. denticola* et *P. histicola* et 2 souches d'*Akkermansia muciniphila* P3284 et P4531.

Ces bactéries sont anaérobies strictes et sont retrouvées chez l'homme dans la cavité orale ou le tractus gastro-intestinal.

De la même façon que décrit précédemment, les inventeurs ont réalisés des suspensions bactériennes de chacune des souches testées. Pour cela, 1 mL de milieu de culture a été distribué dans chaque tube eppendorf, sachant qu'il y a un tube eppendorf par bactérie.

Pour chaque bactérie, une colonie, correspondant à environ  $10^6$  bactéries, a été introduite dans le tube eppendorf contenant 1 mL du milieu de culture. Les

inventeurs ont vortexé le tube afin d'obtenir un mélange homogène de la colonie dans le milieu de culture. Ils ont ensuite inoculé la bactérie dans la bouteille d'hémoculture à l'aide d'une seringue et d'une aiguille stérile.

Le flacon de culture a ensuite été mis à incuber pendant 5 jours à 37°C.

- 5 Les 4 souches des 3 bactéries ont eu une croissance dans le milieu selon l'invention R-medium et pas de croissance dans le milieu Versatek™ supplémenté décrit à l'exemple 3.

## BIBLIOGRAPHIE

(1) Strobel H. Basic laboratory culture methods for anaerobic bacteria. In : Jonathan R. Mielenz, editor. 2009 p 247-248

5 (2) N. Dione, S. Khelaifia, B. La Scola, J.C. Lagier, D. Raoult. A quasi-universal medium to break the aerobic/anaerobic bacterial culture dichotomy in clinical microbiology. G. Greub, editor. Clin Microbiol Infect. 2016 Jan;22(1):53-8. January 2016.

10 (3) Grégory Dubourg, Elodie Guilhot, Saber Khelaifia, Enora Tomei, Jean-Paul Casalta, Pierre-Yves Lévy, Hervé Tissot-Dupont, Didier Raoult.. Evaluation of the Versatrek universal vial in the diagnosis of bacteremia: a preliminary report. (submitted).

15 (4) Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Infect Dis. 2009 Aug 15;49(4):543-51.

(5) Codex alimentarius, normes alimentaires internationale. CAC/GL 36-1989. Page 10

## Revendications

1. Milieu de culture liquide polyvalent pour culture en atmosphère aérobie de bactéries anaérobies ou bactéries aérobies comprenant un milieu de culture de base pour bactéries aérobies et anaérobies caractérisé en ce qu'il comporte en outre le  
 5 mélange de composés antioxydants suivants: hydrosulfure de sodium (Na<sub>2</sub>S), L-Cystéine, acide ascorbique , glutathion, catalase, ubiquinol et acide lipoïque.

2. Milieu de culture selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les dits composés antioxydants aux quantités et proportions pondérales suivantes pour 1L :

- 10 - Hydrosulfure de sodium : au moins 0,25 g (0,025%), de préférence de 0,25 g à 0,5 g (0,025 à 0,05 %)
- L-Cystéine : au moins 0,25 g (0,025%), de préférence de 0,25 g à 0,5 g (0,025 à 0,05 %)
- Acide ascorbique : au moins 0,5 g (0,05%), de préférence de 0,5 à 1 g  
 15 (0,05 à 0,1 %)
- Glutathion : au moins 0,1 g (0,01%), de préférence de 0,1 à 0,5 g (0,01 à 0,05 %)
- Catalase : au moins 0,06 g (0,006%), de préférence de 0,06 à 0,16 g (0,006 à 0,016 %)
- 20 - Ubiquinol : au moins 0,06 g (0,006%), de préférence de 0,06 à 0,16 g (0,006 à 0,016 %)
- Acide lipoïque : au moins 0,01 g (0,001%), de préférence de 0,01 à 0,015 g (0,001 à 0,0015 %)

3. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comprend en outre les composants nutritifs suivants dans le dit milieu de culture de base :

- plusieurs sources de carbone et d'azote, de préférence choisies parmi un extrait de levure, un sel d'acétate et une peptone tryptique,
- une source de phosphore, de préférence un sel de phosphate ,
- au moins un sucre,
- au moins un sel de métaux choisis parmi K, Mg, Na et Ca, de préférence NaCl,
- ainsi que
- au moins une substance tampon régulateur de pH pour ajuster le pH de 7 à 8, de préférence  $K_2HPO_4$ , ou  $NaHCO_3$  pour ajuster le pH à 7,5,
- au moins une vitamine ou facteur de croissance.

4. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ledit milieu de culture de base est un milieu acellulaire conventionnel de bactérie comprenant des composants choisis parmi un extrait de broyat ou lysat de tissu pluricellulaire, un digestat enzymatique, notamment un digestat enzymatique de caséine, soja et/ou de tissu animal, une peptone, un extrait de levure, un sucre tel que dextrose ou glucose, un sel NaCl et/ou  $Na_2PO_4$ .

5. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ledit milieu de culture de base est un milieu de culture liquide pour culture de

bactéries anaérobies dans un échantillon sanguin, selle, crachat ou sécrétion vaginale.

6. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ledit milieu de culture de base comprend les composants nutritifs suivants:

- 5
- Hydrolisat de caséine ;
  - Protéose peptone ;
  - Extrait de levure ;
  - Glucose,
  - Chlorure de sodium (NaCl) ; et
- 10
- un facteur de croissance :  $\alpha$ -cétoglutarate.

7. Milieu de culture selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il comprend les composants suivants dans les quantités et proportions pondérales suivantes pour 1L :

- |    |  |                  |
|----|--|------------------|
|    | - Hydrolisat de caséine:                 | 15 g (1,5 %)     |
| 15 | - Proteose peptone:                      | 15 g (1,5 %)     |
|    | - Extrait de levure:                     | 10 g (1 %)       |
|    | - $\alpha$ -cétoglutarate :              | 2 g (0,2 %)      |
|    | - Chlorure de sodium (NaCl) :            | 5 g (0,5 %)      |
|    | - Glucose:                               | 10 g (1 %)       |
| 20 | - Dipotassium phosphate ( $K_2HPO_4$ ) : | 0,83 g (0,083 %) |



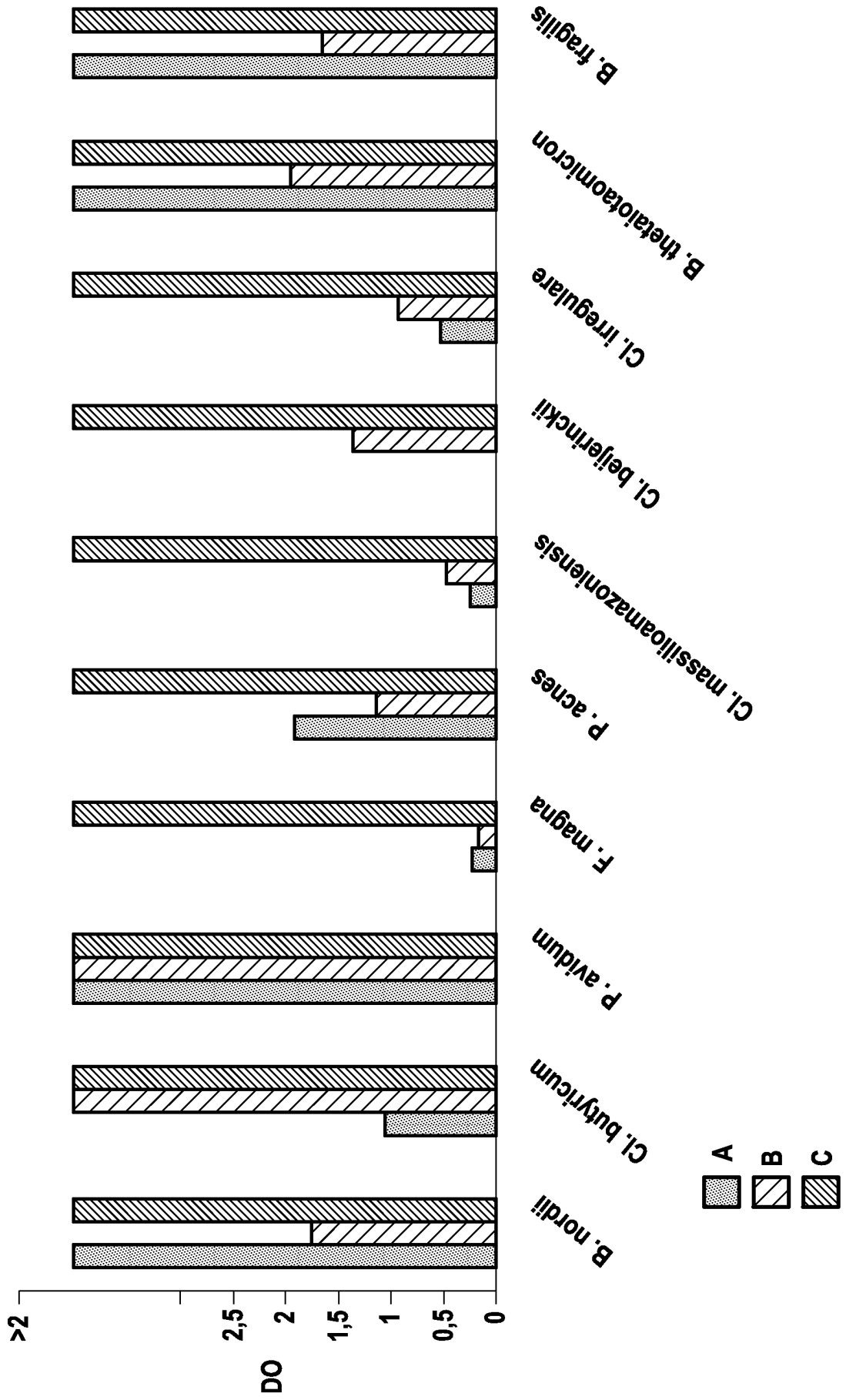
- Hydrosulfure de sodium (Na<sub>2</sub>S) : 0,5 g (0,05 %)
- L-Cystéine : 0,5 g (0,05 %)
- Acide ascorbique : 1 g (0,1 %)
- Glutathion : 0,1 g (0,01 %)
- 5 - Catalase : 0,16 g (0,016 %)
- Ubiquinol : 0,16 g (0,016 %)
- Acide lipoïque : 0,010 g (0,001 %)

Le pH de la solution étant ajusté à  $7,5 \pm 0,2$  avec du KOH 10M.

8. Procédé de culture in vitro d'une bactérie aérobie ou anaérobie sous  
10 atmosphère aérobie avec un milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 7.

9. Procédé de culture selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'on réalise une culture d'une dite bactérie dans un échantillon de sang, selle, crachat ou sécrétion vaginale.

10. Procédé de culture selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce que on  
15 réalise une culture d'une dite bactérie anaérobie stricte choisie parmi *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides nordii*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium massilioamazoniensis*, *Clostridium irregulare*, *Fingoldia magna*, *Propionibacterium acnes* et *Propionibacterium avidum*, *Prevotella denticola* et *Prevotella histicola*.



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 843700  
FR 1757574

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A,D	N. DIONE ET AL: "A quasi-universal medium to break the aerobic/anaerobic bacterial culture dichotomy in clinical microbiology", CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTION., vol. 22, no. 1, 1 janvier 2016 (2016-01-01), pages 53-58, XP055361668, United Kingdom, Switzerland ISSN: 1198-743X, DOI: 10.1016/j.cmi.2015.10.032 * abrégé * * page 54, col. 2, par. 3; page 55, col. 2, par. 1-3; Table I *	1-10	C12N1/20 C12P39/00
A	KHELAIFIA S ET AL: "Aerobic culture of methanogenic archaea without an external source of hydrogen", EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY & INFECTIOUS DISEASES, SPRINGER, WIESBADEN, DE, vol. 35, no. 6, 24 mars 2016 (2016-03-24), pages 985-991, XP035893122, ISSN: 0934-9723, DOI: 10.1007/S10096-016-2627-7 [extrait le 2016-03-24] * abrégé * * page 985, col. 1, par. 2; page 987, col. 2, 'Results' par. 1 et 2 *	1-10	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) C12N
A,D	WO 2014/064359 A1 (FOND MEDITERRANEE INFECTION [FR]) 1 mai 2014 (2014-05-01) * abrégé * * page 5 ligne 15-page 6 ligne 15; revendications 1-17 *	1-10	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
7 décembre 2017		Dumont, Elisabeth	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1757574 FA 843700**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.  
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **07-12-2017**  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2014064359 A1	01-05-2014	EP 2909308 A1	26-08-2015
		FR 2997091 A1	25-04-2014
		FR 2997092 A1	25-04-2014
		WO 2014064359 A1	01-05-2014
-----			

**PARTIE IV : Elaboration d'un  
procédé de fabrication d'une gélose  
bi-phasique.**

## AVANT-PROPOS

Actuellement, lors de l'incubation prolongée des géloses dans des étuves à température constante (37°C) un problème de dessiccation est observé au bout de 72 à 96h d'incubation. Ce dessèchement des géloses empêche le bon déroulement de la culture et la croissance bactérienne. Afin de contourner ce problème de déshydratation, nous avons mis au point une nouvelle technique de culture basée sur l'utilisation d'un milieu de culture bi-phasique sous forme de gélose inclinée, préparé dans des tubes en verre stériles. Le nouveau concept inventé ici a pour but la préparation d'un milieu de culture composé de deux couches superposées, une couche constituée d'un milieu de culture gélosé (gélose inclinée) qui constitue le support de travail pour réaliser la culture bactérienne, sous laquelle est emprisonnée une deuxième couche de milieu liquide qui permet de réhydrater la gélose en continu.

Le milieu R-medium optimisé, précédemment décrit, a été expérimenté selon ce concept de gélose biphasique inclinée et les bactéries testées dans le précédent projet ont étéensemencées et incubées en aérobie. Nous avons pu observer la croissance de ces différentes bactéries en 48h. Jusqu'alors, la culture des bactéries anaérobies sur le milieu R-medium solide incubé en aérobiose, était difficile et peu sensible. Cette technique, alliée au R-medium, a permis de cultiver les bactéries anaérobies en aérobie, sans utiliser de générateurs d'anaérobiose.

**Brevet 3 : Procédé de préparation d'un milieu de culture  
bi-phasique de bactérie.**

Marion Bonnet, Saber Khelaifia, Didier Raoult

Brevet 1H53316 cas 26 FR1756709

Juillet 2017

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
COURBEVOIE

11 N° de publication : 3 068 987  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

21 N° d'enregistrement national : 17 56709

51 Int Cl<sup>8</sup> : C 12 N 1/20 (2006.01), C 12 M 1/24

12 DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 13.07.17.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la demande : 18.01.19 Bulletin 19/03.

56 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

60 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

Demande(s) d'extension :

71 Demandeur(s) : FONDATION MEDITERRANEE INFECTION — FR, ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE MARSEILLE Etablissement public — FR, INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) Etablissement public — FR.

72 Inventeur(s) : RAOULT DIDIER, KHELAIFIA SABER et BONNET MARION.

73 Titulaire(s) : FONDATION MEDITERRANEE INFECTION, UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE, ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE MARSEILLE, CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS), INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE).

74 Mandataire(s) : CABINET BEAU DE LOMENIE Société civile.

54 PROCEDE DE PREPARATION D'UN MILIEU DE CULTURE BI-PHASIQUE DE BACTERIE.

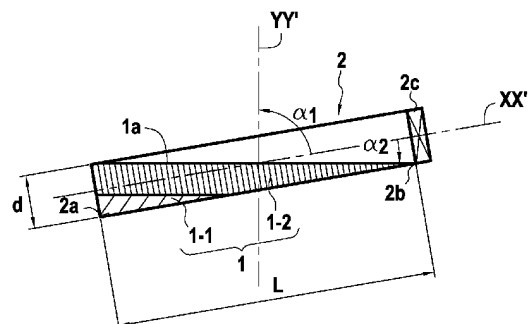
57 La présente invention concerne un procédé de préparation d'un milieu de culture solide biphasique (1) conditionné dans un tube (2) destiné à la culture de bactéries en conditions d'aérobiose comprenant les étapes successives suivantes dans lesquelles :

a.1) on verse au fond du tube, un premier milieu aqueux apte à être congelé ou gélifié, et on incline le dit tube selon une inclinaison déterminée par rapport à la verticale, et

a.2) on congèle ou gélifie ledit premier milieu jusqu'à former une première couche à l'état solide tel que la surface supérieure de la première couche présente une inclinaison déterminée ( $\alpha_2$ ) par rapport à l'axe (XX') du dit tube, et

b.1) on coule dans le tube, un deuxième milieu aqueux qui est un milieu de culture apte à former un milieu de culture solide, et on incline le dit tube selon une inclinaison déterminée (a) de son axe longitudinal (XX') par rapport à la verticale pour former une deuxième couche de dit deuxième milieu par-dessus ladite première couche, et

b.2) on gélifie ledit deuxième milieu jusqu'à former une deuxième couche de dit milieu de culture solide gélifié.



FR 3 068 987 - A1





## PROCEDE DE PREPARATION D'UN MILIEU DE CULTURE BI-PHASIQUE DE BACTERIE

La présente invention concerne un procédé de préparation d'un milieu de culture gélosé - ci-après abrégé par « gélose » - pour cultiver les bactéries en conditions d'aérobiose.

Plus particulièrement, la présente invention concerne un procédé de préparation d'un milieu de culture solide biphasique conditionné dans un tube de culture de bactéries destiné à la culture de bactéries en conditions d'aérobiose, ainsi qu'un milieu de culture solide biphasique conditionné dans un dit tube et un procédé de culture de bactéries aérobic ou anaérobic avec un dit milieu de culture solide biphasique conditionné dans un dit tube.

Lors de l'incubation des géloses ensemencées par des cultures bactériennes en aérobiose, les inventeurs ont observé une déshydratation des géloses au bout de 72 heures d'incubation. Or, certaines bactéries ont un temps de croissance plus long, supérieur à 72 heures, et qui peut aller jusqu'à 28 jours. Cette déshydratation réduit considérablement la possibilité d'une incubation longue de ces géloses empêchant ainsi les microbiologistes de réaliser des cultures de bactéries à croissance lente car la déshydratation des géloses entraîne une inhibition systématique de la croissance bactérienne. En effet, lors de la déshydratation de la gélose, il y a une perte d'eau du milieu de culture solide, ce qui a tendance à concentrer les éléments composants le milieu de culture tel que le sel par exemple. A une concentration trop importante, le sel tel que NaCl devient un inhibiteur car peu de bactéries sont halotolérantes. Par exemple, les bactéries halophiles peuvent tolérer une concentration de sel (NaCl) jusqu'à 200 g/L alors que les bactéries non halophiles ne peuvent tolérer qu'une concentration de 5 g/L.

Cette conséquence peut ainsi entraîner une inhibition de la croissance bactérienne.

Ce problème de déshydratation n'intervient qu'en aérobiose car les cultures anaérobies sont cultivées dans des boîtes fermées hermétiquement, empêchant ainsi l'évaporation et la déshydratation des milieux. Au contraire, les cultures aérobies sont

cultivées à l'air libre, favorisant une perte d'eau des milieux, lors de leur incubation dans des enceintes à 37°C.

On entend ici par « aérobiose », une atmosphère d'incubation qui est de l'air ou qui contient de l'oxygène à teneur réduite par rapport à l'air.

5 Dans WO2014/064359. et WO2015/162377, on a décrit des milieux de culture enrichis en agents antioxydants à savoir l'acide urique, l'acide ascorbique, le glutathion et l'hydrosulfure de sodium qui permettent d'améliorer et faciliter les conditions de croissance en culture acellulaire des bactéries dont la croissance est sensible à la tension en oxygène et notamment des bactéries qui tolèrent mal des  
10 tensions élevées d'oxygène et pour lesquelles une croissance optimale de la dite bactérie requière une atmosphère d'incubation à teneur en oxygène relativement réduite par rapport à la teneur en oxygène de l'air, lesdites bactéries étant choisies parmi les bactéries suivantes :

- les bactéries anaérobies, y compris les bactéries anaérobies strictes, et
- 15 - les bactéries microaérophiles du type citées ci-dessus.

Parmi les bactéries à croissance lente, on peut citer par exemple *Mycobacterium genavensae* (plusieurs semaines), *Mycobacterium tuberculosis* (2-3 semaines), *Bartonella quintana* (21 jours environs), *Bartonella henselae* (21 jours environs), *Methanobrevibacter smithii* (9-15 jours), ainsi que toutes les bactéries  
20 anaérobies strictes que l'on peut cultiver en aérobie (environ 5 jours minimum).

Actuellement, pour éviter cette déshydratation, les laboratoires incubent les géloses en chambre humide. Pour cela, des jarres en plastiques sont utilisées et un papier imbibé d'eau est ajouté dans la jarre dans laquelle les géloses ont été mises à  
25 incuber. La jarre est fermée hermétiquement et l'humidité reste ainsi prisonnière dans la jarre. Le problème de cette technique est le cout engendré par l'achat de ces jarres ainsi que place qui leur est consacré dans les étuves, ce qui peut être pénalisant lorsqu'il y a beaucoup de géloses à incuber.

Pour pallier à cette déshydratation des milieux lors de leur incubation en aérobie, les inventeurs ont mis au point un procédé qui permet de réhydrater en

permanence la gélose. Pour cela, les inventeurs ont élaboré un milieu de culture bi-phasique comprenant une gélose inclinée superposée à un milieu hydratant et un procédé de fabrication de cette gélose inclinée bi-phasique.

On connaît des milieux de culture bi-phasique mais qui sont utilisés pour  
5 améliorer la croissance des mycobactéries, et ainsi diminuer le temps nécessaire pour la détection et augmenter son pourcentage de détection. Un milieu biphasique a été décrit pour la culture du complexe *Mycobacterium tuberculosis* [1]. Un autre milieu biphasique permet de détecter le complexe *Mycobacterium avium* notamment dans le sang des patients atteints du VIH [2]. La phase solide du milieu est constituée du milieu 7H11 supplémenté en acide oléique albumine agar et la phase liquide est  
10 constituée d'un bouillon de BHI (Brain Heart Infusion). Dans les deux cas, ils comprennent un milieu liquide nutritif superposé par-dessus un milieu de culture solide ce qui empêche de réaliser une culture par ensemencement de bactérie sur milieu solide pour identifier la croissance de colonies sur milieu de culture solide.

15 Les inventeurs ont ainsi emprisonné la phase liquide hydratante du premier milieu sous la phase solide du deuxième milieu car lorsque la phase liquide est disposée dessus la phase solide, la surface libre d'ensemencement des bactéries aérobies par-dessus la gélose inclinée de la couche inférieure diminue voire disparaît totalement en cas d'étalement du milieu de culture liquide sur toute la surface de la  
20 gélose lors de l'inclinaison du tube de culture. Ceci empêche d'observer la croissance de colonies de la bactérie ensemencée en surface du milieu de culture solide. Par ailleurs, pour les bactéries anaérobies incubées en aérobie, la présence de liquide à la surface de la gélose et plus précisément au fond du tube, favorise une croissance de ces bactéries anaérobies dans le liquide, plutôt qu'à la surface de la gélose de la  
25 deuxième couche. En effet, une certaine condition d'anaérobiose s'installe au fond du tube dans le liquide où l'oxygène est moins présent.

Plus précisément, la présente invention a pour objet un procédé de préparation d'un milieu de culture solide biphasique conditionné dans un récipient de culture de bactéries, de préférence un tube de culture de bactéries, destiné à la  
30 culture de bactéries en conditions d'aérobiose caractérisé en ce qu'il comprend les étapes successives suivantes dans lesquelles :

a.1) on verse au fond du récipient, un premier milieu aqueux qui est liquide ou coulable mais apte à être congelé ou gélifié, et simultanément ou après ce versement, on incline le dit récipient selon une inclinaison déterminée ( $\alpha_1$ ) de son axe (XX') par rapport à la verticale, et

5 a.2) on congèle ou respectivement gélifie ledit premier milieu jusqu'à former une première couche du premier milieu à l'état congelé ou respectivement formant un gel qui a pris en masse telle que la surface supérieure de la première couche présente une inclinaison déterminée ( $\alpha_2$ ) par rapport à l'axe (XX') du dit récipient, et

10 b.1) on coule dans le récipient, un deuxième milieu aqueux qui est un milieu de culture gélosé d'une dite bactérie en conditions d'aérobiose, à l'état coulable mais apte à être gélifié et ainsi former un milieu de culture solide, et simultanément ou après ce coulage, on incline le dit récipient selon une inclinaison déterminée ( $\alpha_1$ ) de son axe (XX') par rapport à la verticale pour former une deuxième couche de dit deuxième milieu à l'état coulable par-dessus ladite première couche du premier milieu solide à l'état congelé ou respectivement formant un gel, la surface supérieure de la dite deuxième couche étant inclinée ( $\alpha_2$ ) par rapport à l'axe (XX') du dit récipient de préférence parallèlement à la surface supérieure de la première couche, et

20 b.2) on gélifie ledit deuxième milieu jusqu'à former une deuxième couche de dit milieu de culture solide gélosé d'une dite bactérie solide formant un gel qui a pris en masse telle que la surface supérieure de la première couche présente une inclinaison déterminée ( $\alpha_2$ ) par rapport à l'axe (XX') du dit récipient.

On comprend que :

25 - à l'étape a.1) ou b.1), si le premier ou deuxième milieu est apte à être gélifié et à l'état coulable, cela signifie qu'il contient alors au moins un agent gélifiant et qu'il se trouve à cette étape à une température à laquelle - après avoir été chauffé pour être rendu coulable - il n' a pas encore suffisamment refroidi pour prendre en masse ou devenir trop visqueux pour être coulé, et

30 - à l'étape a.2) ou b.2), le premier ou deuxième milieu apte à être gélifié, a refroidi et pris en masse de façon suffisamment visqueuse pour adhérer à la surface

du récipient de sorte la surface supérieure de la première couche garde une inclinaison déterminée ( $\alpha_2$ ) par rapport à l'axe (XX') du dit récipient quelle que soit l'inclinaison du récipient; et

-  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  sont des angles complémentaires tel que  $\alpha_1 + \alpha_2 = 90^\circ$ , et

5 - si à l'étape a.1), le dit premier milieu aqueux est un liquide ne contenant pas d'agent gélifiant, à l'étape a.2) il est congelé et après l'étape b.2) il redevient liquide après décongélation au bout d'un certain temps à température supérieure à la température de congélation.

10 De façon connue, un milieu de culture gélosé ou un milieu aqueux gélifié contient de 5 à 20% d'agents gélifiants.

En pratique, le dit récipient contenant le premier milieu contenant un agent gélifiant le cas échéant est soumis à un autoclavage en le chauffant à une température 121°C pendant 15 min qui permet de le stériliser et lui confère cette propriété de gélification lors du refroidissement après coulage à 56°C.

15 Selon la présente invention, on a découvert que la première couche de premier milieu aqueux liquide a pour effet une réhydratation progressive au cours du temps de la deuxième couche de milieu de culture solide selon le but de la présente invention.

Aux étapes a.1) et b.1), l'inclinaison du récipient permet :

20 - d'une part de garantir une épaisseur uniforme de la deuxième couche et donc une réhydratation homogène de celle-ci, et

- d'autre part, augmenter la surface de contact de la deuxième couche avec la première couche et donc améliorer sa réhydratation par celle-ci, et

25 - enfin, offrir une plus grande surface de travail apte à êtreensemencée par des bactéries à cultiver sur la surface libre inclinée de la deuxième couche.

On comprend que l'axe dudit récipient s'entend d'un axe de symétrie des parois latérales du récipient en élévation par rapport au fond, de préférence le dit récipient étant un récipient à fond plat et les parois latérales du récipient sont en

élévation perpendiculairement au fond plat du dit récipient comme l'axe du dit récipient.

On peut citer en particulier comme récipient de culture, un récipient de forme telle que la surface de contact de la deuxième couche avec les parois du récipient est supérieure, de préférence au moins le double par rapport à :

(a) d'une part, la surface de contact de la deuxième couche avec la première couche, et/ou

(b) d'autre part, la surface de contact de la première couche avec les parois du récipient.

10 Sur des boîtes de Pétri, cette condition n'est pas vérifiée.

On peut citer en particulier comme récipient de culture qui permette d'obtenir une gélose inclinée, tout récipient de préférence cylindrique et à fond plat, plus long que large, c'est à dire dont les parois latérales sont plus hautes que la largeur de la paroi de fond au-dessus de laquelle elles s'étendent.

15 Plus particulièrement, aux étapes a.1) et b.1), on verse une quantité de deuxième milieu supérieure à la quantité de premier milieu, de préférence les volumes respectifs de dit premier liquide par rapport au dit deuxième milieu étant tels que la surface libre de la deuxième couche s'étend depuis le fond dudit récipient jusqu'à proximité du bord supérieur du récipient.

20 Ceci permet que la surface de contact du deuxième milieu avec le récipient soit supérieure à celle du premier milieu et qu'ainsi l'adhérence de la deuxième couche solide sur les parois du récipient soit suffisante pour garantir que le premier milieu liquide ne déborde par-dessus la deuxième couche du dit milieu de culture en cours d'utilisation.

25 Plus particulièrement encore, ledit récipient est un tube et aux étapes a.1) et b.1), le rapport des volumes des premier milieu /deuxième milieu est de 1/10 à 4/10 et on incline l'axe (XX') du tube d'un angle  $\alpha_1$  de 50 à 75° par rapport à la verticale pour obtenir une inclinaison de la surface supérieure de la deuxième couche solide après l'étape b.2) d'un angle  $\alpha_2$  de 15 à 40° par rapport à l'axe du tube.

Ces quantités des premier milieu et deuxième milieu et angle d'inclinaison permettent en pratique d'étaler la surface de la deuxième couche depuis le fond du tube jusqu'à proximité du bord supérieur du tube pour un tube de culture standard à fond plat de 20 à 50 mL et de 14 à 20 cm de hauteur et 1.5 à 2.5 cm de diamètre.

5 De préférence, les surfaces supérieures des deux couches de milieux ont le même angle d'inclinaison respectivement par rapport à la verticale et à l'horizontale. Ceci permet d'obtenir une épaisseur constante de la deuxième couche et ainsi éviter que la gélose supérieure ne s'affaisse du fait d'un poids localement excessif vis-à-vis de la quantité relativement réduite de liquide de la couche inférieure.

10 Dans un mode de réalisation, le dit premier milieu est de l'eau ou un milieu de culture liquide de bactérie ne contenant pas d'agent gélifiant. A l'étape a.2), ce premier milieu ne contenant pas de gélifiant est congelé à l'azote liquide à -196°C ou à -80°C, la congélation est tellement importante, de sorte que le temps que le deuxième milieu soit coulé et se solidifie, la première couche congelée n'a pas le  
15 temps de fondre.

Selon un autre mode de réalisation, le dit premier milieu est un milieu de culture gélosé de dite bactérie.

Plus particulièrement encore, le dit premier milieu est un milieu de culture de dite bactérie contenant les mêmes éléments nutritifs et/ou mêmes facteurs de  
20 croissance que le dit milieu de culture gélosé de bactérie dudit deuxième milieu. Ainsi, en plus d'hydrater le deuxième milieu, cela permet de lui apporter les nutriments et/ou facteurs de croissance qui ont pu être consommés par les bactéries sur la gélose.

Plus particulièrement encore, le dit premier milieu est un milieu contenant un  
25 (ou des) premier (s) agent(s) gélifiants(s) dont la nature et/ou la quantité lui confère une viscosité et un pouvoir de rétention d'eau inférieurs à ceux du (ou des) deuxième(s) agent(s) gélifiant(s) du dit milieu de culture gélosé de bactérie dudit deuxième milieu.

Plus particulièrement encore, le(s) dit(s) deuxième(s) agent(s) gélifiant(s)  
30 confère(nt) au dit deuxième milieu solide une température de fusion supérieure à la

température à laquelle le(s) premier (s) agent(s) gélifiants(s) permettent d'obtenir un premier milieu à l'état coulable sans qu'il ne prenne en masse.

Plus particulièrement encore, le dit premier milieu est un milieu aqueux contenant comme premiers agents gélifiants le composé kappa-carraghénane, de préférence avec l'amidon,  $K_2HPO_4$  et  $CaCl_2$ , et le dit milieu de culture gélosé de bactéries dudit deuxième milieu solide contient de l'agar comme deuxième agent gélifiant.

Plus particulièrement encore, le dit premier milieu est un milieu gélifié contenant un (ou des) premier(s) agent(s) gélifiants(s) identique(s) au(x) deuxième(s) agent(s) gélifiant(s) du dit milieu de culture gélosé de bactéries dudit deuxième milieu solide, mais en quantité inférieure à celle du (ou des) deuxième(s) agent(s) gélifiant(s), de préférence de l'agar.

La présente invention a également pour objet un milieu de culture biphasique contenant un milieu de culture solide incliné, conditionné dans un récipient de culture de bactérie, de préférence un tube de culture de bactéries, destiné à la culture de bactéries en conditions d'aérobiose obtenu par un procédé de préparation selon l'invention caractérisé en ce qu'il comprend :

- une première couche d'un dit premier milieu aqueux situé au fond dudit récipient, la surface supérieure de la dite première couche étant inclinée d'un angle  $\alpha_1$  par rapport à l'axe (XX') du dit récipient, le dit premier milieu étant un milieu à l'état congelé ou gélifié, ou de préférence à l'état liquide, et

- une deuxième couche d'un dit deuxième milieu aqueux à l'état solide, la dite deuxième couche étant superposée par-dessus la dite première couche de sorte que la surface supérieure de la dite deuxième couche est inclinée par rapport à l'axe (XX') du dit récipient parallèlement à la surface supérieure de la première couche, ledit deuxième milieu solide étant un dit milieu de culture gélosé de dite bactérie en conditions d'aérobiose.

La présente invention a également pour objet un procédé de culture de bactéries en conditions d'aérobiose à l'aide d'un milieu de culture biphasique conditionné dans un dit récipient selon l'invention dans lequel on ensemence la



surface libre de la dite deuxième couche, de préférence disposée horizontalement, avec une dite bactérie en conditions d'aérobiose, puis laisse à incuber ledit récipient, dans une étuve à 37°C de préférence avec son axe (XX') disposé verticalement.

5 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à la lumière de la description détaillée des exemples de réalisations suivants.

La figure 1 représente schématiquement un tube de culture rempli d'un milieu de culture diphasique selon l'invention.

10 Les inventeurs ont utilisé des tubes en verre stérile (tube à essai) standard à fond plat 20 mL et de 14.5 cm de hauteur (L) et 1.6 cm de diamètre (d) de chez Bio-rad (France) ou Bolium (France) comme support de leur milieu de culture. Si les tubes sont achetés stériles, les inventeurs peuvent couler leur milieu directement dans ces tubes. En revanche, si les tubes ne sont pas stériles, les inventeurs devront les autoclaver à vide à une chaleur de 134°C pendant 18 minutes dans des emballages poreux.

### 15 **Exemple 1**

Pour fabriquer une gélose bi-phasique, les inventeurs ont réalisé les étapes suivantes:

1) 2 mL d'un premier milieu de culture liquide 1-1 sont versés au fond 2a de tubes en verre stériles 2. Ce milieu de culture liquide est mis à congeler à - 20 80°C durant 10 min, l'axe XX' du tube étant incliné de 60° par rapport la verticale YY' avec la surface libre du milieu de culture horizontale, de façon à obtenir une solidification sous forme inclinée du milieu de culture liquide (figure 1).

25 2) 10 mL d'un deuxième milieu de culture gélosé 1-2, comprenant les mêmes composants que le premier milieu mais étant supplémenté en agar, sous forme solide a été autoclavé à 121°C pendant 15 minutes, puis coulé, à une température d'environ 56°C, dans les tubes contenant une première couche 1-1 du premier milieu de culture congelé, le tube étant incliné également de 60° par rapport la verticale YY' comme à l'étape 1). Les tubes ne sont pas refermés avec un bouchon 2c immédiatement après le coulage de la gélose. En effet, on attend que la gélose du

deuxième milieu ait pris en masse et que la condensation, due à la chaleur dégagée par le deuxième milieu de culture lors de son coulage, ait disparu. On obtient ainsi une deuxième couche 1-2 gélose bi-phasique dont la surface supérieure libre 1a de la deuxième couche 1-2 du dit deuxième milieu de culture solide est de  $\alpha_2 = 30^\circ$  par rapport à l'axe XX' du tube, comme montré figure 1. En effet, la congélation à  $-80^\circ\text{C}$  du premier milieu de culture liquide permet d'obtenir une congélation assez importante du liquide pour que celui-ci ne se liquéfie pas immédiatement lors du coulage de la gélose chaude du deuxième milieu de culture.

D'autre part, ces volumes de premier et deuxième milieu et cet angle d'inclinaison permet en pratique d'étaler la surface de la deuxième couche depuis le fond 2a du tube jusqu'à proximité du bord supérieur 2b du tube pour un tube de culture standard à fond plat de 20 mL et de 14,5 cm de hauteur et 1.6 cm de diamètre.

L'obtention de la gélose bi-phasique permet d'avoir une hydratation permanente du milieu de culture et ainsi une croissance optimale des bactéries ensemencées sur ce milieu de culture.

Pour la congélation du premier milieu de culture liquide, au lieu de le congeler pendant 10 minutes à une température de moins  $80^\circ\text{C}$ , on peut le solidifier dans de l'azote liquide à  $-196^\circ\text{C}$ . Ce processus prend moins de temps puisque la congélation a lieu en environ 1 minute. Pour cela, le tube en verre stérile est introduit en position inclinée dans l'azote liquide, et est ressorti environ 1 min plus tard. La deuxième étape, qui consiste à couler le deuxième milieu de culture solide sur cette première base reste la même que celle explicitée précédemment.

Les milieux solides, Columbia et Schaedler comprenant les composants suivants dans un litre d'eau distillée sont utilisés de façon courante pour la culture des bactéries. Les bactéries lentes, citées ci-après ont été ensemencées sur ces milieux pris séparément mais lors de l'incubation en aérobie, les géloses se déshydratent. Lors de l'incubation prolongée de la gélose ( $>72\text{h}$ ) il est observé une déshydratation du milieu de culture qui se traduit par une fissuration de la gélose et un dessèchement, jusqu'à obtenir une « galette » complètement sèche.

En revanche, les résultats de culture étaient favorables sur des milieux biphasiques selon l'invention comprenant les composants de ces deux milieux sans agar pour le premier milieu et avec agar pour le deuxième milieu.

a) Milieu Columbia

5	• Caséine hydrolysate (Tryptone)	10 g (1 %)
	• Extrait de levure	5 g (0,5 %)
	• Proteose peptone	5 g (0,5 %)
	• Tryptic Digest of Beef Heart	3 g (0,3 %)
	• L-cystéine	0,1 g (0,01%)
10	• Glucose	2,5 g (0,25 %)
	• NaCl	5 g (0,5 %)
	• Sulfate de magnesium (MgSO <sub>4</sub> )	0,1 g (0,01 %)
	• Sulfate de fer (FeSO <sub>4</sub> )	0,02 g (0,002 %)
	• Carbonate de sodium (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	0,6 g (0,06 %)
15	• Tris (Hydroxymethyl) Aminométhane	0,83 g (0,083 %)
	• Tris (Hydroxymethyl) Aminométhane HCl	2,86 g (0,286 %)
	• (Agar	15 g (1,5 %))

b) Milieu Schaedler:

20	• Peptone trypticase-soja	10,0 g (1%)
	• Peptone	5,0 g (0,5 %)
	• Extrait de levure	5,0 g (0,5 %)
	• Chlorhydrate de cystéine	0,4 g (0,04 %)
	• Hémine	0,01 g (0,001 %)
	• Glucose	5,0 g (0,5 %)
25	• Tampon TRIS	0,75 g (0,075 %)
	• (Agar	13,5 g (1,35 %))

Une colonie de la bactérie choisie parmi les bactéries lentes suivantes est repiquée sur le dit milieu et la gélose est mise à incuber à 37°C : *Mycobacterium genavensae* (plusieurs semaines), *Mycobacterium tuberculosis* (2-3 semaines), *Bartonella quintana* (21 jours environs), *Bartonella henselae* (21 jours environs), *Methanobrevibacter smithii* (9-15 jours).

**Exemple 2**

La phase de congélation du premier milieu de culture liquide dans les tubes en verre stérile, que ce soit par le procédé de congélation à -80°C ou par le procédé de

congélation à l'azote liquide, n'est pas facilement réalisable par un industriel, dans un but de commercialisation. Pour pallier cet inconvénient, les inventeurs ont testé la mise en œuvre d'un premier milieu comprenant d'autres gélifiants que le deuxième milieu de culture, avec un pouvoir de rétention d'eau moindre que celui de l'agar afin de permettre ainsi d'hydrater la gélose, tout en ayant une légère gélification conférant une prise en masse suffisamment visqueuse du premier milieu pour assurer le support du coulage du deuxième milieu, permettant ainsi d'éviter la phase de congélation du premier milieu.

Dans ce but, les inventeurs ont testé comme autre gélifiant du premier milieu : la gomme kappa-carraghénane. La composition des premiers gélifiants (gélifiant du premier milieu) est la suivante, de préférence dans les quantités et proportions pondérales suivantes pour 1L:

- Kappa-carraghénane : 4 g (0,4%)
- $K_2HPO_4$  : 0,83 g (0,083%)
- 15 -  $CaCl_2$  : 0,1 g (0,01%)
- Amidon : 5 g (0,5%).

$K_2HPO_4$ ,  $CaCl_2$  et l'amidon permettent une meilleure prise en masse de la gomme kappa-carraghénane. Ce mélange est autoclavé avant d'être coulé à une température d'environ 56°C.

Le coulage des premier et deuxième milieux à 56°C est avantageux car les milieux ne gélifient qu'à 40°C pour le kappa-carraghénane et respectivement 35°C pour l'agar on reste en deçà de la température de fusion du premier milieu contenant kappa-carraghénane qui est supérieure à 65°C, la température de fusion du deuxième milieu contenant l'agar étant de 90°C .

En terme quantitatif, on met 15 g/L d'agar dans un milieu solide dont alors que pour avoir une gélification comparable, il faut 8 g/L de gomme kappa-carraghénane.

Ensuite, on place les tubes contenant le premier milieu coulé à chaud, en

pente inclinée, à gélifier au réfrigérateur à 4°C durant 10 minutes. On obtient une première couche ou sous-couche gélifiée mais de viscosité relativement inférieure à celle du deuxième milieu solide ci-après.

Une fois ce délai passé, le deuxième milieu de culture solide, constitué d'agar  
5 comme gélifiant, a été autoclavé puis coulé, à une température d'environ 56°C, dans les tubes contenant la sous-couche de premier milieu de culture composé du mélange des premiers gélifiants, sous forme inclinée également. On obtient une deuxième couche solidifiée de viscosité ou dureté supérieure à celle de la première couche grâce au deuxième gélifiant qu'est l'agar.

10 Les autres conditions et paramètres de mise en œuvre du procédé sont pour le reste, identiques à celles de l'exemple 1.

Les inventeurs ont obtenu une gélose bi-phasique contenant une sous couche constituée de premiers gélifiants avec un pouvoir moindre de rétention d'eau que l'agar. Cela permet une hydratation continue de la gélose du deuxième milieu de  
15 culture solide par relargage d'eau par les premiers gélifiants du premier milieu de culture.

Ces différents procédés de fabrication d'une gélose inclinée bi-phasique ont ainsi permis d'avoir une hydratation continue de la gélose, permettant la culture des mêmes nombreuses bactéries avec les mêmes composants de milieux de culture que  
20 ceux décrits à l'exemple 1.

### **Exemple 3**

Les inventeurs ont testé la mise en œuvre d'un premier milieu comprenant le même gélifiant que le deuxième milieu de culture, mais à une concentration moindre pour permettre ainsi d'hydrater la gélose du deuxième milieu, tout en ayant une  
25 légère gélification conférant une prise en masse suffisamment visqueuse du premier milieu pour assurer le support du coulage du deuxième milieu, permettant ainsi d'éviter la phase de congélation du premier milieu.

Dans ce but, les inventeurs ont testé des concentrations d'agar du premier milieu allant de 2.5 à 5 g/L d'agar. Ils ont obtenu une gélification mais beaucoup

moins dure que lorsqu'ils ont mis une concentration plus élevée d'agar du deuxième milieu de 15 g/L d'agar.

Ensuite, on place les tubes contenant le premier milieu coulé à chaud à 56°C, en pente inclinée, à gélifier au réfrigérateur à 4°C durant 10 minutes. On obtient une  
5 première couche ou sous-couche gélifiée mais de viscosité relativement inférieure à celle du deuxième milieu solide ci-après.

Une fois ce délai passé, le deuxième milieu de culture solide, constitué d'agar comme gélifiant, a été autoclavé puis coulé, à une température d'environ 56°C, dans les tubes contenant la sous-couche de premier milieu de culture composé du  
10 mélange des premiers gélifiants, sous forme inclinée également. On obtient une deuxième couche solidifiée de viscosité ou dureté supérieure à celle de la première couche grâce au gélifiant qu'est l'agar.

Les autres conditions et paramètres de mise en œuvre du procédé sont pour le reste, identiques à celles de l'exemple 1.

15 Les inventeurs ont obtenu une gélose bi-phasique contenant une sous couche constituée de premiers gélifiants avec un pouvoir moindre de rétention d'eau que l'agar. Cela permet une hydratation continue de la gélose du deuxième milieu de culture solide par relargage d'eau par les gélifiants du premier milieu de culture.

Ces différents procédés de fabrication d'une gélose inclinée bi-phasique ont  
20 ainsi permis d'avoir une hydratation continue de la gélose, permettant la culture des mêmes nombreuses bactéries avec les mêmes composants de milieux de culture que ceux décrits à l'exemple 1.

#### **Exemple 4**

Les milieux solides, Columbia et Schaedler comprenant les composants  
25 suivants dans un litre d'eau distillée sont utilisés de façon courante pour la culture des bactéries. Lors de l'ajout d'antioxydants à la recette de base de ces milieux, permet la culture de certaines bactéries anaérobies strictes en aérobiose. Les bactéries anaérobies cultivées en aérobiose, citées ci-après ont étéensemencées sur ces milieux pris séparément mais lors de l'incubation en aérobiose, les géloses se

déshydratent. Lors de l'incubation prolongée de la gélose (>72h) il est observé une déshydratation du milieu de culture qui se traduit par une fissuration de la gélose et un dessèchement, jusqu'à obtenir une « galette » complètement sèche.

En revanche, les résultats de culture étaient favorables sur des milieux biphasiques selon l'invention comprenant les composants de ces deux milieux sans agar pour le premier milieu et avec agar pour le deuxième milieu.

#### a) Milieu Columbia

10	• Caséine hydrolysate (Tryptone)	10 g (1 %)
	• Extrait de levure	5 g (0,5 %)
	• Proteose peptone	5 g (0,5 %)
	• Tryptic Digest of Beef Heart	3 g (0,3 %)
	• L-cystéine	0,1 g (0,01%)
	• Glucose	2,5 g (0,25 %)
	• NaCl	5 g (0,5 %)
15	• Sulfate de magnesium (MgSO <sub>4</sub> )	0,1 g (0,01%)
	• Sulfate de fer (FeSO <sub>4</sub> )	0,02 g (0,002 %)
	• Carbonate de sodium (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	0,6 g (0,06 %)
	• Tris (Hydroxymethyl) Aminométhane	0,83 g (0,083 %)
	• Tris (Hydroxymethyl) Aminométhane HCl	2,86 g (0,286 %)
20	• (Agar	15 g (1,5 %))

#### b) Milieu Schaedler:

	• Peptone trypticase-soja	10,0 g (1 %)
	• Peptone	5,0 g (0,5 %)
	• Extrait de levure	5,0 g (0,5 %)
25	• Chlorhydrate de cystéine	0,4 g (0,04 %)
	• Hémine	0,01 g (0,001%)
	• Glucose	5,0 g (0,05%)
	• Tampon TRIS	0,75 g (0,075%)
	• (Agar	13,5 g (1,35 %))

30 Antioxydants ajoutés à chacun de ces milieux :

	• Acide ascorbique	1 g (0,1 %)
	• Acide urique	0,4 g (0,04 %)
	• Glutathion	0,1 g (0,01%)
	• Na <sub>2</sub> S	0,5 g (0,05%)

Une colonie de la bactérie choisie parmi les bactéries anaérobies cultivées en aérobie suivantes est repiquée sur le dit milieu gélosé et le tube est mis à incuber à 37°C sous atmosphère d'air : *Clostridium massilioamazoniense*, *Fingoldia magna*, *Clostridium irregulare*, *Clostridium butyricum* ou encore *Propionibacterium acnes*.

- 5 On observe la croissance de colonies bactériennes en surface de la gélose.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Evaluation of a Novel Biphasic Culture Medium for Recovery of Mycobacteria: A Multi-Center Study. Zhenling Cui et al. Plos one. April 27, 2012

5                   2. New biphasic culture system for isolation of mycobacteria from blood of patients with acquired immune deficiency syndrome. O G Berlin et al. Journal of clinical microbiology. 1984 September

## REVENDEICATIONS

1. Procédé de préparation d'un milieu de culture solide biphasique (1) conditionné dans un récipient de culture de bactéries, de préférence un tube de culture de bactéries (2), destiné à la culture de bactéries en conditions d'aérobiose caractérisé en ce qu'il comprend les étapes successives suivantes dans lesquelles :

a.1) on verse au fond du récipient, un premier milieu aqueux qui est liquide ou coulable mais apte à être congelé ou gélifié, et simultanément ou après ce versement, on incline le dit récipient selon une inclinaison déterminée ( $\alpha_1$ ) de son axe (XX') par rapport à la verticale, et

a.2) on congèle ou respectivement gélifie ledit premier milieu jusqu'à former une première couche (1-1) du premier milieu à l'état congelé ou respectivement formant un gel qui a pris en masse, telle que la surface supérieure de la première couche présente une inclinaison déterminée ( $\alpha_2$ ) par rapport à l'axe (XX') du dit tube, et

b.1) on coule dans ledit récipient, un deuxième milieu aqueux qui est un milieu de culture gélosé d'une dite bactérie en conditions d'aérobiose, à l'état coulable mais apte à être gélifié et ainsi former un milieu de culture solide, et simultanément ou après ce coulage, on incline le dit tube selon une inclinaison déterminée ( $\alpha_1$ ) de son axe longitudinal (XX') par rapport à la verticale pour former une deuxième couche (1-2) de dit deuxième milieu à l'état coulable par-dessus ladite première couche du premier milieu solide à l'état congelé ou respectivement formant un gel, la surface supérieure (1a) de la dite deuxième couche étant inclinée ( $\alpha_2$ ) par rapport à l'axe (XX') du dit récipient, de préférence parallèlement à la surface supérieure de la première couche, et

b.2) on gélifie ledit deuxième milieu jusqu'à former une deuxième couche de dit milieu de culture solide gélosé d'une dite bactérie formant un gel qui a pris en masse telle que la surface supérieure de la première couche présente une inclinaison déterminée ( $\alpha_2$ ) par rapport à l'axe (XX') du dit tube.

2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'aux étapes a.1) et b.1), on verse une quantité de deuxième milieu supérieure à la quantité de premier

milieu, de préférence les volumes respectifs de dit premier liquide par rapport au dit deuxième milieu étant tels que la surface libre (1a) de la deuxième couche s'étend depuis le fond (2a) du récipient jusqu'à proximité du bord supérieur (2b) du récipient.

5           3. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce qu'aux étapes a.1) et b.1), le dit récipient est un tube (2), le rapport des volumes des premier milieu /deuxième milieu de 1/10 à 4/10 et on incline l'axe (XX') du tube d'un angle  $\alpha_2$  de 50 à 75° par rapport à la verticale pour obtenir une inclinaison de la surface supérieure (1a) de la deuxième couche solide (1-2) après l'étape b.2) d'un angle  $\alpha_1$   
10 de 15 à 40° par rapport à l'axe (XX') dudit tube.

4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que le dit premier milieu est de l'eau ou un milieu de culture liquide de bactérie ne contenant pas d'agent gélifiant.

15           5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que le dit premier milieu est un milieu de culture gélosé de dite bactérie.

6. Procédé selon l'une des revendications 4 ou 5 caractérisé en ce que le dit premier milieu est un milieu de culture de dite bactérie contenant les mêmes éléments nutritifs et/ou mêmes facteurs de croissance que le dit milieu de culture gélosé de bactérie dudit deuxième milieu.

20           7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3 et 5 caractérisé en ce que le dit premier milieu est un milieu contenant un (ou des) premier (s) agent(s) gélifiants(s) dont la nature et/ou la quantité lui confère une viscosité et un pouvoir de rétention d'eau inférieurs à ceux du (ou des) deuxième(s) agent(s) gélifiant(s) du dit milieu de culture gélosé de bactérie dudit deuxième milieu.

25           8. Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce que et le(s) dit(s) deuxième(s) agent(s) gélifiant(s) confère(nt) au dit deuxième milieu solide une température de fusion supérieure à la température à laquelle le(s) premier (s) agent(s) gélifiants(s) permettent d'obtenir un premier milieu à l'état coulable sans qu'il ne prenne en masse.

9. Procédé selon la revendication 7 ou 8 caractérisé en ce que le dit premier milieu est un milieu aqueux contenant comme premiers agents gélifiants le composé kappa-carraghénane, de préférence avec l'amidon, K2HP et CaCl<sub>2</sub>, et le dit milieu de culture gélosé de bactéries dudit deuxième milieu solide contient de l'agar comme  
5 deuxième agent gélifiant.

10. Procédé selon la revendication 7 ou 8 caractérisé en ce que le dit premier milieu est un milieu gélifié contenant un (ou des) premier(s) agent(s) gélifiants(s) identique(s) au(x) deuxième(s) agent(s) gélifiant(s) du dit milieu de culture gélosé de bactéries dudit deuxième milieu solide, mais en quantité inférieure à celle du (ou  
10 des) deuxième(s) agent(s) gélifiant(s), de préférence de l'agar.

11. Milieu de culture biphasique (1-1 – 1-2) contenant un milieu de culture solide incliné, conditionné dans un récipient de culture de bactéries, de préférence un tube (2) de culture de bactéries, destiné à la culture de bactéries en conditions d'aérobiose obtenu par un procédé selon l'une des revendications 1 à 10 caractérisé  
15 en ce qu'il comprend :

- une première couche (1-1) d'un dit premier milieu aqueux situé au fond dudit récipient, la surface supérieure de la dite première couche étant inclinée ( $\alpha_2$ ) par rapport à l'axe (XX') du dit récipient, le dit premier milieu étant un milieu à l'état congelé ou gélifié, ou de préférence à l'état liquide, et

- une deuxième couche (1-2) d'un dit deuxième milieu aqueux à l'état solide, la dite deuxième couche étant superposée par-dessus la dite première couche de sorte que la surface supérieure de la dite deuxième couche est inclinée ( $\alpha_1$ ) par rapport à l'axe (XX') du dit récipient parallèlement à la surface supérieure de la première couche, ledit deuxième milieu solide étant un dit milieu de culture gélosé de  
25 dite bactérie en conditions d'aérobiose.

12. Procédé de culture de bactéries en conditions d'aérobiose à l'aide d'un milieu de culture conditionné dans un dit récipient selon la revendication 11 dans lequel onensemence la surface libre de la dite deuxième couche, de préférence disposée horizontalement, en conditions d'aérobiose, avec une dite bactérie, puis

laisse à incuber ledit récipient, dans une étuve à 37°C de préférence avec son axe (XX') disposé verticalement.

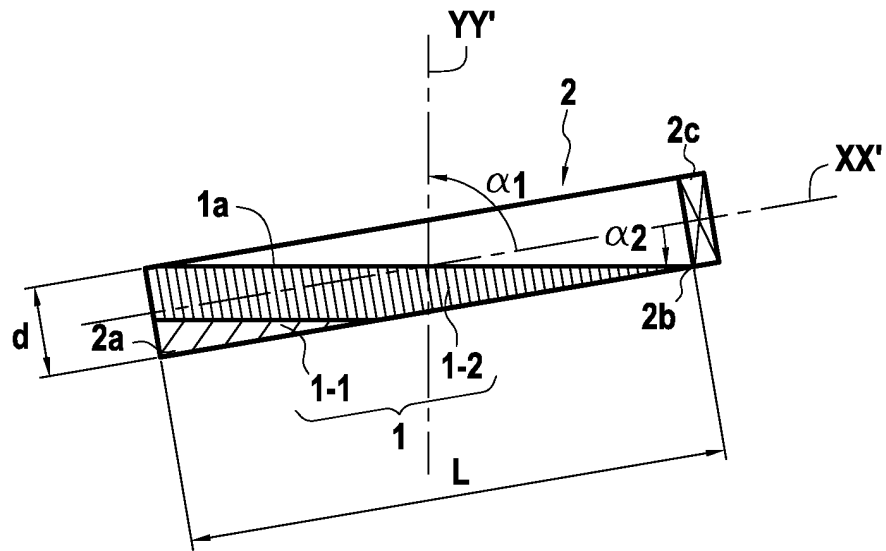


FIG. 1



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement national

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

FA 841879  
FR 1756709

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	HAAKENSEN M ET AL: "Broth and agar hop-gradient plates used to evaluate the beer-spoilage potential of Lactobacillus and Pediococcus isolates", INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, ELSEVIER BV, NL, vol. 130, no. 1, 15 mars 2009 (2009-03-15), pages 56-60, XP025946222, ISSN: 0168-1605, DOI: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2009.01.001 [extrait le 2009-01-09]	1-3,5,6, 11,12	C12N1/20 C12M1/24
A	* page 57, alinéa 3; figure 1 * -----	4,7-10	
X	CN 205 473 767 U (UNIV QILU TECHNOLOGY) 17 août 2016 (2016-08-17)	1-4,11, 12	
A	* le document en entier * -----	5-10	
X	DE 24 43 814 A1 (BOETTGER PAUL DR MED) 1 avril 1976 (1976-04-01)	11,12	
A	* le document en entier * -----	1-10	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
			C12N C12M
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
8 février 2018		Devijver, Kristof	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... & : membre de la même famille, document correspondant	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1756709 FA 841879**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.  
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **08-02-2018**  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
CN 205473767	U	17-08-2016	AUCUN	
-----				
DE 2443814	A1	01-04-1976	AUCUN	
-----				

EPO FORM P0465



# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Abandonnée un certain temps en faveur de nouvelles techniques innovantes, les techniques moléculaires, la culture a connu un nouvel élan avec l'apparition de la culturomics (2), qui consiste à utiliser un grand nombre de conditions et de milieux de culture afin de découvrir de nouvelles espèces bactériennes, et enrichir ainsi la connaissance du microbiote intestinal en particulier. Aujourd'hui, les milieux de culture ont retrouvé leur rôle fondamental en microbiologie. Ils permettent ainsi l'étude des caractéristiques physico-chimiques des bactéries grâce à l'obtention de cultures pures. De même, dans le cas des bactéries pathogènes, il est primordial d'obtenir rapidement leur profil de susceptibilité aux antibiotiques afin de prendre en charge le plus rapidement possible le patient. Cela est rendu possible grâce aux milieux de culture.

Actuellement, le microbiote intestinal, qui est le microbiote le plus étudié, est colonisé par plus de  $10^{14}$  microorganismes (10). Les bactéries composant ce microbiote ont été très étudiées ces dernières années et il a été mis en évidence le rôle fondamental qu'elles jouaient notamment dans le maintien de l'intégrité de la barrière muqueuse intestinale (11). Les recherches faites sur certaines bactéries plus particulièrement, ont montré le rôle qu'elles pouvaient avoir dans la santé humaine. Dans le cas de *Faecalibacterium prausnitzii*, qui est la bactérie la plus abondante du microbiote intestinal d'un individu sain, il a été montré qu'en cas de maladie inflammatoire chronique de l'intestin, il y avait une forte diminution de cette bactérie dans le microbiote intestinal (12). De plus, l'étude de la bactérie *Enterococcus hirae* a montré qu'elle pouvait induire la réponse au traitement par cyclophosphamide de certains cancers (8).

Il a également été intéressant de démontrer que les bactéries anaérobies avaient la possibilité de croître en condition d'aérobiose lorsque des antioxydants étaient ajoutés au milieu de culture (9). L'optimisation de ce milieu a permis la croissance d'un grand nombre de bactéries en aérobiose ; à terme, cela pourrait permettre le remplacement des flacons d'hémoculture aérobie et anaérobie par un seul flacon d'hémoculture incubée en aérobiose, lors de la recherche d'une infection bactérienne chez un patient. Ce milieu est actuellement testé dans notre laboratoire de bactériologie. Pour cela, un flacon d'hémoculture R-medium a été inclus dans un kit endocardite contenant en plus 1 flacon d'hémoculture aérobie et 3 flacons d'hémoculture anaérobies (bioMérieux, Lyon, France).

Par ailleurs, l'invention du procédé de fabrication d'une gélose bi-phasique en tube a permis d'éviter la déshydratation des géloses lors d'une incubation longue à l'étuve lors de la culture de bactéries à croissance lente. De plus, lors de la fabrication du R-medium sous la forme d'une gélose bi-phasique en tube, nous avons pu observer la croissance de différentes

bactéries anaérobies en aérobiose. La culture de ces bactéries sur le R-medium solide en boîte de Pétri était difficile et peu sensible car la gélose s'oxydait rapidement. Les bactéries testées ayant une croissance sur ce même milieu, coulé en tube, en moins de 48h, il n'y avait plus de risque de déshydratation et nous avons donc décidé de tester ce milieu sous forme de gélose inclinée monophasique dans un tube, sans phase liquide. Nous avons alors constaté une croissance de ces mêmes bactéries. Ce travail nous a donc permis de conclure que la surface de contact avec l'oxygène dans les tubes fermés était bien moins importante que celle à la surface d'une boîte de Pétri, expliquant ainsi la faible sensibilité du milieu.

L'invention de tous ces milieux a apporté une meilleure connaissance des bactéries et pourra permettre un gain de temps dans la prise en charge des patients sur un plan thérapeutique. A l'avenir, la création de nouveaux milieux de culture ciblant sur une seule bactérie pourrait permettre d'isoler des bactéries fastidieuses à isoler et non encore cultivées du fait de leurs exigences de pousse. De plus, dans le cas d'une bactérie avec un intérêt médical, le développement d'un milieu sélectif pour cette bactérie serait intéressant pour le choix du traitement ou pour conforter le diagnostic d'une maladie.

Le microbiote intestinal, et les autres microbiotes du corps humains sont de plus en plus étudiés et la place des bactéries dans la santé humaine ne fait que grandir. Leur étude à travers la culture bactérienne, en complément des techniques moléculaires, est donc aujourd'hui plus que fondamentale et les bactéries pourront peut-être un jour jouer un rôle central dans le traitement des maladies.

## **PARTIE V : Annexes**

## **AVANT-PROPOS**

La culture bactérienne a connu un nouvel essor avec la création de la culturomics en 2012 dans notre laboratoire. Cette technique consiste à utiliser un grand nombre de conditions et de milieux de culture, couplés à une identification des espèces bactériennes par spectrométrie de masse MALDI-TOF afin d'accroître la collection des espèces bactériennes qui composent le microbiome humain.

Cette dernière partie de mon travail a consisté à décrire par taxonogénomique des nouvelles espèces ou nouveaux genres découverts dans notre laboratoire. Les deux nouveaux genres décrits ont été isolés à partir du microbiote digestif, dans des prélèvements provenant du côlon gauche, et la nouvelle espèce a été découverte dans un échantillon de colostrum.

**Article 2: Genome sequence and description of *Traorella massiliensis* gen. nov., sp. nov., a new bacterial genus isolated from human left colon**

M. Bonnet, M. Mailhe, D. Ricaboni, N. Labas, M. Richez, V. Vitton, A. Benezech, P.-E. Fournier, M. Million, D. Raoult and S. Khelaifia

Publié dans *New Microbes and New Infections*

# Genome sequence and description of *Traorella massiliensis* gen. nov., sp. nov., a new bacterial genus isolated from human left colon

M. Bonnet<sup>1</sup>, M. Mailhe<sup>1</sup>, D. Ricaboni<sup>1,4</sup>, N. Labas<sup>1</sup>, M. Richez<sup>1</sup>, V. Vitton<sup>3</sup>, A. Benezech<sup>3</sup>, P.-E. Fournier<sup>1,2,3,4</sup>, M. Million<sup>1</sup>, D. Raoult<sup>1,2</sup> and S. Khelaifia<sup>2</sup>

1) Aix-Marseille Université, IRD, APHM, MEPHI, 2) Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée Infection, 3) Service de Gastroentérologie, Hôpital Nord, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Marseille, France and 4) Département des sciences cliniques et biomédicales, Luigi Sacco, Division des Maladies Infectieuses III, Université de Milan, Milan, Italy

## Abstract

A strictly anaerobic, motile, non-spore-forming, Gram-negative, rod-shaped bacterium designated Marseille-P3110<sup>T</sup> was isolated from the left colon cleansing of a 76-year-old Frenchwoman. Its 16S ribosomal RNA (rRNA) gene showed a 93.2% similarity level with the 16S rRNA of *Dielma fastidiosa* strain JC13, the closest species with a validly published name. The genome of Marseille-P3110<sup>T</sup> is 2 607 061 bp long with 35.99% G+C content. Of the 2642 predicted genes, 2582 were protein-coding genes and 60 were RNAs, including five 16S rRNA genes.

© 2019 The Authors. Published by Elsevier Ltd.

**Keywords:** Culturomics, genome, gut microbiota, taxonogenomics, *Traorella massiliensis*

**Original Submission:** 17 January 2019; **Revised Submission:** 7 February 2019; **Accepted:** 13 February 2019

**Article published online:** 22 February 2019

**Corresponding author:** S. Khelaifia, Institut Hospitalo, Universitaire Méditerranée Infection, 19-21 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 5, France.

**E-mail:** [khelaifia\\_saber@yahoo.fr](mailto:khelaifia_saber@yahoo.fr)

The first two authors contributed equally to this article, and both should be considered first author.

## Introduction

Even though metagenomics has made it possible to explore the human microbiota, many bacteria remain to be cultivated. Culturomics is a culture-based approach that uses multiple culture conditions together with MALDI-TOF MS and 16S ribosomal RNA (rRNA) gene sequencing [1] for bacterial culture and identification. This approach was developed to improve the identification of uncultured bacteria by matching metagenomic unassigned sequences with identified and cultivated bacteria [1].

The project that allows the isolation of this new strain consists of the study the microbiota of different portions of the

digestive tract. Its composition varies according to different factors such as pH, percentage of oxygen or health status [2].

During this project, we isolated a new bacterial genus, a member of the family *Erysipelotrichaceae*. This family was created in 2004 and actually regroups 11 genera [3]. Bacteria belonging to this family are all strictly anaerobic, except the genus *Erysipelothrix*, which contains facultative anaerobic or microaerophilic species. Most of these bacteria are Gram positive, non-spore forming and rod shaped. The bacteria belonging to this family seem to be highly immunogenic. The proportion of *Erysipelotrichaceae* is higher in patients with inflammatory bowel disease than in healthy individuals [4].

The new genus was described using the taxonogenomics approach. This approach combines next-generation sequencing, and phylogenetic and phenotypic techniques [5]. The MALDI-TOF MS protein profile plays also a role in the description of new bacterial species.

We describe *Traorella massiliensis* strain Marseille-P3110<sup>T</sup> (= CSUR P3110 = DSM 103514), a new genus isolated from the left colon cleansing of a 76-year-old Frenchwoman.

## Materials and methods

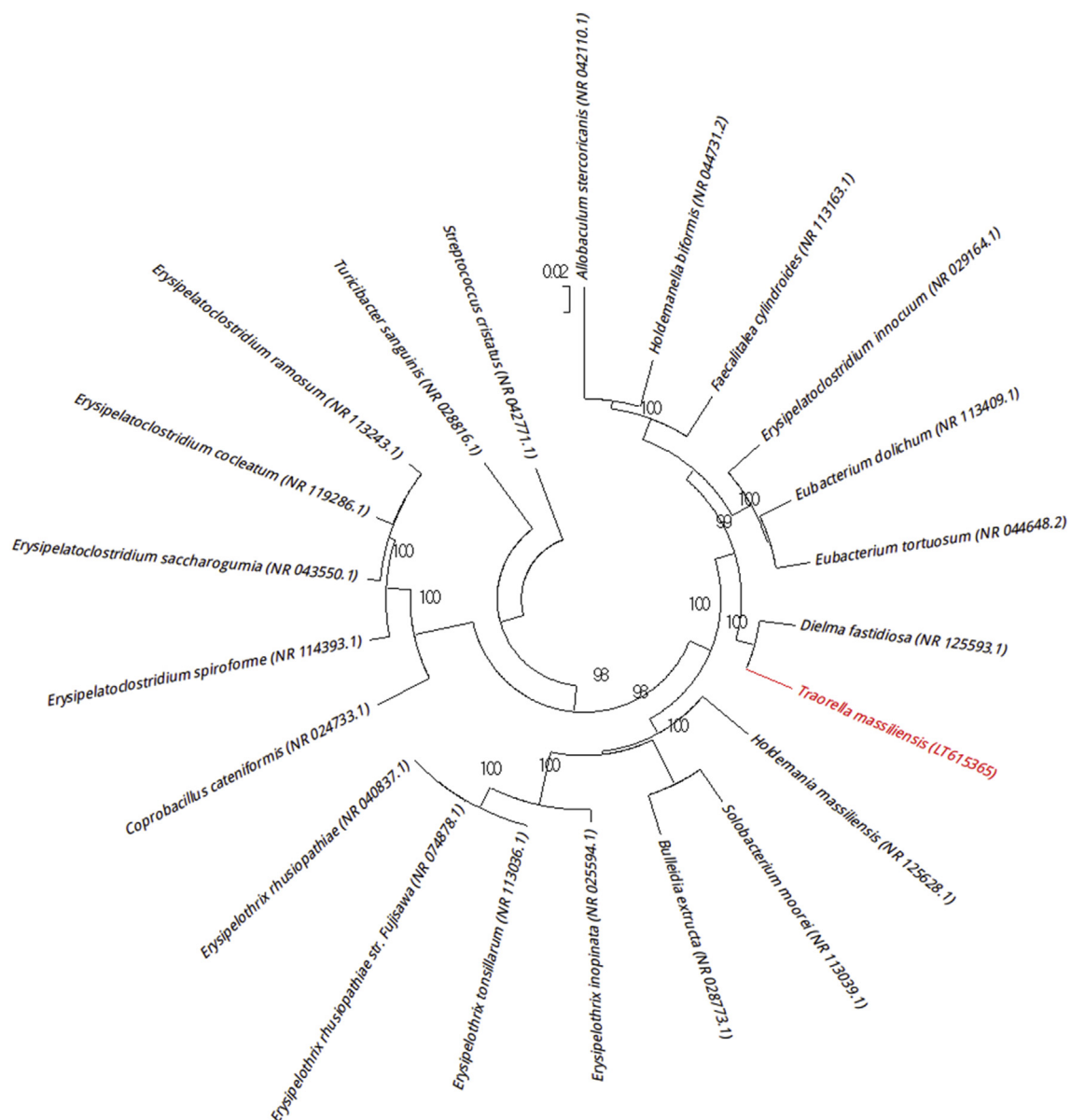
### Ethics and sample information

A sample from the left colon cleansing of a 76-year-old Frenchwoman who underwent a colonoscopy to check for colon polyps was collected at Hôpital Nord (Marseille, France) in May 2016. The study was authorized by the local ethics committee of the Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée-infection (Marseille, France) under agreement 2016-

010, and the patient provided written informed consent. At the moment of the sample collection, she was treated with a proton pump inhibitor. The sample was transported in an antioxidant transport medium.

### Strain identification by MALDI-TOF MS and 16S rRNA gene sequencing

The sample was seeded directly on Columbia medium supplemented with 5% sheep's blood (COS) (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), and incubated under anaerobic conditions at



**FIG. 1.** Phylogenetic tree highlighting position of *Traorella massiliensis* strain Marseille-P3110<sup>T</sup> relative to other close strains. GenBank accession numbers of each 16S rRNA are noted in parentheses. Sequences were aligned using Muscle version 3.8.31 with default parameters, and phylogenetic inferences were obtained using neighbour-joining method with 500 bootstrap replicates within MEGA6 software. Only bootstraps >95% are shown. Scale bar represents 0.02% nucleotide sequence divergence.



37°C during 3 days. Colonies were purified through subculture and identified by MALDI-TOF MS using a Microflex spectrometer and a MTP 96 MALDI-TOF target plate (Bruker Daltonics, Leipzig, Germany), as described previously [6,7]. The spectra obtained for each colony were matched against the MALDI Biotyper software version 3.0 (Bruker) and Unité des Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes (URMITE) databases using standard pattern matching (with default parameter settings). The identification scores used were as follows: a score over 1.9 allowed identification at the species level, while a score under 1.7 did not allow any identification. In the latter case, the colony was identified by sequencing its 16S rRNA gene as previously described [8]. According to Stackebrandt and Ebers [9], a similarity threshold of 98.65% was used to define a new species, whereas a threshold of 95% was used to define a new genus without performing DNA-DNA hybridization. Upon identification, a reference spectrum for strain Marseille-P3110<sup>T</sup> was incremented in the URMITE database.

### 16S rRNA phylogenetic tree

A custom Python script was used to automatically retrieve all species from the same order as the new genus and download 16S sequences from National Center for Biotechnology Information (NCBI) by parsing the NCBI eUtils results and NCBI taxonomy page. It only keeps sequences from type strains. In case of multiple sequences for one type strain, it selects the sequence obtaining the best identity rate from the BLASTn alignment with our sequence. The script then separates 16S sequences in two groups: one containing the sequences of strains from the same family (group a) and one containing the others (group b). It finally only keeps the 15 strains closest to the group and the closest to group b. If it is impossible to get 15 sequences from group a, the script selects more sequences from group b to get at least nine strains from both groups.

**TABLE 1. Classification and general features of *Traorella massiliensis* strain Marseille-P3110<sup>T</sup>**

Property	Term
Current classification	Domain: <i>Bacteria</i> Phylum: <i>Firmicutes</i> Class: <i>Erysipelotrichia</i> Order: <i>Erysipelotrichales</i> Family: <i>Erysipelotrichaceae</i> Genus: <i>Traorella</i> Species: <i>Traorella massiliensis</i> Type strain: Marseille-P3110 <sup>T</sup>
Gram stain	Negative
Cell shape	Rod
Motility	Motile
Sporulation	Nonsporulating
Temperature range	Mesophilic
Optimum temperature	37°C

### Growth conditions

Ideal growth conditions for strain Marseille-P3110<sup>T</sup> were determined by testing five growth temperatures (25, 28, 37, 45 and 56°C) in an aerobic atmosphere with or without 5% CO<sub>2</sub>, and under anaerobic and microaerophilic conditions using the GENbag anaer and GENbag microaer systems, respectively (bioMérieux). Different pH values (5, 5.5, 6.5, 7, 7.5 and 8) and NaCl concentrations (10, 15 and 20%) were also tested.

### Morphologic, biochemical and antibiotic susceptibility tests

Phenotypic characteristics such as Gram staining, motility, sporulation, and catalase and oxidase activities were tested as previously described [3,10]. Biochemical analysis of strain Marseille-P3110<sup>T</sup> was carried out using API 50 CH, API 20A and API ZYM strips (bioMérieux) in an anaerobic atmosphere. Antibiotic susceptibility was tested using the disc diffusion method (i2a, Montpellier, France) [11] and according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2015 recommendations.

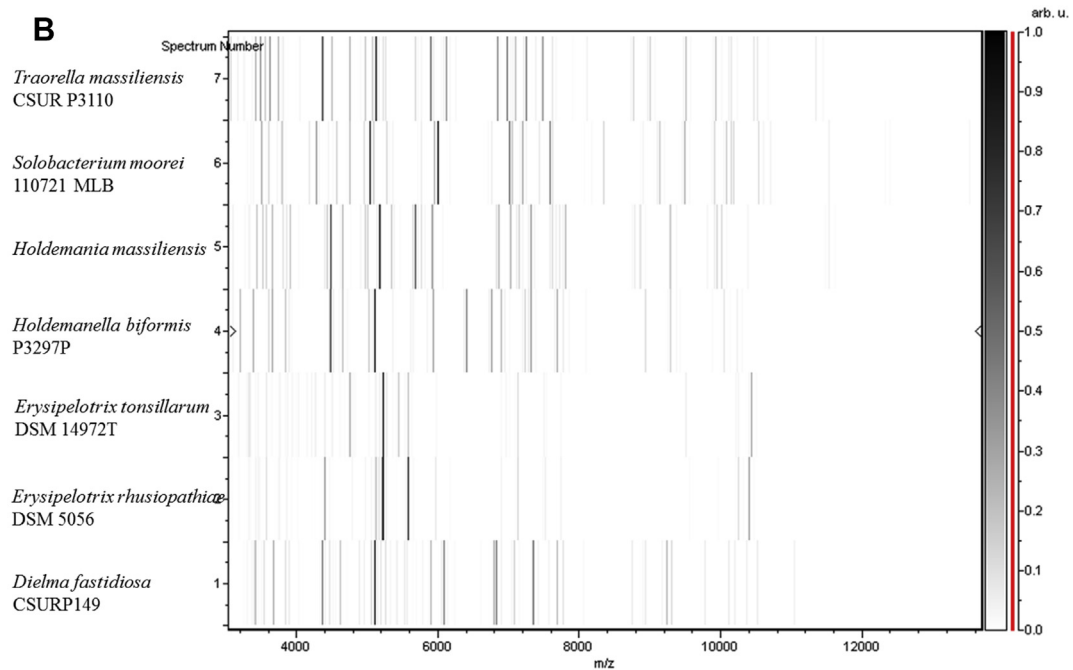
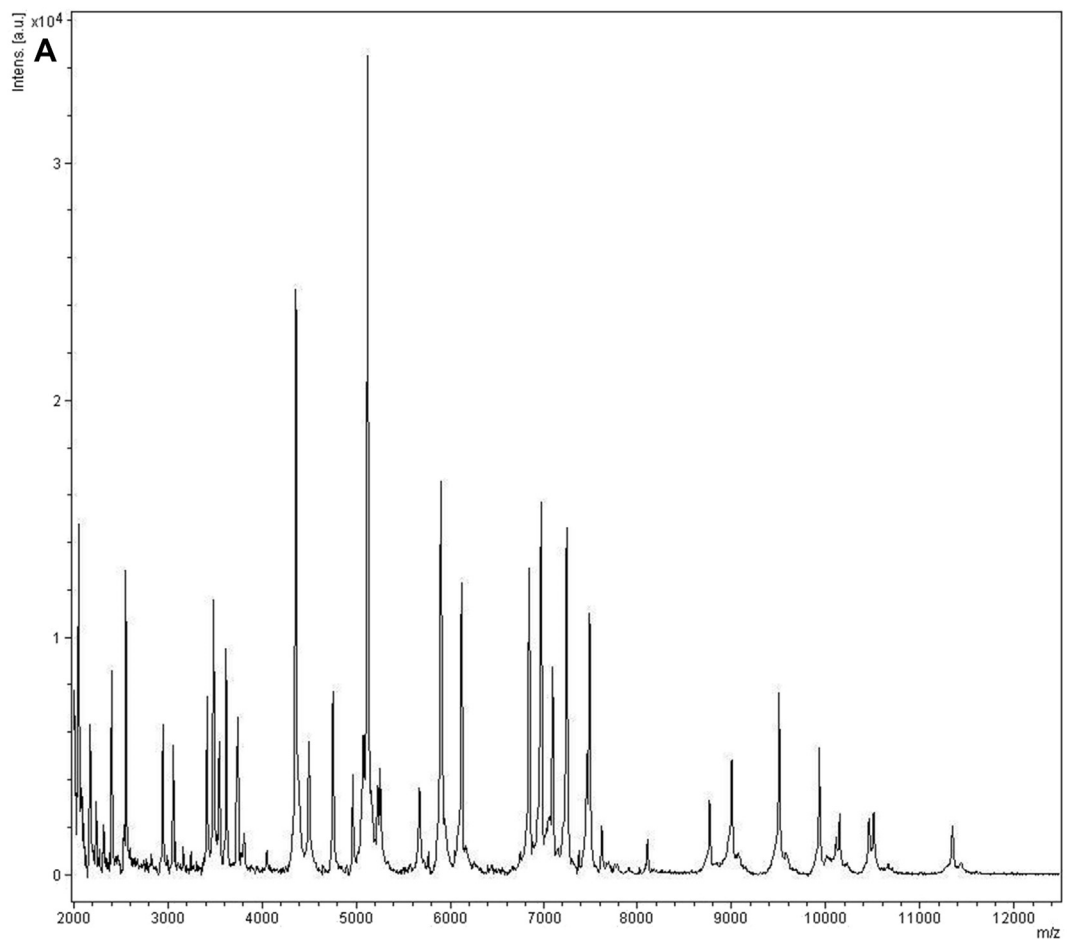
In order to observe their morphology, the cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer for at least 1 hour at 4°C. A drop of cell suspension was deposited for approximately 5 minutes on glow-discharged formvar carbon film on 400 mesh nickel grids (FCF400-Ni, Electron Microscopy Sciences (EMS), Hatfield, PA, USA). The grids were dried on blotting paper, and cells were negatively stained for 10 seconds with 1% ammonium molybdate solution in filtered water at room temperature. Electron micrographs were acquired with a Morgagni 268D (Philips, Amsterdam, The Netherlands) transmission electron microscope operated at 80 keV.

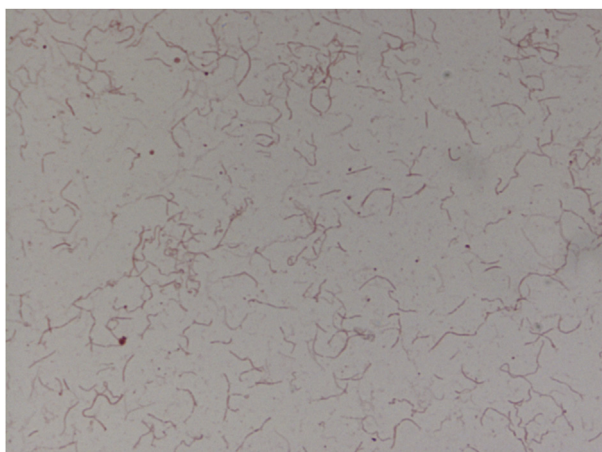
### Fatty acid methyl ester analysis by gas chromatography/mass spectrometry

Two samples were prepared with approximately 30 mg of bacterial biomass per tube collected from several culture plates. Fatty acid methyl esters (FAME) were prepared as described by Sasser [12]. Gas chromatography/mass spectrometry analyses were carried out as described previously [13]. Briefly, FAME were separated using an Elite 5-MS column and monitored by mass spectrometry (Clarus 500-SQ 8 S; PerkinElmer, Courtabouef, France). Spectral database search was performed using MS Search 2.0 operated with the Standard Reference Database 1A (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) and the FAMES mass spectral database (Wiley, Chichester, UK).

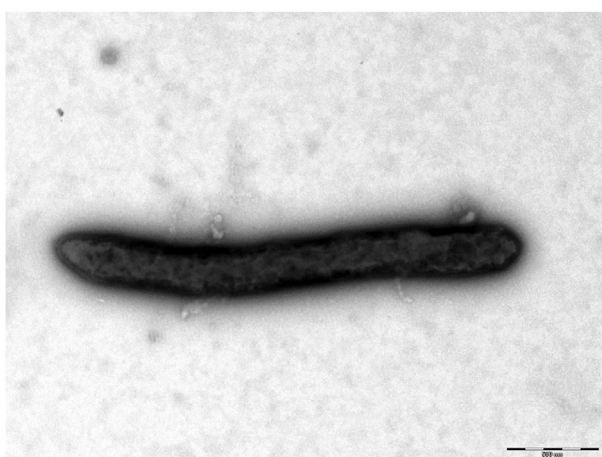
### Genomic DNA extraction and genome sequencing

After a lysozyme pretreatment and incubation at 37°C for 2 hours, DNA was extracted on the EZ1 biorobot (Qiagen,





**FIG. 3.** Gram staining of *Traorella massiliensis* strain Marseille-P3110<sup>T</sup>.



**FIG. 4.** Transmission electron microscopy of *Traorella massiliensis* strain Marseille-P3110<sup>T</sup> using Morgagni 268D (Philips) transmission electron microscope operated at 80 keV. Scale bar represents 500 nm.

Germantown, MD, USA) with EZI DNA tissues kit. The elution volume was 50  $\mu$ L. Genomic DNA (gDNA) was quantified by a Qubit assay with a high-sensitivity kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) to 25.5 ng/ $\mu$ L.

gDNA of strain Marseille-P3110<sup>T</sup> was sequenced on the MiSeq Technology (Illumina, San Diego, CA, USA) with the mate-pair strategy. The gDNA was barcoded in order to be mixed with 11 other projects with the Nextera Mate Pair sample prep kit (Illumina).

The mate-pair library was prepared with 1.5  $\mu$ g of gDNA using the Nextera mate-pair Illumina guide. The gDNA sample was simultaneously fragmented and tagged with a mate-pair junction adapter. The pattern of the fragmentation was validated on an Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) with a DNA 7500 labchip. The DNA fragments ranged in size from 1.5 to 11 kb, with an optimal size at 5.176 kb. No size selection was performed, and 378.6 ng of tagmented fragments were circularized. The circularized DNA was mechanically sheared to small fragments with an optimal at 1054 bp on the Covaris device S2 in T6 tubes (Covaris, Woburn, MA, USA). The library profile was visualized on a High Sensitivity Bioanalyzer LabChip (Agilent), and the final concentration library was measured at 31.57 nmol/L.

The libraries were normalized at 2 nM and pooled. After a denaturation step and dilution at 15 pM, the pool of libraries was loaded onto the reagent cartridge and then onto the instrument along with the flow cell. Automated cluster generation and sequencing run were performed in a single 39-hour run at a  $2 \times 251$  bp read length.

Total information of 5.1 Gb was obtained from a 544K/mm<sup>2</sup> cluster density with a cluster passing quality control filters of 96.8% (10 139 000 passing filter paired reads). Within this run, the index representation for strain Marseille-P3110<sup>T</sup> was determined to be of 8.93%. The 905 502 paired reads were trimmed then assembled in nine scaffolds.

### Genome assembly

The genome assembly was performed with a pipeline that enabled creation of an assembly with different software (Velvet [14], Spades [15] and Soap Denovo [16]) on trimmed (MiSeq and Trimmomatic [17] software) or untrimmed data (only MiSeq software). For each of the six assemblies performed, GapCloser [16] was used to reduce gaps. Then contamination with Phage Phix was identified (BLASTn against Phage Phix174 DNA sequence) and eliminated. Finally, scaffolds under 800 bp in size were removed, and scaffolds with a depth value lower than 25% of the mean depth were removed (identified as possible contaminants). The best assembly was selected by using different criteria (number of scaffolds, N50, number of N). For the studied strain, Spades gave the best assembly, with a depth coverage of 128 $\times$ .

**FIG. 2.** (A) Reference mass spectrum from *Traorella massiliensis* strain Marseille-P3110<sup>T</sup>. (B) Gel view comparing *Traorella massiliensis* strain Marseille-P3110<sup>T</sup> to other species within genera *Erysipelotrix*, *Dielma*, *Holdemanella*, *Holdemania* and *Solobacterium*. Gel view displays raw spectra of loaded spectrum files arranged in pseudo-gel-like look. X-axis records  $m/z$  value; left y-axis displays running spectrum number originating from subsequent spectra loading. Peak intensity is expressed by greyscale scheme code. Right y-axis indicates relation between colour of peak and its intensity in arbitrary units. Displayed species are indicated at left.

**TABLE 2.** Differential characteristics of *Traorella massiliensis* strain Marseille-P3110<sup>T</sup>, *Dielma fastidiosa* strain JC13<sup>T</sup> [33], *Eubacterium dolichum* strain JCM 10413<sup>T</sup> DSM 3991 [32], *Faecalitalea cylindroides* JCM 10261<sup>T</sup> DSM 3983 [33], *Holdemania bififormis* strain DSM 3989 [33], *Allobaculum stercoricanis* strain 2CLOS2<sup>T</sup> DSM 13633 [34], *Holdemania massiliensis* strain AP2<sup>T</sup> DSM 26143 [35], *Solobacterium moorei* strain RCA59–74<sup>T</sup> DSM 22971 [36] and *Bulleidia extracta* strain W 1219<sup>T</sup> DSM 13220 [37]

Property	<i>Traorella massiliensis</i>	<i>Dielma fastidiosa</i>	<i>Eubacterium dolichum</i>	<i>Faecalitalea cylindroides</i>	<i>Holdemania bififormis</i>	<i>Allobaculum stercoricanis</i>	<i>Holdemania massiliensis</i>	<i>Solobacterium moorei</i>	<i>Bulleidia extracta</i>
Cell diameter (µm)	0.28–0.37	0.6	0.4–0.6	NA	NA	0.75–0.9	0.57	0.2	0.5
Gram stain	–	–	+	+	+	+	+	+	+
Salt tolerance	–	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Motility	+	+	–	–	–	–	–	–	–
Endospore formation	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Major cellular fatty acid	18:1n9	NA	NA	C 16 : 0	C 16 : 0	NA	NA	NA	NA
Acid from:									
D-Xylose	–	–	–	–	+	–	NA	–	–
Ribose	+	NA	–	NA	NA	–	+	+	NA
Mannose	–	–	–	+	+	–	+	–	–
Mannitol	–	NA	–	–	+	–	+	–	–
Sucrose	–	NA	–	+	–	+	+	–	–
D-Glucose	–	–	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	–	NA	+	NA	NA	+	+	+	+
D-Maltose	–	NA	+	–	–	+	+	+	+
Habitat	Human gut	Human gut	Human gut	Human gut	Human gut	Human Gut	Human gut	Human gut	Human oral cavity

+, positive result; –, negative result; NA, data not available.

**TABLE 3.** Cellular fatty acid composition (%)

Fatty acids	Name	Mean relative % <sup>a</sup>
18:1n9	9-Octadecenoic acid	34.1 ± 0.6
16:0	Hexadecanoic acid	30.1 ± 2.2
18:0	Octadecanoic acid	15.9 ± 2.0
18:2n6	9,12-Octadecadienoic acid	13.2 ± 2.8
14:0	Tetradecanoic acid	1.9 ± 0.2
18:1n7	11-Octadecenoic acid	1.8 ± 0.3
18:1n6	12-Octadecenoic acid	1.2 ± 0.1
17:0	Heptadecanoic acid	TR
16:1n7	9-Hexadecenoic acid	TR
15:0	Pentadecanoic acid	TR
17:0 anteiso	14-methyl-Hexadecanoic acid	TR
16:0 9,10-methylene	2-hexyl-Cyclopropanoic acid	TR
17:0 iso	15-methyl-Hexadecanoic acid	TR

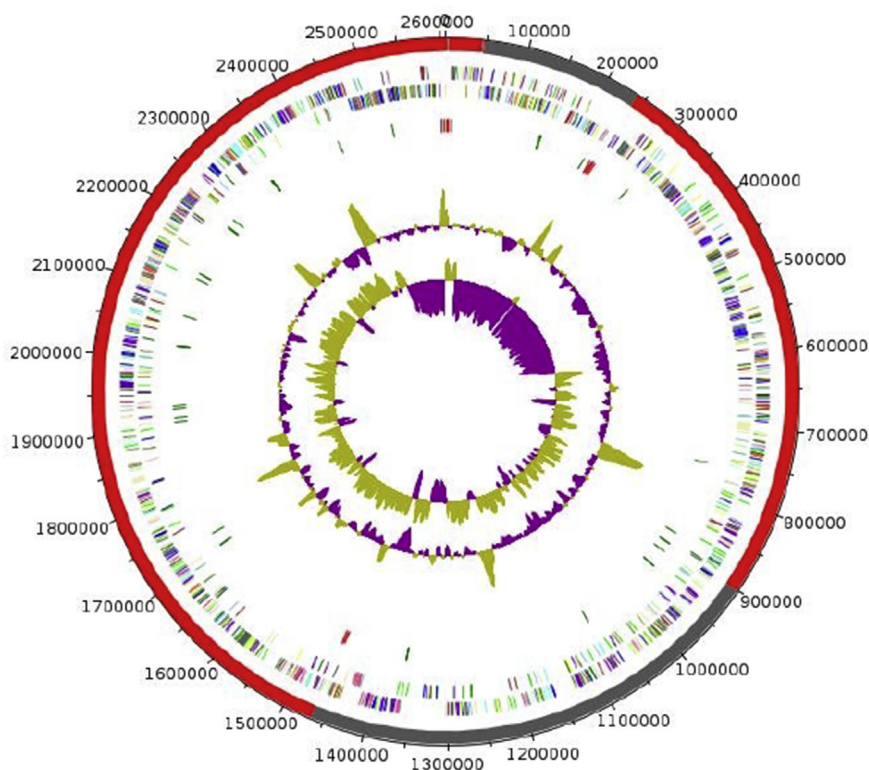
<sup>a</sup>Mean peak area percentage; TR, trace amounts <1%.

### Genome annotation and comparison

Open reading frames (ORFs) were predicted using Prodigal [18] with default parameters, but the predicted ORFs were excluded if they spanned a sequencing gap region (contained N). The predicted bacterial protein sequences were searched against the Clusters of Orthologous Groups (COGs) database using BLASTP ( $E$  value  $1e-03$ , coverage 0.7 and identity percentage 30%). If no hit was found, then the predicted bacterial protein sequences were searched against the NR database using BLASTP with an  $E$  value of  $1e-03$ , coverage of 0.7 and identity percentage of 30%, and if the sequence length was smaller than 80 aa, we used an  $E$  value of  $1e-05$ . The tRNAScanSE tool [19] was used to find transfer RNA genes, while ribosomal RNAs were found using RNAmmer [20]. Lipoprotein signal peptides and the number of transmembrane helices were predicted using Phobius [21]. ORFans were identified if all the BLASTP performed did not give positive

results ( $E$  value smaller than  $1e-03$  for ORFs with sequence size larger than 80 aa or  $E$  value smaller than  $1e-05$  for ORFs with sequence length smaller 80 aa). Such parameter thresholds have already been used in previous studies to define ORFans. Pfam-conserved domains (Pfam-A and Pfam-B domains) were search on each protein with the HMMScan of the HMMER3 suite [6]. PKS and NRPS were searched against the ClusterMine360 [17] database. Resistome was analysed by using the ARG-ANNOT database [22].

Species used for genomic comparison were identified in the 16S rRNA tree using PhyloPattern software [23]. For each selected species, the complete genome sequence, proteome sequence and ORFeome sequence were retrieved from the NCBI's FTP site. If one specific strain did not have a complete and available genome, a complete genome of the same species was used. If ORFeome and proteome were not predicted, Prodigal was used with default parameters to predict them. All proteome were analysed with proteinOrtho [24]. Then, for each couple of genomes, a similarity score was computed. This score is the mean value of nucleotide similarity between all couples of orthologous genes between the two genomes studied (average genomic identity of orthologous gene sequences (AGIOS) tool). An annotation of the entire proteome was performed to define the distribution of functional classes of predicted genes according to the clusters of orthologous groups of proteins (using the same method as for the genome annotation). Annotation and comparison processes were performed in the multiagent software system DAGOBAN [25], which includes Figenix [26] libraries that provide pipeline analysis, and by using PhyloPattern [23] for tree manipulation. To evaluate the genomic similarity between studied genomes,



**FIG. 5.** Graphical circular map of chromosome. From outside to centre, genes on forward strain coloured by COGs categories (only gene assigned to COGs), RNA genes (tRNAs green, rRNAs red), G+C content and G+C skew. COGs, Clusters of Orthologous Groups database; rRNA, ribosomal RNA; tRNA, transfer RNA.

**TABLE 4.** Nucleotide content and gene count levels of genome

Attribute	Genome (total)	
	Value	% of total <sup>a</sup>
Size (bp)	2 607 061	100
G+C content (%)	937 722	35.99
Coding region (bp)	2 346 961	90.02
Total genes	2642	100
RNA genes	60	2.27
Protein-coding genes	2582	100
Genes with function prediction	1757	68.05
Genes assigned to COGs	1468	56.86
Genes with peptide signals	296	11.46
ORFans genes	279	10.81
Genes associated with PKS or NRPS	1	0.039
No. of antibiotic resistance genes	1	0.039
No. of genes associated with Pfam-A domains	2308	87

COGs, Clusters of Orthologous Groups database; NRPS, nonribosomal peptide synthase; PKS, polyketide synthase.

<sup>a</sup>Total is based on either size of genome in base pairs or total number of protein-coding genes in annotated genome.

we determined two parameters, digital DNA-DNA hybridization (dDDH), which exhibits a high correlation with DNA-DNA hybridization (DDH) [27,28], and AGIOS [29], which was designed to be independent from DDH [31]. Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) analysis was performed using the GGDC web server as previously reported [28].

**TABLE 5.** Number of genes associated with 25 general COGs functional categories

Code	Value	% of total <sup>a</sup>	Description
[J]	191	7.40	Translation
[A]	0	0	RNA processing and modification
[K]	125	4.84	Transcription
[L]	88	3.41	Replication, recombination and repair
[B]	0	0	Chromatin structure and dynamics
[D]	32	1.24	Cell cycle control, mitosis and meiosis
[Y]	0	0	Nuclear structure
[V]	73	2.83	Defense mechanisms
[T]	64	2.48	Signal transduction mechanisms
[M]	96	3.72	Cell wall/membrane biogenesis
[N]	7	0.27	Cell motility
[Z]	0	0	Cytoskeleton
[W]	1	0.04	Extracellular structures
[U]	18	0.70	Intracellular trafficking and secretion
[O]	53	2.05	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
[X]	58	2.25	Mobilome: prophages, transposons
[C]	73	2.83	Energy production and conversion
[G]	155	6.00	Carbohydrate transport and metabolism
[E]	116	4.49	Amino acid transport and metabolism
[F]	69	2.67	Nucleotide transport and metabolism
[H]	47	1.82	Coenzyme transport and metabolism
[I]	42	1.63	Lipid transport and metabolism
[P]	68	2.63	Inorganic ion transport and metabolism
[Q]	21	0.81	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
[R]	152	5.89	General function prediction only
[S]	74	2.87	Function unknown
-	1114	43.14	Not in COGs

COGs, Clusters of Orthologous Groups database.

<sup>a</sup>Total is based on total number of protein-coding genes in annotated genome.

## Results

### Strain identification and phylogenetic analyses

Strain Marseille-P3110<sup>T</sup> was first cultivated on COS under anaerobic atmosphere at 37°C. The sample containing this bacterium was transported in an antioxidant transport medium and seeded directly onto COS. Strain Marseille-P3110<sup>T</sup> could not be identified using MALDI-TOF MS, and therefore the 16S rRNA was sequenced. The resulting sequence (accession no. LT615365) showed a 93.2% similarity level with the 16S rRNA gene of *Dielma fastidiosa* strain JCI3, the closest species with a validly published name [30] (Fig. 1). Because this 16S rRNA nucleotide sequence similarity was lower than 95%, strain Marseille-P3110<sup>T</sup> is considered to be a new genus according to the threshold described by Stackebrandt and Ebers [9]. This new genus belongs to the family *Erysipelotrichaceae* for which we suggest the name *Traorella*, with *Traorella massiliensis* as type species and Marseille-P3110<sup>T</sup> (= CSUR P3110 = DSM 103514) as type strain (Table 1). Consequently, the reference protein

spectra for *Traorella massiliensis* (Fig. 2(A)) were incremented in the URMITÉ database (<http://www.mediterranee.infection.com/article.php?laref=256&titre=urms-database>). A gel view was also performed to observe the spectra's comparison with the closest bacteria (Fig. 2(B)).

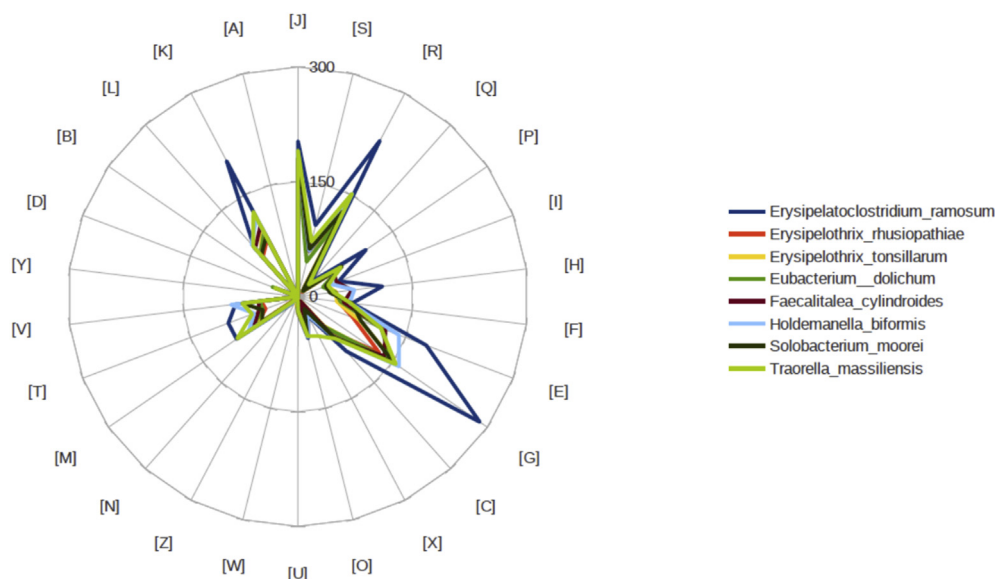
### Phenotypic description

The bacterium was cultivated at 37°C in anaerobic conditions. No growth was noted in aerobic and microaerophilic conditions. The optimal growth condition was observed after 72 hours in anaerobic conditions. Growth was observed at pH 7, 7.5 and 8 but not at pH 5, 5.5 and 6.5. No growth was observed for the salinities tested (10, 15 and 20%). Colonies of the strain Marseille-P3110<sup>T</sup> were motile, non-spore forming, Gram negative and rod shaped (Fig. 3). The strain Marseille-P3110<sup>T</sup> forms regular white colonies with a mean diameter of 1 mm. Individual cells have a width ranging from 0.28 to 0.37 µm and a length ranging from 2.5 to 3.1 µm (Fig. 4). No catalase and oxidase activities were observed. Using an API ZYM strip, an API 20A

**TABLE 6.** Genome comparison of closely related species to *Traorella massiliensis* strain Marseille-P3110<sup>T</sup>

Organism	INSDC	Size (Mb)	G+C (%)	Protein-coding genes	Total genes
<i>Traorella massiliensis</i> strain Marseille-P3110 <sup>T</sup>	FNLJ00000000	2.61	35.99	2582	2582
<i>Faecalitalea cylindroides</i> strain ATCC 27803	AWVI00000000	1.95	34.68	1841	2057
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> strain ATCC 19414	ACLK00000000	1.75	36.47	1613	1645
<i>Solobacterium moorei</i> strain F0204	AUKY00000000	2.01	36.78	2181	2035
<i>Eubacterium dolichum</i> strain CAG:375	ABAW00000000	2.03	37.40	2076	1927
<i>Erysipelothrix tonsillarum</i> strain DSM 14972	AREO00000000	1.93	36.83	1750	1792
<i>Erysipelatoclostridium ramosum</i> strain DSM 1402	ABFX00000000	3.24	31.39	2941	3169
<i>Holdemanella biformis</i> strain DSM 3989	ABYT00000000	2.52	33.79	2248	2529
<i>Dielma fastidiosa</i> strain DSM 26099	CAEN00000000	3.62	39.97	3321	3496

INSDC, International Nucleotide Sequence Database Collaboration.



**FIG. 6.** Distribution of functional classes of predicted genes according to clusters of orthologous groups of proteins.

strip and an API 50 CH strip, positive enzymatic activities included esterase C4, leucine arylamidase, *N*-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase,  $\alpha$ -fucosidase,  $\alpha$ -glucosidase, acid phosphatase and naphthol-AS-BI-phosphohydrolase. No activity was found for the following enzymes: valine arylamidase,  $\beta$ -galactosidase, esterase lipase C8, protease, urease, alkaline phosphatase, lipase C14, cystine arylamidase, trypsin,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -chymotrypsin,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -glucosidase and  $\alpha$ -mannosidase. No acid production was observed from D-glucose, D-lactose, D-sucrose, D-maltose, salicin, D-cellobiose, D-mannose, D-raffinose, D-sorbitol, D-trehalose, D-mannitol, D-xylose, L-arabinose, glycerol, D-melezitose and L-rhamnose. Only a few carbohydrates were metabolized: D-ribose, D-tagatose and potassium 5-ketogluconate as revealed by an API 50 CH strip. The other tested carbohydrates (D-melibiose, glycerol, glycogen, D-arabinose, L-arabinose, erythritol, D-xylose, L-xylose, D-galactose, D-adonitol, methyl- $\beta$ -D-xylopyranoside, D-glucose, D-fructose, D-mannose, L-sorbose, dulcitol, L-rhamnose, inositol, D-mannitol, D-sorbitol, methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, methyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside, *N*-acetylglucosamine, esculin ferric citrate, amygdalin, D-cellobiose, arbutin, salicin, D-maltose, D-sucrose, D-lactose, D-raffinose, D-trehalose, inulin, D-melezitose, starch, xylitol, gentiobiose, D-arabitol, L-arabitol, D-lyxose, D-turanose, D-fucose, L-fucose, potassium gluconate and potassium 2-ketogluconate) were not utilized.

Strain Marseille-P3110<sup>T</sup> was susceptible to amoxicillin/clavulanic acid, clindamycin, metronidazole, imipenem, tobramycin, fosfomycin, erythromycin and amoxicillin but was resistant to rifampicin, gentamicin, vancomycin, colistin, trimethoprim/sulfamethoxazole, oxacillin and doxycycline. Differential characteristics between strain Marseille-P3110<sup>T</sup> and close relatives are presented in Table 2. Strain Marseille-P3110<sup>T</sup> differed from other compared species for several phenotypic characteristics including Gram staining and motility. All species were non-spore forming.

The most abundant cellular fatty acids were 9-octadecenoic acid (34%), hexadecanoic acid (30%), octadecanoic acid (16%) and 9,12-octadecadienoic acid (13%). Other fatty acids were present in lower amounts (Table 3).

### Genome properties

The genome of Marseille-P3110<sup>T</sup> is 2 607 061 bp long with 35.99% G+C content (Fig. 5 and Table 4). It is composed of nine scaffolds (composed of 14 contigs). Of the 2642 predicted genes, 2582 were protein-coding genes and 60 were RNAs (five genes are 5S rRNA, five genes are 16S rRNA, five genes are 23S rRNA, 45 genes are transfer RNA genes). A total of 1757 genes (68.05%) were assigned as putative function (by COGs or by NR BLAST). A total of 279 genes were identified as ORFans (10.81%). The remaining genes were annotated as hypothetical proteins (472 genes, 18.28%). The distribution of genes into COGs functional categories is presented in Table 5.

### Genome comparison

Genomic characteristics of strain Marseille-P3110<sup>T</sup> were compared to those of closely related species with an available genome: *Dielma fastidiosa* (DSM 26099; CAEN000000000), *Erysipelatoclostridium ramosum* (DSM 1402; ABFX000000000), *Faecalitalea cylindroides* (ATCC 27803; AWWI000000000), *Erysipelothrix rhusiopathiae* (ATCC 19414; ACLK000000000), *Solobacterium moorei* (F0204; AUKY000000000), *Eubacterium dolichum* (CAG:375; ABAW000000000), *Erysipelothrix tonsillarum* (DSM 14972; AREO000000000) and *Holdemanella bififormis* (DSM 3989; ABYT000000000) (Table 6). The draft genome sequence of strain Marseille-P3110<sup>T</sup> is smaller than that of *Dielma fastidiosa* and *E. ramosum* (3615, 2607 and 3235 MB respectively), but larger than that of *F. cylindroides*, *E. rhusiopathiae*, *S. moorei*, *E. dolichum*, *E. tonsillarum* and *H. bififormis* (1946, 1746, 2008, 2025, 1931 and 2518 MB respectively). The G+C content of strain Marseille-P3110<sup>T</sup> is smaller than that of *Solobacterium moorei*, *Eubacterium dolichum*, *Dielma fastidiosa*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* and *Erysipelothrix tonsillarum* (35.99, 36.78, 37.4, 39.97, 36.47 and 36.83% respectively), but larger than that of *F. cylindroides*, *E. ramosum* and *H. bififormis* (34.68, 31.39 and 33.79% respectively) (Table 6).

The gene content of strain Marseille-P3110<sup>T</sup> is smaller than that of *Dielma fastidiosa* and *E. ramosum* (3319, 2582 and

**TABLE 7. Numbers of orthologous proteins shared between genomes (upper right) and AGIOS values obtained (lower left)**

	Tm	Fc	Ed	Er	Et	Hb	Sm	Era	Df
Tm	<b>2582</b>	769	696	605	614	757	663	768	940
Fc	57.72	<b>2057</b>	696	534	541	851	606	723	797
Ed	59.24	59.86	<b>1927</b>	484	501	691	529	632	785
Er	58.60	57.06	57.12	<b>1645</b>	769	527	567	579	647
Et	62.91	56.24	56.25	70.60	<b>1792</b>	544	580	590	654
Hb	55.70	60.78	57.01	56.11	54.85	<b>2529</b>	614	722	800
Sm	58.87	57.70	58.21	57.81	58.48	56.99	<b>2035</b>	595	708
Era	59.80	56.40	56.80	57.56	58.29	57.36	56.95	<b>3169</b>	836
Df	59.29	56.88	58.13	56.47	56.39	55.88	56.07	56.88	<b>3319</b>

Number of proteins per genome is indicated in bold.

Df, *Dielma fastidiosa* DSM 26099; Ed, *Eubacterium dolichum* CAG, 375; Er, *Erysipelothrix rhusiopathiae* ATCC 19414; Era, *Erysipelatoclostridium ramosum* DSM 1402; Et, *Erysipelothrix tonsillarum* DSM 14972; Fc, *Faecalitalea cylindroides* ATCC 27803; Hb, *Holdemanella bififormis* DSM 3989; Sm, *Solobacterium moorei* F0204; Tm, *Traorella massiliensis* Marseille-P3110<sup>T</sup>.

TABLE 8. Pairwise comparison of *Traorella massiliensis* strain Marseille-P3110<sup>T</sup> with other species using GGDC, formula 2 (DDH estimates based on identities/HSP length)<sup>a</sup>

	<i>Traorella massiliensis</i>	<i>Faecalitalea cylindroides</i>	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	<i>Solobacterium moorei</i>	<i>Eubacterium dolichum</i>	<i>Erysipelothrix tonsillarum</i>	<i>Erysipelatoclostridium ramosum</i>	<i>Holdemannella bififormis</i>	<i>Dielma fastidiosa</i>
<i>Traorella massiliensis</i>	100% ± 00								
<i>Faecalitalea cylindroides</i>	24% ± 2.40	100% ± 00							
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	27.8% ± 2.45	16.50% ± 2.20	100% ± 00						
<i>Solobacterium moorei</i>	23.3% ± 2.35	15.10% ± 2.15	27.89 ± 2.40	100% ± 00					
<i>Eubacterium dolichum</i>	25.5% ± 2.40	23.4% ± 2.40	28.4% ± 2.45	23.5% ± 2.35	100% ± 00				
<i>Erysipelothrix tonsillarum</i>	20.2% ± 2.35	44.10% ± 2.55	22.80% ± 2.40	37.30% ± 2.50	28% ± 2.40	100% ± 00			
<i>Erysipelatoclostridium ramosum</i>	23.1% ± 2.35	17.9% ± 2.25	24.6% ± 2.35	21.7% ± 2.35	22.5% ± 2.40	25.9% ± 2.40	100% ± 00		
<i>Holdemannella bififormis</i>	23.9% ± 2.40	23.4% ± 2.40	26.5% ± 2.40	16.70% ± 2.20	30.1% ± 2.45	29.0% ± 2.40	100% ± 00		
<i>Dielma fastidiosa</i>	22.0% ± 2.35	17.5% ± 2.20	24.2% ± 2.35	28.1% ± 2.45	22.20% ± 2.4	18.4% ± 2.3	27.3% ± 2.4	21.2% ± 2.3	100% ± 00

DDH, DNA-DNA hybridization; GGDC, Genome-to-Genome Distance Calculator; HSP, high-scoring segment pairs.  
<sup>a</sup>Confidence intervals indicate inherent uncertainty in estimating DDH values from intergenomic distances based on models derived from empirical test data sets (which are always limited in size).

3169 respectively), but larger than that of *F. cylindroides*, *E. rhusiopathiae*, *S. moorei*, *E. dolichum*, *E. tonsillarum* and *H. bififormis* (2057, 1645, 2035, 1927, 1792 and 2529 respectively). Distribution of genes into COGs categories was similar among all compared genomes (Fig. 6).

Among species with standing in nomenclature, AGIOS values ranged from 54.85 between *H. bififormis* and *E. tonsillarum* to 70.60 between *E. tonsillarum* and *E. rhusiopathiae*. When compared to strain Marseille-P3110<sup>T</sup>, AGIOS values ranged from 55.70 with *H. bififormis* to 62.91 with *E. tonsillarum* (Table 7). Among species with standing in nomenclature, dDDH values ranged from 15.10% between *F. cylindroides* and *S. moorei* to 44.10% between *F. cylindroides* and *E. tonsillarum*. dDDH values between strain Marseille-P3110<sup>T</sup> and compared species ranged from 20.20% with *E. tonsillarum* to 27.80% with *E. rhusiopathiae* (Table 8).

## Conclusion

Considering the specific phenotypic properties of strain Marseille-P3110<sup>T</sup>, including its low matching MALDI-TOF MS score, the 93.2% 16S rRNA similarity level with *Dielma fastidiosa*, and its genomic analysis, we propose the creation of a new genus within the family *Erysipelotrichaceae*, named *Traorella*, with *Traorella massiliensis* as type species and strain Marseille-P3110<sup>T</sup> as type strain.

## Description of *Traorella* gen. nov.

*Traorella* (tra.o.rel'la, N.L. fem. gen. n., *Traorella*, 'of Traore,' the family name of Sory Ibrahima Traore, a Malian microbiologist, for his contribution to the description of the human gut microbiota). Bacteria belonging to this genus are strictly anaerobic, non-spore forming, motile, Gram negative and rod shaped. The type species is *Traorella massiliensis*.

## Description of *Traorella massiliensis* sp. nov.

*Traorella massiliensis* (mas.si.li.en'sis, L. masc. adj., *massiliensis*, 'of Massilia,' the Latin name of Marseille, where strain Marseille-P3110<sup>T</sup> was isolated) is an anaerobic Gram-negative and motile bacilli with a mean length of 2.8 µm and a mean diameter of 0.33 µm. Strain Marseille-P3110<sup>T</sup> forms regular white colonies with a mean diameter of 1 mm. This bacterium is catalase and oxidase negative, and non-spore forming. Optimal growth was observed after 72 hours of incubation in anaerobic conditions at 37°C. Strain Marseille-P3110<sup>T</sup> was susceptible to amoxicillin/



clavulanic acid, clindamycin, metronidazole, imipenem, tobramycin, fosfomycin, erythromycin and amoxicillin but was resistant to rifampicin, gentamicin, vancomycin, colistin, trimethoprim/sulfamethoxazole, oxacillin and doxycycline.

The major cellular fatty acid was 9-octadecenoic acid. The genome of strain Marseille-P3110<sup>T</sup> is 2 607 061 bp long with 35.99% G+C content. The 16S rRNA and genome sequences are available in the European Bioinformatics Institute/European Molecular Biology Laboratory (EBI/EMBL) database under accession numbers LT615365 and FNLJ00000000, respectively. The type strain Marseille-P3110<sup>T</sup> (= CSUR P3110 = DSM 103514) was isolated from the left colon cleansing of a 76-year-old Frenchwoman.

## Acknowledgements

The authors thank the Xegen Company ([www.xegen.fr](http://www.xegen.fr)) for automating the genomic annotation process. This study was funded by the Fondation Méditerranée Infection. We thank M. Lardière for English-language review.

## Conflict of interest

None declared.

## References

- [1] Lagier JC, Khelaifia S, Alou MT, Ndongo S, Dione N, Hugon P, et al. Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics. *Nat Microbiol* 2016;7(1):16203.
- [2] Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(Suppl. 1):4586–91. 108.
- [3] Ramasamy D, Lagier JC, Nguyen TT, Raoult D, Fournier PE. Non contiguous–finished genome sequence and description of *Dielma fastidiosa* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Erysipelotrichaceae*. *Stand Genomic Sci* 2013;8:336–51.
- [4] Kaakoush NO. Insights into the role of *Erysipelotrichaceae* in the human host. *Front Cell Infect Microbiol* 2015;5:84.
- [5] Fournier PE, Drancourt M. New microbes new infections promotes modern prokaryotic taxonomy: a new section 'Taxonogenomics: new genomes of microorganisms in humans. *New Microb New Infect* 2015;7:48–9.
- [6] Seng P, Abat C, Rolain JM, Colson P, Lagier JC, Gouriet F, et al. Identification of rare pathogenic bacteria in a clinical microbiology laboratory: impact of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2013;51:2182–94.
- [7] Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 2009;49:543–51.
- [8] Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral JP, Raoult D. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol* 2000;38:3623–30.
- [9] Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today* 2006;33:152–5.
- [10] Lagier JC, Hugon P, Khelaifia S, Fournier PE, La Scola B, Raoult D. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clin Microbiol Rev* 2015;28:237–64.
- [11] Matuschek E, Brown DFJ, Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:255–66.
- [12] Sasser M. Bacterial identification by gas chromatographic analysis of fatty acids methyl esters (GC-FAME). Newark, NY: Microbial ID; 2006.
- [13] Dione N, Sankar SA, Lagier JC, Khelaifia S, Michele C, Armstrong N, et al. Genome sequence and description of *Anaerobaculum massiliensis* sp. nov. *New Microb New Infect* 2016;10:66–76.
- [14] Zerbino DR, Birney E. Velvet: algorithms for *de novo* short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res* 2008;18:821–9.
- [15] Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 2012;19:455–77.
- [16] Luo R, Liu B, Xie Y, Li Z, Huang W, Yuan J, et al. SOAPdenov02: an empirically improved memory-efficient short-read *de novo* assembler. *GigaScience* 2012;1:18.
- [17] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014;30(1):2114–20.
- [18] Hyatt D, Chen GL, LoCascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinform* 2010;11:119.
- [19] Lowe TM, Eddy SR. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res* 1997;25:955–64.
- [20] Lagesen K, Hallin P, Rødland EA, Staerfeldt HH, Rognes T, Ussery DW. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Res* 2007;35:100–8.
- [21] Käll L, Krogh A, Sonnhammer ELL. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol* 2004;338:1027–36.
- [22] Darling ACE, Mau B, Blattner FR, Perna NT. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res* 2004;14:1394–403.
- [23] Gouret P, Thompson JD, Pontarotti P. PhyloPattern: regular expressions to identify complex patterns in phylogenetic trees. *BMC Bioinform* 2009;10:298.
- [24] Lechner M, Findeib S, Steiner L, Marz M, Stadler PF, Prohaska SJ. Proteinortho: detection of (co-)orthologs in large-scale analysis. *BMC Bioinform* 2011;12:124.
- [25] Gouret P, Paganini J, Dainat J, Louati D, Darbo E, Pontarotti P, et al. Integration of evolutionary biology concepts for functional annotation and automation of complex research in evolution: the multi-agent software system DAGOBAN. In: Pontarotti P, editor. *Evolutionary biology: concepts, biodiversity, macroevolution and genome evolution*. Berlin: Springer; 2011. p. 71–87.
- [26] Gouret P, Vitiello V, Balandraud N, Gilles A, Pontarotti P, Danchin EG. Figenix: intelligent automation of genomic annotation: expertise integration in a new software platform. *BMC Bioinform* 2005;6:198.
- [27] Auch AF, von Jan M, Klenk HP, Göker M. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Stand Genomic Sci* 2010;28(2):117–34.
- [28] Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP, Göker M. Genome sequence–based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinform* 2013;21(14):60.

- [29] Ramasamy D, Mishra AK, Lagier JC, Padhmanabhan R, Rossi M, Sentausa E, et al. A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014;64:84–91.
- [30] Oren A, Garrity GM. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016;66:4299–305.
- [31] Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 1994;44:846–9.
- [32] Moore WEC, Johnson JL, Holdeman LV. Emendation of *Bacteroidaceae* and *Butyrivibrio* and descriptions of *Desulfomonas* gen. nov. and ten new species in the genera *Desulfomonas*, *Butyrivibrio*, *Eubacterium*, *Clostridium*, and *Ruminococcus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 1976;26:238–52.
- [33] De Maesschalck C, Van Immerseel F, Eeckhaut V, De Baere S, Cnockaert M, Croubels S, et al. *Faecalicoccus acidiformans* gen. nov., sp. nov., isolated from the chicken caecum, and reclassification of *Streptococcus pleomorphus*, *Eubacterium bifforme* and *Eubacterium cylindroides* as *Faecalicoccus pleomorphus* comb. nov., *Holdemanella biformis* gen. nov., comb. nov. and *Faecalitalea cylindroides* gen. nov., comb. nov., respectively, within the family *Erysipelotrichaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014;64(Pt 11):3877–84.
- [34] Greetham HL, Gibson GR, Giffard C, Hippe H, Merkhoffer B, Steiner U, et al. *Allobaculum stercoricanis* gen. nov., sp. nov., isolated from canine feces. *Anaerobe* 2004;10:301–7.
- [35] Mishra AK, Lagier JC, Pfeleiderer A, Nguyen TT, Caputo A, Raoult D, et al. Non-contiguous finished genome sequence and description of *Holdemanella massiliensis* sp. nov. *Stand Genomic Sci* 2013;9:395–409.
- [36] Kageyama A, Benno Y. Phylogenic and phenotypic characterization of some *Eubacterium*-like isolates from human feces: description of *Solobacterium moorei* gen. nov., sp. nov. *Microbiol Immunol* 2000;44:223–7.
- [37] Downes J, Olsvik B, Hiom SJ, Spratt DA, Cheeseman SL, Olsen I, et al. *Bulleidia extracta* gen. nov., sp. nov., isolated from the oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50(Pt 3):979–83.

**Article 3: Genome sequence and description of  
*Coprococcus phoceensis* gen. nov., sp. nov., a new bacterial  
genus isolated from the human left colon**

M. Bonnet, D. Ricaboni, M. Mailhe, V. Vitton, A. Benezech,  
J. Delerce, D. Raoult, N. Cassir, B. Lascola and S. Khelaifia

Publié dans *New microbes and New Infections*

# Genome sequence and description of *Coprococcus phoceensis* gen. nov., sp. nov., a new bacterial genus isolated from the human left colon

M. Bonnet<sup>1</sup>, D. Ricaboni<sup>1,2,3</sup>, M. Mailhe<sup>1</sup>, V. Vitton<sup>4</sup>, A. Benezech<sup>4</sup>, J. Delerce<sup>1</sup>, D. Raoult<sup>1,2</sup>, N. Cassir<sup>1</sup>, B. Lascola<sup>1</sup> and S. Khelaifia<sup>1,2</sup>

1) Aix-Marseille Université, IRD, APHM, MEPHI, 2) Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée Infection, Marseille, France, 3) Département des sciences cliniques et biomédicales, Luigi Sacco, Division des Maladies Infectieuses III, Université de Milan, Milan, Italy and 4) Service de Gastroentérologie, Hôpital Nord, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Marseille, France

## Abstract

We report here the main characteristics of *Coprococcus phoceensis* strain Marseille-P3062<sup>T</sup> (CSUR P3062). The 16S rDNA sequencing and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry spectrum analysis were used to identify and characterize this new anaerobic bacterial species, which was isolated from the left colon cleansing of a 25-year-old French man with Crohn's disease.

© 2019 The Authors. Published by Elsevier Ltd.

**Keywords:** *Coprococcus phoceensis*, culturomics, genome, gut microbiota, taxonogenomics

**Original Submission:** 25 January 2019; **Revised Submission:** 20 March 2019; **Accepted:** 2 April 2019

**Article published online:** 10 April 2019

**Corresponding author:** S. Khelaifia, Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée Infection, 19–21 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 5, France.

**E-mail:** [khelaifia\\_saber@yahoo.fr](mailto:khelaifia_saber@yahoo.fr)

M. Bonnet and Davide Ricaboni participated equally in the study.

## Introduction

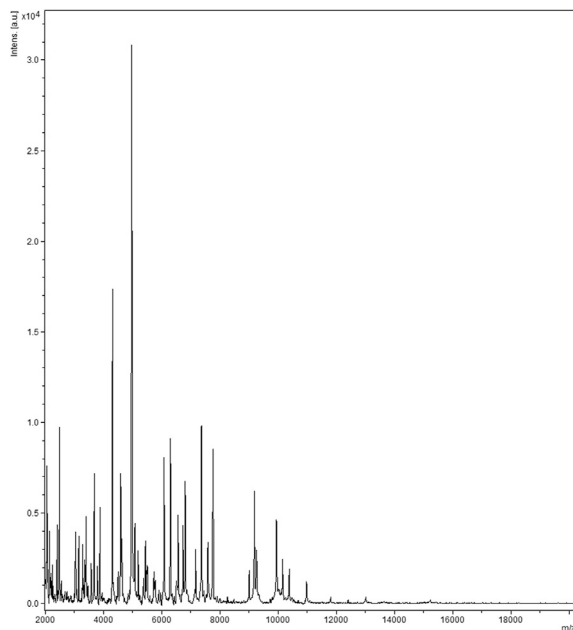
In March 2016, as part of the culturomic study to assess the microbial diversity of the human microbiota [1–3], we isolated a new bacterial species from the left colon cleansing of a 25-year-old French man with Crohn's disease. The strain isolated here could not be identified by our systematic matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) screening on a MicroFlex spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) [4]. The spectra obtained (Fig. 1) were imported and analysed using the BIOTYPER 3.0 software against the Bruker database that was continually incremented with MEPHI database. The study was approved by the Institut Fédératif de Recherche 48 (agreement number 09–022, Marseille, France) and the patient's consent was obtained.

## Isolation and growth conditions

Strain Marseille-P3062<sup>T</sup> was first isolated after 7 days of incubation on 5% sheep blood-enriched Columbia agar (bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, France) at 37°C in anaerobic atmosphere (AnaeroGen Compact; Oxoid, Thermo Scientific, Dardilly, France). Growth was not observed under micro-aerophilic (campyGEN; Oxoid) and aerobic conditions. The bacterial cells tolerated a pH of 5 to 8, with optimum growth at pH 7, and an NaCl concentration <50 mg/L, with optimum growth at 5 g/L. After 20 min of thermal shock at 80°C, this bacterium was not spore-forming and no growth was observed at 37°C on 5% sheep blood-enriched Columbia agar. The electron microscopy then confirmed this negative result.

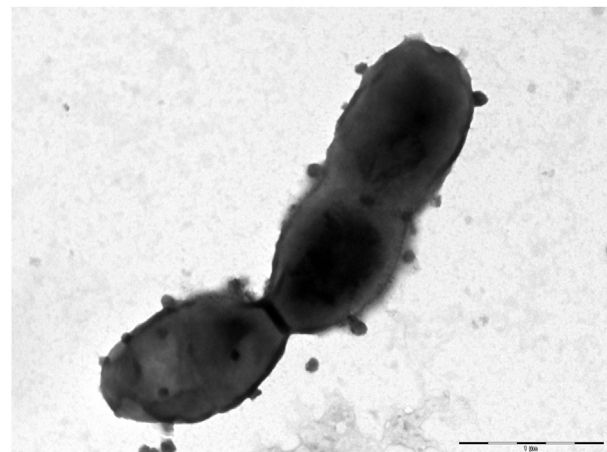
## Phenotypic characteristics

Agar-grown colonies were transparent and crater-shaped with a mean diameter of 3 mm. Bacterial cells were Gram-stain variable, arranged in small chains, rod-shaped, and were 1.3–2.3 µm long and 0.5–0.7 µm wide (Fig. 2). Strain Marseille-P3062<sup>T</sup> was catalase and oxidase negative. The main



**FIG. 1.** Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry reference spectrum of *Coprococcus phoceensis* sp. nov. The reference spectrum was generated by comparison of spectra from 12 individual colonies.

characteristics of the strain are summarized in [Table 1](#). Using an API ZYM strip, an API 20A strip and an API 50 CH strip, positive enzymatic activities included, alkaline phosphatase, *N*-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase, acid phosphatase and naphthol-AS-BI-phosphohydrolase. No activity was found for the following enzymes: valine arylamidase,  $\alpha$ -fucosidase,  $\beta$ -galactosidase, esterase C4, esterase lipase C8, protease, urease, leucine arylamidase, lipase C14, cystine arylamidase, trypsin,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -chymotrypsin,  $\alpha$ -galactosidase and  $\alpha$ -mannosidase. No acid production was observed from *D*-glucose, *D*-lactose, *D*-sucrose, *D*-maltose, salicin, *D*-xylose, *L*-arabinose, *D*-cellobiose, *D*-mannose, *D*-raffinose, *D*-sorbitol, *D*-trehalose, *D*-mannitol, *D*-xylose, *L*-arabinose, glycerol, *D*-melezitose and *L*-rhamnose. Only one carbohydrate was metabolized: potassium 5-ketogluconate, as revealed by an API 50 CH strip. The other tested carbohydrates (*D*-melibiose, *D*-ribose, *D*-tagatose, glycerol, glycogen, *D*-arabinose, erythritol, *L*-xylose, *D*-galactose, *D*-adonitol, methyl- $\beta$ -*D*-xylopyranoside, *D*-glucose, *D*-fructose, *D*-mannose, *L*-sorbitol, dulcitol, *L*-rhamnose, inositol, *D*-mannitol, *D*-sorbitol, methyl- $\alpha$ -*D*-glucopyranoside, methyl- $\alpha$ -*D*-mannopyranoside, *D*-acetylglucosamine, esculin ferric citrate, amygdalin, *D*-cellobiose, arbutin, salicin, *D*-maltose, *D*-sucrose, *D*-lactose, *D*-raffinose, *D*-trehalose, inulin, *D*-melezitose, starch, xylitol, gentiobiose, *D*-arabitol, *L*-



**FIG. 2.** Scanning electron microscopy (SEM) of stained *Coprococcus phoceensis* sp. nov. A colony was collected from agar and immersed into a 2.5% glutaraldehyde fixative solution. Then a drop of the suspension was directly deposited on a poly-L-lysine-coated microscope slide for 5 min and treated with 1% phosphotungstic acid aqueous solution (pH 2.0) for 2 min to increase SEM image contrast. The slide was gently washed in water; air-dried and examined in a tabletop SEM (Hitachi TM4000) of approximately 60 cm in height and 33 cm in width to evaluate the bacterial structure. Scales and acquisition settings are shown in the figures.

arabitol, *D*-lyxose, *D*-turanose, *D*-fucose, *L*-fucose, potassium gluconate and potassium 2-ketogluconate) were not used.

### Strain identification

After three failed identifications by our systematic MALDI-TOF mass spectrometry (MS) screening on a Microflex spectrometer (Bruker Daltonics) [5], the 16S rRNA gene was sequenced, using universal primers FD1 and RP2 (Eurogentec, Angers, France) as previously described [6,7], and a 3130-XL sequencer (Applied Biosciences, Saint-Aubin, France). Strain Marseille-P3062<sup>T</sup> exhibited a 95.67% sequence identity with *Coprococcus comes* strain VPI CI-38 (GenBank Accession number NR\_044048.1) the phylogenetically closest species with standing in nomenclature ([Fig. 3](#)), which putatively classifies it as a new species of the genus *Coprococcus* in the order of *Clostridiales* within the *Firmicutes* phylum.

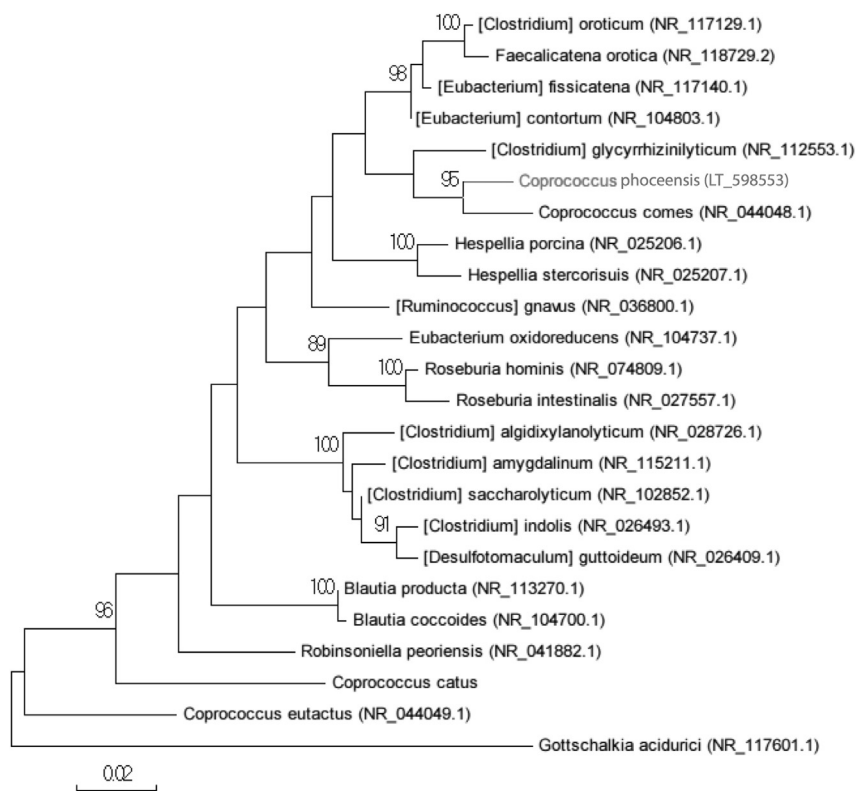
### Genome sequencing

Genomic DNA was extracted using the EZ1 biorobot with the EZ1 DNA tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) and then sequenced on a MiSeq sequencer (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) with the Nextera Mate Pair sample prep kit and Nextera

**TABLE I.** Description of *Coprococcus phoceensis* sp. nov., according to the digitized protologue TA00877 at the [www.imedea.uib.es/dprotologue](http://www.imedea.uib.es/dprotologue) website

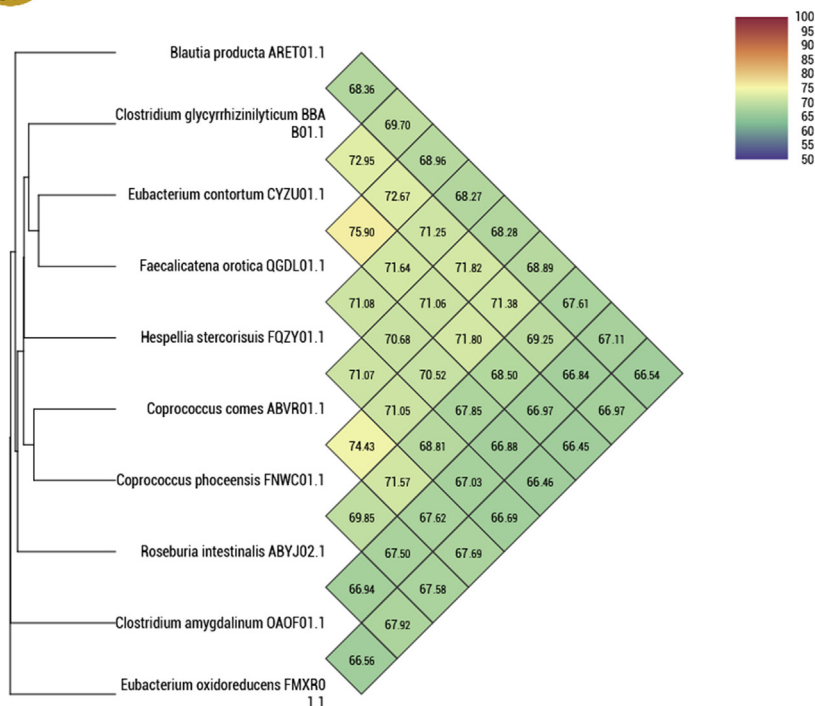
Taxonnumber	TA00877
Date of the entry	2019-01-23
First submission date	2019-01-23
Draft number/Date	001
Version	Submitted
Species name	<i>Coprococcus phoceensis</i>
Genus name	<i>Coprococcus</i>
Specific epithet	<i>phoceensis</i>
Species status	sp. nov.
Species etymology	pho.ce.en.sis, L., neut., adj., <i>phoceensis</i> , based on the acronym of the Phocean city where the type strain was first isolated
Submitter	Bonnet Marion
E-mail of the submitter	<a href="mailto:marioncg.bonnet@yahoo.fr">marioncg.bonnet@yahoo.fr</a>
Designation of the type strain	Strain Marseille-P3062
Strain collection numbers	CSUR P3062 = DSM 103635
16S rRNA gene Accession number	LT598553
Genome Accession number (EMBL)	FNWC01000000
Genome status	Draft
Genome size	3 601 259 bp
GC mol %	40.21
Data on the origin of the sample from which the strain was isolated	
Country of origin	France
Region of origin	Marseille
Date of isolation	2016-03
Source of isolation	Human left colon cleansing sample
Sampling date	2016-03
Growth medium, incubation conditions (temperature, pH and further information) used for standard cultivation	Columbia agar supplemented with 5% sheep blood, 37°C for 48 h of incubation
Gram stain	Variable
Cell shape	Small chain rod
Cell size (length or diameter)	1.3–2.3 × 0.5–0.7 (µm)
Motility	Non-motile
Colony morphology	Transparent and crater-shaped
Temperature range	37°C
Lowest temperature for growth	28°C
Highest temperature for growth	37°C
Temperature optimum	37°C
Lowest pH for growth	5
Highest pH for growth	8
Relationship to O <sub>2</sub>	Anaerobe
O <sub>2</sub> conditions for strain testing	Aerobiosis, anaerobiosis, microaerophilic
Oxidase	Negative
Catalase	Negative

**FIG. 3.** Phylogenetic tree showing the position of *Coprococcus phoceensis* strain Marseille-P3062<sup>T</sup> relative to other phylogenetically close neighbours. Sequences were aligned using MUSCLE, and phylogenetic inferences were obtained using the maximum-likelihood method within the MEGA software. Numbers at the nodes are percentages of bootstrap values obtained by repeating the analysis 100 times to generate a majority consensus tree. Only the bootstrap scores of at least 70% were retained. The scale bar indicates a 2% nucleotide sequence divergence.





Heatmap generated with OrthoANI values calculated from the OAT software. Please cite Lee *et al.* 2015.



**FIG. 4.** Heatmap generated with ORTHOANI values calculated using the OAT software between *Coprococcus phoceensis* sp. nov., and other closely related species with standing in nomenclature.

XT Paired End (Illumina Inc.), as previously described [8]. The assembly was performed using a pipeline containing several software (Velvet [9], Spades [10] and Soap Denovo [11]), on trimmed data (MiSeq and TRIMMOMATIC [12] software) or untrimmed data (only MiSeq software). GAPCLOSER was used to reduce assembly gaps. Scaffolds <800 bp and scaffolds with a depth value <25% of the mean depth were removed. The best assembly was selected by using different criteria (number of scaffolds, N50, number of N). The genome of strain Marseille-P3062<sup>T</sup> was 3 601 259 bp long with 40.21% G+C content. The degree of genomic similarity of strain Marseille-P3062<sup>T</sup> with closely related species was estimated using the ORTHOANI software [13]. ORTHOANI values among closely related species (Fig. 4) ranged from 66.54% between *Blautia producta* and *Eubacterium oxidoreducens* to 75.9% between *Eubacterium contortum* and *Faecalicatena orotica*. When *Coprococcus phoceensis* was compared with these closely related species, values ranged from 67.58% with *E. oxidoreducens* to 70.52% with *F. orotica*.

## Conclusion

As the sequence identity with the phylogenetically closest validated species was <98.7%, which is the threshold recommended to define a species according to the nomenclature

[5,14], we propose the strain Marseille-P3062<sup>T</sup> as a representative of a new species within the genus *Coprococcus*. Consequently, we suggest the creation of the new species named "*Coprococcus phoceensis*" sp. nov., strain Marseille-P3062<sup>T</sup> (pho.ce.en.sis, L., neut., adj., *phoceensis*, based on the acronym of the Phocian city where the type strain was first isolated).

## Nucleotide sequence Accession number

The 16S rRNA gene sequence was deposited in GenBank under Accession number LT598553.

## Deposit in a culture collection

Strain Marseille-P3062<sup>T</sup> was deposited in the Collection de Souches de l'Unité des Rickettsies (CSUR, WDCM 875) under number P3062.

## MALDI-TOF-MS spectrum

The MALDI-TOF-MS spectrum of '*Coprococcus phoceensis*' Marseille-P3062<sup>T</sup> is available online at: <http://backup.mediterranean-infection.com/article.php?larub=280&titre=urms-database>.

## Conflict of interest

---

None to declare.

## Funding sources

---

This research is funded by the Agence Nationale de la Recherche as part of the Méditerranée Infection 10-IAHU-03 project.

## Acknowledgements

---

The authors thank Catherine Robert for sequencing the genome and Aurelia Caputo for submitting the genomic sequence to GenBank.

## References

---

- [1] Lagier J-C, Khelaifia S, Alou MT, Ndongo S, Dione N, Hugon P, et al. Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics. *Nat Microbiol* 2016;1:16203.
- [2] Lagier J-C, Armougom F, Million M, Hugon P, Pagnier I, Robert C, et al. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:1185–93.
- [3] Lagier J-C, Hugon P, Khelaifia S, Fournier P-E, La Scola B, Raoult D. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clin Microbiol Rev* 2015;28:237–64.
- [4] Seng P, Abat C, Rolain JM, Colson P, Lagier JC, Gouriet F, et al. Identification of rare pathogenic bacteria in a clinical microbiology laboratory: impact of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2013;51:2182–94.
- [5] Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today* 2006;33:152.
- [6] Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral JP, Raoult D. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol* 2000;38:3623–30.
- [7] Morel A-S, Dubourg G, Prudent E, Edouard S, Gouriet F, Casalta J-P, et al. Complementarity between targeted real-time specific PCR and conventional broad-range 16S rDNA PCR in the syndrome-driven diagnosis of infectious diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015;34:561–70.
- [8] Diop A, Khelaifia S, Armstrong N, Labas N, Fournier P-E, Raoult D, et al. Microbial culturomics unravels the halophilic microbiota repertoire of table salt: description of *Gracilibacillus massiliensis* sp. nov. *Microb Ecol Health Dis* 2016;27.
- [9] Zerbino DR, Birney E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res* 2008;18:821–9.
- [10] Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 2012;19:455–77.
- [11] Luo R, Liu B, Xie Y, Li Z, Huang W, Yuan J, et al. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler. *Gigascience* 2012;1:18.
- [12] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014;30:2114–20.
- [13] Lee I, Ouk Kim Y, Park S-C, Chun J. OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016;66:1100–3.
- [14] Ramasamy D, Mishra AK, Lagier J-C, Padhmanabhan R, Rossi M, Sentausa E, et al. A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014;64:384–91.



**Article 4: «*Veillonella massiliensis*», a new anaerobic species isolated from human colostrum**

Amadou Hamidou Togo, Clotilde Des Robert, Marion Bonnet,  
Pierre-Edouard Fournier, Didier Raoult, Matthieu Million

Publié dans Human Microbiome Journal



## «*Veillonella massiliensis*», a new anaerobic species isolated from human colostrum



Amadou Hamidou Togo<sup>a</sup>, Clotilde Des Robert<sup>b</sup>, Marion Bonnet<sup>a</sup>, Pierre-Edouard Fournier<sup>a</sup>, Didier Raoult<sup>a</sup>, Matthieu Million<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Aix-Marseille Université, URMITE, UM63, CNRS7278, IRD198, Inserm 1095, Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée-Infection, 19-21 Boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France

<sup>b</sup>APHM, CHU Hôpital de la Conception, Service de médecine néonatale, F-13385 Marseille, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Available online 26 May 2017

#### Keywords:

Culturomics  
Taxonomy  
Colostrum  
Human Breast Milk  
*Veillonella massiliensis*

### ABSTRACT

We report here the main characteristics of “*Veillonella massiliensis*” strain Marseille-P3594<sup>T</sup> (CSUR P3594<sup>T</sup>) that was isolated from two human colostrum samples from two different mothers.

© 2017 Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

In 2016, during an exploratory study of human breast milk by culturomics [1], two anaerobic isolates were isolated from the milk sampled from two French primigravida women, and a new species is proposed to introduce the strain as member of the genus *Veillonella*.

These bacterial strains could not be identified by our systematic matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight screening on a Microflex spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) but both matched perfectly using this technique. Only the strain isolated first was described here. The patients gave a signed and informed consent and the study was validated by the ethics committee of the Institut Federatif de Recherche IFR48 under number 2016-004. The initial growth was obtained after three days of culture in a blood culture bottle supplemented with 5% of sheep blood and 5% of rumen fluid in anaerobic conditions. Agar-grown colonies were translucent with a mean diameter inferior to 0.5 mm. Bacterial cells were Gram-negative, coccoid, ranging in diameter from 1.5 to 3.9 μm with a mean of 2.4 μm. Strain Marseille-P3594<sup>T</sup> was catalase-negative and oxidase-negative. The 16S rRNA gene was sequenced using fD1-rP2 primers as

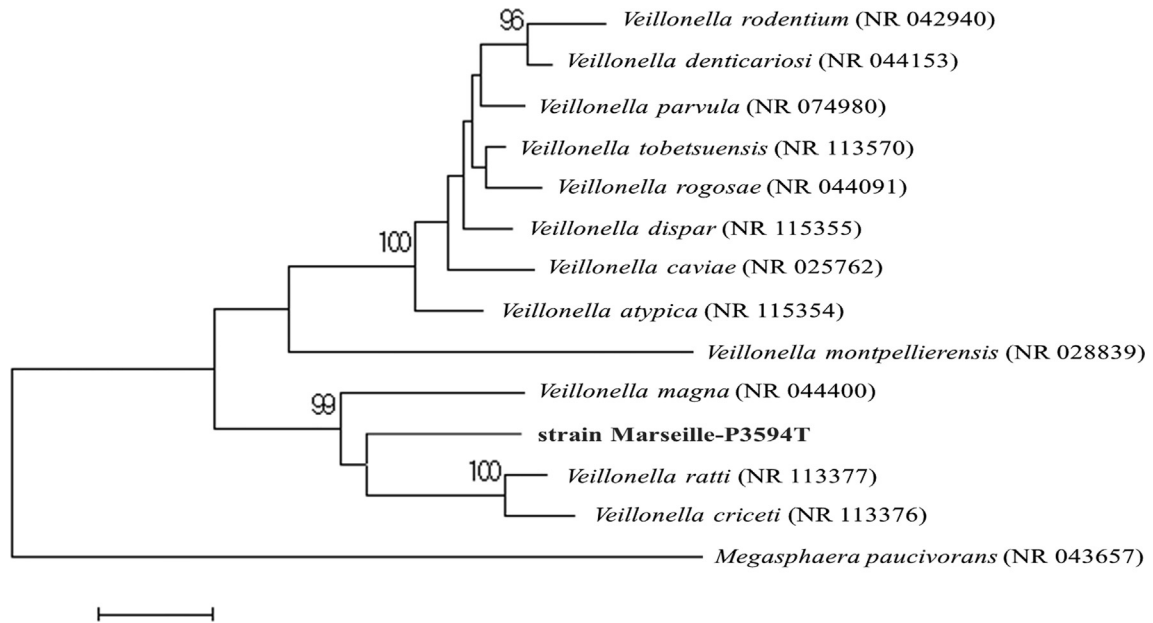
previously described and a 3130-XL sequencer (Applied Biosciences, Saint Aubin, France). Strain Marseille-P3594<sup>T</sup> exhibited a 96.7% sequence similarity with *Veillonella ratti* strain JCM 6512<sup>T</sup>, the phylogenetically closest species with standing in nomenclature (Fig. 1), which putatively classifies it as a member of the genus *Veillonella* within the family *Veillonellaceae* in the *Firmicutes* phylum. Species of the genus *Veillonella* are anaerobic, Gram-negative cocci and known for their ability to ferment lactate into propionate and acetate [2]. They are found in the mouth, the upper respiratory tract, the intestine, and the vagina as normal flora and are frequently isolated from human breast milk [3]. Accordingly, *Veillonella* species may be important for the development of the healthy mature anaerobic gut microbiota [4,5]. The species *Veillonella parvula* is often implicated in infectious endocarditis and osteomyelitis in humans. Strain Marseille-P3594<sup>T</sup> exhibited a 16S rRNA sequence divergence >1.3% (3.3%) with its phylogenetically closest species with standing in nomenclature, thus we propose the creation of the new *Veillonella* species named *V. massiliensis* (mas.si.li.en'sis. L. fem. adj. *massiliensis*, of Massilia, the Latin name of Marseilles, where the strain was isolated). Strain Marseille-P3594<sup>T</sup> is the type strain of the *Veillonella massiliensis* sp nov.

### Nucleotide sequence accession number

The 16S rRNA gene sequence was deposited in Genbank under Accession number LT714171.

\* Corresponding author at: URMITE, Aix Marseille Université, UM63, CNRS 7278, IRD 198, INSERM 1095, IHU – Méditerranée Infection, 19-21 Boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France.

E-mail address: [matthieumillion@gmail.com](mailto:matthieumillion@gmail.com) (M. Million).



**Fig. 1.** Phylogenetic tree showing the position of “*Veillonella massiliensis*” strain Marseille-P3594<sup>T</sup> relative to the phylogenetically closest species. Sequences were aligned using CLUSTALW, and phylogenetic inferences obtained using the maximum-likelihood method within the MEGA software. Numbers at the nodes are percentages of bootstrap values obtained by repeating the analysis 500 times to generate a majority consensus tree. Only the bootstraps scores superior to 75 were retained. The scale bar indicates a 1% nucleotide sequence divergence.

#### Deposit in a culture Collection

Strain Marseille-P3594<sup>T</sup> was deposited in the Collection de Souches de l'Unité des Rickettsies (CSUR) under number P3594<sup>T</sup>.

#### Conflict of interest

No conflict of interest to declare.

#### Funding sources

This work was funded by the Méditerranée-Infection Foundation.

#### Acknowledgement

We thank Magdalen Lardière for English reviewing.

#### References

- [1] Lagier JC, Khelaifia S, Alou MT, Ndongo S, Dione N, Hugon P, et al. Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics. *Nat Microbiol* 2016;1:16203.
- [2] Mays TD, Holdeman LV, Moore WEC, Rogosa M, Johnson JL. Taxonomy of the genus *Veillonella* Prévot. *Int J Syst Evol Microbiol* 1982;32:28–36.
- [3] Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E, Mira A. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr* 2012;96:544–51.
- [4] Million M, Diallo A, Raoult D. Gut microbiota and malnutrition. *Microb Pathog* 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.02.003>. pii: S0882-4010(15)30212-6.
- [5] Million M, Tidjani Alou M, Khelaifia S, Bachar D, Lagier JC, Dione N, et al. Increased gut redox and depletion of anaerobic and methanogenic prokaryotes in severe acute malnutrition. *Sci Rep* 2016;6:26051.

# Références bibliographiques

- 1- Wainwright M., Lederberg J. History of microbiology. *Encyclopedia of microbiology*, 1992. 2, 419-37.
- 2- Lagier J. C., Hugon P., Khelaifia S., Fournier P. E., La Scola B., Raoult D. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clin Microbiol Rev.* 2015; 28(1), 237-64.
- 3- Sandle T. History and development of microbiological culture media. *The Journal (Institute of Science and Technology)*. 2011; 10-4
- 4- Lagier J. C., Edouard S., Pagnier I., Mediannikov O., Drancourt M., Raoult D. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect.* 2015; 28(1), 208-36.
- 5- Helmink B. A., Khan M. W., Hermann A., Gopalakrishnan V., Wargo J. A. The microbiome, cancer, and cancer therapy. *Nat Med.* 2019; 1.
- 6- Vivarelli S., Salemi R., Candido S., Falzone L., Santagati M., Stefani S., *et al.* Gut microbiota and cancer: From pathogenesis to therapy. *Cancers.* 2019 11(1), 38.
- 7- Rea D., Coppola G., Palma G., Barbieri A., Luciano A., Del Prete P., *et al.* Microbiota effects on cancer: from risks to therapies. *Oncotarget.* 2018; 9(25), 17915.
- 8- Daillère R., Vétizou M., Waldschmitt N., Yamazaki T., Isnard C., Poirier-Colame V., *et al.* *Enterococcus hirae* and *Barnesiella intestinihominis* facilitate cyclophosphamide-induced therapeutic immunomodulatory effects. *Immunity.* 2016; 45(4), 931-43.
- 9- Dione N., Khelaifia S., La Scola B., Lagier J. C., Raoult D. A quasi-universal medium to break the aerobic/anaerobic bacterial culture dichotomy in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect.* 2016 ; 22(1), 53-8.
- 10- Thursby E., Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J.* 2017; 474(11), 1823-36.
- 11- Cassard A. M., Thomas M., Les microbiotes humains : des alliés pour notre santé, *Encyclopédie de l'Environnement*, [en ligne ISSN 2555-0950]. 2019 [consulté le 14 septembre 2019]. Disponible : <https://www.encyclopedie-environnement.org/sante/les-microbiotes-humains-des-allies-pour-notre-sante/>.
- 12- Miquel S., Martin R., Rossi O., Bermudez-Humaran L. G., Chatel J. M., Sokol H., *et al.* *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Curr Opin Microbiol.* 2013; 16(3), 255-261.

## SERMENT DE GALIEN

*Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :*

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.*

*Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.*

## **Résumé :**

Du fait de l'explosion du nombre de nouvelles espèces bactériennes découvertes dans notre laboratoire grâce à la technique de culturomics, qui consiste à utiliser un très grand nombre de milieux de culture et de conditions de culture afin d'étendre le répertoire des bactéries, la culture bactérienne a connu un nouvel essor depuis plusieurs années. En effet, suite à la découverte des techniques moléculaires, la culture a été considérée comme dépassée par un grand nombre de microbiologistes. Cependant, de précédentes études ont depuis mis en évidence que les techniques moléculaires et la culture bactérienne sont complémentaires.

Le développement de nouveaux milieux et de nouvelles techniques de culture est primordial car cela permettra d'optimiser la croissance de certaines bactéries ou encore d'isoler des bactéries fastidieuses à cultiver. Pour cela, la connaissance de l'environnement naturel de la bactérie et de ses besoins nutritifs apparaît fondamentale pour isoler les bactéries et éviter ainsi qu'elles ne demeurent dans la catégorie des bactéries « incultivées ». De plus, il est également nécessaire de développer des milieux sélectifs afin d'isoler spécifiquement des bactéries. En effet, certaines bactéries ont une grande importance en santé humaine et notamment dans l'induction de la réponse aux traitements de certaines maladies, en particulier les anti-cancéreux. Mettre rapidement en évidence ces bactéries dans le microbiote des malades amenés à recevoir ces traitements pourra permettre un gain de temps dans la prise en charge de leur maladie. De plus, arriver à cultiver dans un même milieu les bactéries anaérobies et aérobies en conditions d'aérobiose permettrait également une plus grande rapidité dans le rendu des résultats et le traitement des patients en cas d'infection.

Ce travail de thèse a été divisé en quatre objectifs : 1) établir les éléments essentiels à l'élaboration d'un milieu de culture et à la croissance des bactéries, 2) mettre au point un milieu de culture qui permette l'isolement de la bactérie *Enterococcus hirae*, du fait de son importance dans l'induction de la réponse au traitement par cyclophosphamide, 3) optimiser un milieu de culture qui permette à la fois la croissance des bactéries anaérobies et aérobies en conditions d'aérobiose, 4) Développer une technique qui permette d'hydrater en continu la gélose lors de son incubation prolongée à l'étuve dans le cas des bactéries à croissance lente par exemple.

**Mots clés :** Milieu de culture, *Enterococcus hirae*, Bactéries anaérobies, Déshydratation

## **Abstract :**

Due to the explosion in the number of new bacterial species discovered in our laboratory thanks to the culturomics technique, which consists in using a very large number of culture media and culture conditions to extend the repertoire of bacteria, bacterial culture has experienced a new boom in recent years. Indeed, following the discovery of molecular techniques, the culture was considered outdated by a large number of microbiologists. However, previous studies have since shown that molecular techniques and bacterial culture are complementary.

The development of new culture media and new culture techniques is essential because it will optimize the growth of certain bacteria or isolate fastidious bacteria to be cultivated. For this reason, knowledge of the bacterium's natural environment and its nutritional needs appears fundamental because otherwise the bacteria will not be isolated and will remain in the category of "uncultivated" bacteria. In addition, it is also necessary to develop selective media in order to specifically isolate bacteria. Indeed, certain bacteria have a great importance in human health and in particular in the induction of the response to the treatment of certain diseases, in particular anti-cancer treatments. Rapid detection of these bacteria in the microbiota of patients receiving these treatments could save time in the management of their disease. In addition, the ability to culture anaerobic and aerobic bacteria in the same medium under aerobic conditions would also allow for faster results and treatment of patients in the event of infection.

This thesis work has been divided into four objectives: 1) establish the essential elements for the development of a culture medium and the growth of bacteria, 2) develop a culture medium that allows the isolation of *Enterococcus hirae* bacteria because of its importance in inducing response to cyclophosphamide treatment, 3) optimize a culture medium that allows both anaerobic and aerobic bacteria to grow under aerobic conditions, 4) Develop a technique that continuously hydrates the agar during its prolonged incubation in the oven in the case of slow-growing bacteria, for example.

**Keywords:** Culture medium, *Enterococcus hirae*, Anaerobic bacteria, Dehydration