Avis de Soutenance

Madame Reham MAGDY MOHAMED WASFY HASSANEIN

Biologie-Santé - Spécialité Maladies Infectieuses

Soutiendra publiquement ses travaux de thèse intitulés

Caractérisation du microbiote intestinal chez les patients hépatiques : Infection par le virus de l'hépatite B et hépatite alcoolique

dirigés par Monsieur Matthieu MILLION

Thèse soutenue le ***vendredi 24 novembre 2023*** à 14h00
Lieu : Institut Hospitalo-Universitaire, 19-21 Bd Jean Moulin, 13005 Marseille,
Salle : Amphithéâtre IHU

Composition du jury proposé

M. Matthieu MILLION	Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, 13005 Marseille, France	Directeur de thèse
M. Max MAURIN	Université de Grenoble	Rapporteur
M. Philippe GUAL	Universite de nice	Rapporteur
Mme Laurence CAMOIN	Aix Marseille Universite	Président
M. René GEROLAMI	Unité hépatologie, Hôpital de la Timone, APHM, Marseille, France	Invité
M. Didier RAOULT	Institut Hospitalo-Universitaire, 19-21 Bd Jean Moulin, 13005 Marseille,	Invité

Mots-clés : microbiote,Culturomique,virus de l'hépatite B,carcinome hépatocellulaire,métagénomiques,hépatite alcoolique,

Résumé :

Les maladies du foie sont responsables d'un fardeau sanitaire mondial de plus en plus lourd. Des profils différents du microbiote intestinal ont été observés dans les maladies hépatiques liées à l'alcool (ALD), l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB), ou même ces complications associées telles que la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire (CHC). En effet, la métagénomique a révélé des altérations significatives de la composition du microbiote intestinal chez les patients infectés par le VHB ou en ALD, avec une diminution des Clostridiales produisant du butyrate et une augmentation des Enterobacteriaceae induisant l'inflammation. Cependant, peu de recherches ont étudié la dysbiose intestinale au niveau des espèces microbiennes. En outre, aucune étude n'a examiné le microbiote intestinal de ces patients à l'aide de l'approche de culturomique. Par conséquent, dans le présent travail, nous avons d'abord réalisé des études cas-témoins pour étudier le microbiote intestinal chez les patients atteints du VHB et de l'ALD, en utilisant la culturomique et la métagénomique. En outre, nous avons d'abord effectué une analyse systématique de la littérature

à l'aide d'outils de recherche assistés par ordinateur afin de décrypter les signatures du microbiote intestinal associées au VHB qui pourraient être utilisées comme biomarqueurs diagnostiques non invasifs à différents stades de la maladie. Notre analyse qualitative dans la revue nous a permis d'identifier des résultats reproductibles pour un profil de microbiote signature dans les maladies associées au VHB, caractérisé par une augmentation constante de la plupart des membres de ¬Pseudomonadota, Bacilli, Prevotella, Streptococcus, Veillonella et une diminution constante de Clostridia, Lachnospiraceae, et Roseburria. En outre, les espèces de levure Saccharomyces cerevisae et Candida tropicalis ont été très abondantes. S. cerevisiae et C. tropicalis produisent toutes les deux de grandes quantités d'éthanol. Ces résultats sont cohérents avec le rôle émergent de la production endogène d'éthanol dans les maladies du foie. Les caractéristiques de la dysbiose associée au VHB dans notre étude ont révélé un enrichissement dans le genre Enterocloster (anciennement Clostridium), récemment apparu, dont l'importance dans l'infection par le VHB n'a pas été identifiée. Au niveau des espèces bactériennes, les espèces Enterocloster bolteae étaient fortement enrichies avec deux souches produisant une quantité considérable d'éthanol (27 et 200 mM), qui est connue pour être nocive pour le foie. Il est intéressant de noter que les membres du phylum Candidate Phyla Radiation (CPR) non cultivés, tels que les Candidatus Saccharibacteria et le phylum Atribacter, ont été découverts pour la première fois en relation négative avec l'activité de la prothrombine dans la dysbiose associée au VHB. En outre, on a constaté pour la première fois que Thomasclavelia ramosa (anciennement Clostridium ramosum) était très répandu chez les patients atteints d'ALD qui ont développé un CHC. Les approches culturomics et métagénomiques ont validé ce résultat. Il est intéressant de noter que T. ramosa a déjà été trouvé chez des patients atteints de cancer colorectal et nasopharyngé, ce qui indique son rôle oncogène possible. Dans ce contexte, la culturomique microbienne nous a permis d'isoler des espèces bactériennes viables qui ont pu être utilisées pour d'autres manipulations. Nos résultats suggèrent que la production endogène d'éthanol par E. bolteae pourrait participer à la maladie hépatique liée au VHB. En outre, le rôle de la CPR dans les complications associées au VHB mérite d'être approfondi. Les études futures devraient également se concentrer sur l'élucidation des mécanismes par lesquels T. ramosa pourrait contribuer au carcinome hépatique. Enfin, nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives sur le rôle potentiel du microbiote intestinal dans la physiopathologie de l'ALD et des maladies liées au VHB.

LE DOYEN

Georges LEONETTI

RÉSUMÉ

Les maladies du foie sont responsables d'un fardeau sanitaire mondial de plus en plus lourd. Ces dernières années, des recherches approfondies ont démontré que la dysbiose intestinale est un facteur déterminant qui contribue à la physiopathologie des maladies du foie. Des profils différents du microbiote intestinal ont été observés dans les maladies hépatiques liées à l'alcool (ALD), l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB), ou même ces complications associées telles que la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire (CHC). En effet, la métagénomique a révélé des altérations significatives de la composition du microbiote intestinal chez les patients infectés par le VHB ou en ALD, avec une diminution des *Clostridiales* produisant du butyrate et une augmentation des *Enterobacteriaceae* induisant l'inflammation. Cependant, peu de recherches ont étudié la dysbiose intestinale au niveau des espèces microbiennes. En outre, aucune étude n'a examiné le microbiote intestinal de ces patients à l'aide de l'approche de culturomique.

Par conséquent, dans le présent travail, nous avons d'abord réalisé des études cas-témoins pour étudier le microbiote intestinal chez les patients atteints du VHB et de l'ALD, en utilisant la culturomique et la métagénomique. En outre, nous avons d'abord effectué une analyse systématique de la littérature à l'aide d'outils de recherche assistés par ordinateur afin de décrypter les signatures du microbiote intestinal associées au VHB qui pourraient être utilisées comme biomarqueurs diagnostiques non invasifs à différents stades de la maladie.

Notre analyse qualitative dans la revue nous a permis d'identifier des résultats reproductibles pour un profil de microbiote signature dans les maladies associées au VHB, caractérisé par une augmentation constante de la plupart des membres de - *Pseudomonadota*, *Bacilli*, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Veillonella* et une diminution constante de *Clostridia*, *Lachnospiraceae*, et *Roseburria*. En outre, les espèces de levure *Saccharomyces cerevisae* et *Candida tropicalis* ont été très abondantes. *S. cerevisiae* et *C. tropicalis* produisent toutes les deux de grandes quantités d'éthanol. Ces résultats sont cohérents avec le rôle émergent de la production endogène d'éthanol dans les maladies du foie.

Les caractéristiques de la dysbiose associée au VHB dans notre étude ont révélé un enrichissement dans le genre *Enterocloster* (anciennement *Clostridium*), récemment apparu, dont l'importance dans l'infection par le VHB n'a pas été identifiée. Cependant, la métagénomique n'a pas pu détecter cet enrichissement en raison d'une faible résolution taxonomique. Au niveau des espèces bactériennes, les espèces *Enterocloster bolteae* étaient fortement enrichies avec deux souches produisant une quantité considérable d'éthanol (27 et 200 mM), qui est connue pour être nocive pour le foie. Il est intéressant de noter que les membres du phylum Candidate Phyla Radiation (CPR) non cultivés, tels que les *Candidatus* Saccharibacteria et le phylum *Atribacter*, ont été découverts pour la première fois en relation négative avec l'activité de la prothrombine dans la dysbiose associée au VHB.

En outre, on a constaté pour la première fois que *Thomasclavelia ramosa* (anciennement *Clostridium ramosum*) était très répandu chez les patients atteints d'ALD qui ont développé un CHC. Les approches culturomics et métagénomiques ont validé ce résultat. Il est intéressant de noter que *T. ramosa* a déjà été trouvé chez des patients atteints de cancer colorectal et nasopharyngé, ce qui indique son rôle oncogène possible.

Dans ce contexte, la culturomique microbienne nous a permis d'isoler des espèces bactériennes viables qui ont pu être utilisées pour d'autres manipulations. Nos résultats

suggèrent que la production endogène d'éthanol par *E. bolteae* pourrait participer à la maladie hépatique liée au VHB. En outre, le rôle de la CPR dans les complications associées au VHB mérite d'être approfondi. Les études futures devraient également se concentrer sur l'élucidation des mécanismes par lesquels *T. ramosa* pourrait contribuer au carcinome hépatique.

Enfin, nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives sur le rôle potentiel du microbiote intestinal dans la physiopathologie de l'ALD et des maladies liées au VHB. Ils ouvrent la voie au développement d'options thérapeutiques ciblées sur le microbiome et visant à restaurer un microbiote intestinal sain chez les patients hépatiques, telles que les probiotiques et la transplantation du microbiote fécal.

Mots-clés: Dysbiose, microbiote intestinal, virus de l'hépatite B, maladie hépatique liée à l'alcool, cirrhose, carcinome hépatocellulaire, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Enterocloster bolteae*, *Thomasclavelia ramosa*, *Candidatus* Saccharibacteria, *Candidate Phyla Radiation*, Culturomics, Metagenomics.

ABSTRACT

Liver diseases are responsible for increasing global health burden. In recent years, extensive research has demonstrated that gut dysbiosis is an instrumental factor contributing to the pathophysiology of liver diseases. Different patterns of gut microbiota have been observed in alcohol-related liver disease (ALD), hepatitis B virus (HBV) infection, or even their associated complications such as cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (HCC). Indeed, metagenomics revealed significant alterations in gut microbiota composition in HBV-infected patients or ALD, with a decrease in butyrate-producing *Clostridiales* and an increase in inflammation-inducing *Enterobacteriaceae*. Few research, however, have studied gut dysbiosis at the species level. Furthermore, no study has investigated the gut microbiota in such patients using culturomics approach.

Therefore, in the present work, we first performed case-control studies to investigate gut microbiota in HBV and ALD patients, using culturomics and metagenomics. Moreover, we first performed a systematic literature review using artificial intelligence (AI)-powered research tools to decipher gut microbiota signatures associated with HBV that could be used as non-invasive diagnostic biomarkers in different disease stages.

Our qualitative analysis in the review allowed us to identify reproducible results for a signature microbiota profile in HBV-associated diseases characterized by a consistent increase in most members of *p_Pseudomonadota, c_Bacilli, g_Prevotella, g_Streptococcus, g_Veillonella* and a consistent decrease in *c_Clostridia, f_Lachnospiraceae,* and *g_Roseburria* In addition, *Saccharomyces cerevisae* and *Candida tropicalis* yeast species were highly abundant. Both *S. cerevisiae* and *C. tropicalis* produce high amounts of ethanol. These results are consistent with the emerging role of endogenous ethanol production in liver diseases.

The characteristics of the HBV-associated dysbiosis in our investigation revealed an enrichment in the recently emerging genus *Enterocloster (*formerly *Clostridium)*, whose significance in HBV infection has not been identified. However, metagenomics could not detect this enrichment due to low taxonomic resolution. At the species level, *Enterocloster bolteae* species were highly enriched with *two* strains producing a considerable amount of ethanol (27 and 200 mM), which is known to be harmful to the liver. Interestingly, members of the uncultivated Candidate Phyla Radiation (CPR) phylum, such as *Candidatus* Saccharibacteria and *Atribacter* phylum, were discovered to be adversely connected with prothrombin activity in HBV-associated dysbiosis for the first time.

Furthermore, *Thomasclavelia ramosa* (formerly *Clostridium ramosum*) was found for the first time to be significantly prevalent in patients with ALD who developed HCC. Both culturomics and metagenomic approaches validated this result. Interestingly, *T. ramosa* has already been found in colorectal and nasopharyngeal cancer patients, indicating its possible oncogenic role.

In this context, microbial culturomics helped us isolate viable bacterial species that could be used for further manipulations. Our results suggest that endogenous ethanol production by *E. bolteae* might participate in HBV-related liver disease. Additionally, the role of CPR in HBV-associated complications deserves further investigation. Future

studies should also focus on elucidating the mechanisms by which *T. ramosa* might contribute to liver carcinoma.

Finally, our results provide insight into the potential role of those species in the pathophysiology of ALD and HBV-related disease. This helps pave the way for further development of microbiome-targeted therapeutic options restoring healthy gut microbiota in hepatic patients, such as probiotics and fecal microbiota transplantation.

Keywords: Dysbiosis, Gut microbiota, Hepatitis B virus, Alcohol-related liver disease, Cirrhosis, Hepatocellular carcinoma, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Enterocloster bolteae*, *Thomasclavelia ramosa*, *Candidatus* Saccharibacteria, Candidate Phyla Radiation, Culturomics, Metagenomics.