

Avis de Soutenance

Madame Virginie PILLIOL

Biologie-Santé - Spécialité Maladies Infectieuses

Soutiendra publiquement ses travaux de thèse intitulés

L'isolement par culture des méthanogènes d'intérêt clinique

dirigés par Madame Elodie TERRER

Soutenance prévue le **jeudi 30 mai 2024** à 10h00

Lieu : IHU Méditerranée Infection 19-21 Boulevard Jean Moulin 13005 MARSEILLE

Salle : 8

Composition du jury proposé

| | | |
|----------------------|--------------------------|---------------------|
| Mme Elodie TERRER | Aix-Marseille Université | Directrice de thèse |
| M. Youssef HAÏKEL | Université de Strasbourg | Examineur |
| M. Vincent MEURIC | Université de Rennes | Rapporteur |
| M. Raymond RUIMY | Université Côte d'Azur | Rapporteur |
| M. Michel DRANCOURT | Aix-Marseille Université | Président |
| M. Gérard ABOUDHARAM | Aix-Marseille Université | Invité |

Mots-clés : Archaea, méthanogènes, milieu GG, Methanobrevibacter oralis, Candidatus Methanosphaera massiliense, Methanobrevibacter massiliense

Résumé :

Les Archaea méthanogènes (méthanogènes) sont des micro-organismes appartenant au domaine des Archaea, l'un des trois domaines du vivant à côté des bactéries et des eucaryotes. Les méthanogènes produisent du méthane à partir de différents substrats issus du métabolisme bactérien et sont des acteurs importants des microbiotes humains, présents notamment dans l'intestin et la cavité orale. Elles sont de plus en plus intéressantes d'un point de vue clinique. Elles sont associées à plusieurs pathologies humaines comme les pathologies abcédées ou encore l'endocardite infectieuse. Plus généralement elles sont également impliquées dans les dysbioses. Néanmoins, la culture des méthanogènes demeure complexe en raison de leur sensibilité à l'oxygène et de leurs exigences spécifiques. Les protocoles de culture sont dits fastidieux, et constitue un défi majeur en microbiologie clinique. Ainsi, cette thèse a pour objectif d'améliorer les connaissances sur les méthanogènes d'intérêt clinique par l'optimisation des conditions d'isolement par culture. Une première revue de littérature sur les méthodes de culture microbiennes applicables au microbiote oral a permis de faire le point sur les méthodes de culture des méthanogènes. Une deuxième revue a permis de synthétiser les connaissances sur Methanobrevibacter oralis (M. oralis), la méthanogène la plus fréquemment retrouvée dans la cavité orale. Cette analyse exhaustive a également répertorié les multiples aspects de l'étude des méthanogènes, allant de leur caractérisation phénotypique à leur éventuel rôle pathologique, en passant par leur détection dans les microbiotes passés et présents, ainsi que les associations probables avec d'autres bactéries. Au

niveau expérimental, cette thèse présente le développement d'un nouveau milieu de culture, le milieu GG®, permettant de s'affranchir de l'utilisation de l'hydrogène, gaz dangereux nécessitant des normes de sécurité particulières. Le milieu GG® a ainsi permis la culture et l'isolement d'une nouvelle espèce de méthanogènes, *Candidatus Methanosphaera massiliense*, ainsi que la redécouverte de *Methanobrevibacter massiliense* (*M. massiliense*) en coculture avec la bactérie *Pyramidobacter pisciolens* (*P. pisciolens*) dans une nouvelle situation clinique, la pulpe dentaire infectée. Cette forte association en culture entre *M. massiliense* et *P. pisciolens* nous a conduit à nous intéresser à l'antiquité de cette relation. L'analyse des données métagénomiques provenant de tartres anciens issues d'études antérieures a révélé l'ancienneté et la persistance de cette association. De plus, elle a apporté des informations supplémentaires pour comprendre le déclin de *M. massiliense* au profit de *M. oralis* au moment de la révolution industrielle au 18ème siècle. Ainsi, grâce à l'optimisation de la culture, ce travail de thèse a contribué à élargir le répertoire des méthanogènes cultivées chez l'Homme pouvant avoir un intérêt clinique et à enrichir notre compréhension des dynamiques d'évolution des microbiotes humains à la fois à l'échelle de l'individu mais également à l'échelle de l'histoire humaine.

LE DOYEN

Georges LEONETTI

Résumé

Les *Archaea* méthanogènes (méthanogènes) sont des micro-organismes appartenant au domaine des *Archaea*, l'un des trois domaines du vivant à côté des bactéries et des eucaryotes. Les méthanogènes produisent du méthane à partir de différents substrats issus du métabolisme bactérien et sont des acteurs importants des microbiotes humains, présents notamment dans l'intestin et la cavité orale. Elles sont de plus en plus intéressantes d'un point de vue clinique. Elles sont associées à plusieurs pathologies humaines comme les pathologies abcédées ou encore l'endocardite infectieuse. Plus généralement elles sont également impliquées dans les dysbioses. Néanmoins, la culture des méthanogènes demeure complexe en raison de leur sensibilité à l'oxygène et de leurs exigences spécifiques. Les protocoles de culture sont dits fastidieux, et constitue un défi majeur en microbiologie clinique. Ainsi, cette thèse a pour objectif d'améliorer les connaissances sur les méthanogènes d'intérêt clinique par l'optimisation des conditions d'isolement par culture. Une première revue de littérature sur les méthodes de culture microbiennes applicables au microbiote oral a permis de faire le point sur les méthodes de culture des méthanogènes. Une deuxième revue a permis de synthétiser les connaissances sur *Methanobrevibacter oralis* (*M. oralis*), la méthanogène la plus fréquemment retrouvée dans la cavité orale. Cette analyse exhaustive a également répertorié les multiples aspects de l'étude des méthanogènes, allant de leur caractérisation phénotypique à leur éventuel rôle pathologique, en passant par leur détection dans les microbiotes passés et présents, ainsi que les associations probables avec d'autres bactéries. Au niveau expérimental, cette thèse présente le développement d'un nouveau milieu de culture, le milieu GG®, permettant de s'affranchir de l'utilisation de l'hydrogène, gaz dangereux nécessitant des normes de sécurité particulières. Le milieu GG® a ainsi permis la culture et l'isolement d'une nouvelle espèce de méthanogènes, *Candidatus Methanosphaera massiliense*, ainsi que la redécouverte de *Methanobrevibacter massiliense* (*M. massiliense*) en coculture avec la bactérie *Pyramidobacter piscolens* (*P. piscolens*) dans une nouvelle situation clinique, la pulpe dentaire infectée. Cette forte association en culture entre *M. massiliense* et *P. piscolens* nous a conduit à nous intéresser à l'antiquité de cette relation. L'analyse des données métagénomiques provenant de tartres anciens issues d'études antérieures a révélé l'ancienneté et la persistance de cette association. De plus, elle a apporté des informations supplémentaires pour comprendre le déclin de *M. massiliense* au profit de *M. oralis* au moment de la révolution industrielle au 18^{ème} siècle. Ainsi, grâce à l'optimisation de la culture, ce travail de thèse a contribué à élargir le répertoire des méthanogènes cultivées chez l'Homme pouvant avoir un intérêt clinique et à enrichir notre compréhension des dynamiques d'évolution des microbiotes humains à la fois à l'échelle de l'individu mais également à l'échelle de l'histoire humaine.

Mots clés: *Archaea*, méthanogène, milieu GG, *Methanobrevibacter oralis*, *Candidatus Methanosphaera massiliense*, *Methanobrevibacter massiliense*, *Pyramidobacter piscolens*.

Abstract

Methanogenic *Archaea* (methanogens), belonging to the *Archaea* domain, one of the three domains of life alongside bacteria and eukaryotes, are microorganisms known for their production of methane from various substrates derived from bacterial metabolism. They play crucial roles in human microbiomes, notably in the gut and oral cavity. Increasingly, they are of clinical interest due to their association with various human pathologies such as dysbioses, abscess-related diseases, and infectious endocarditis. However, culturing methanogens remains challenging due to their sensitivity to oxygen and specific requirements, posing a significant hurdle in clinical microbiology protocols. The objective of this thesis is to enhance understanding of clinically relevant methanogens by optimizing isolation conditions through culture techniques. A literature review on microbial culture methods applicable to the oral microbiota provided insights into methanogen culture techniques. Another review synthesized knowledge on *Methanobrevibacter oralis* (*M. oralis*), the most frequently encountered methanogen in the oral cavity. This comprehensive analysis also cataloged various aspects of methanogen study, from phenotypic characterization to potential pathological roles, including their detection in past and present microbiomes and likely associations with other bacteria. Experimentally, this thesis introduced the development of a new culture medium, GG®, eliminating the need for hydrogen, a hazardous gas requiring specific safety standards. GG® medium allowed the culture and isolation of a new methanogen species, *Candidatus Methanosphaera massiliense*, possibly acquired through a carnivorous diet in one individual, as well as the rediscovery of *Methanobrevibacter massiliense* (*M. massiliense*) in co-culture with the bacterium *Pyramidobacter piscolens* (*P. piscolens*) in a new clinical condition, endodontic infection. The strong culture association between *M. massiliense* and *P. piscolens* prompted an investigation into the antiquity of this relationship. Analysis of metagenomic data from ancient tartar, sourced from previous studies, revealed the ancient and persistent nature of this association. Moreover, it provided additional insights into the decline of *M. massiliense* in favor of *M. oralis* during the 18th-century industrial revolution. Thus, through culture optimization, this thesis contributed to expanding the repertoire of methanogens cultivated in humans with potential clinical relevance and enriched our understanding of human microbiome evolution dynamics at both individual and historical scales.

Keywords: Archaea, methanogen, GG medium, *Methanobrevibacter oralis*, *Candidatus Methanosphaera massiliense*, *Methanobrevibacter massiliense*, *Pyramidobacter piscolens*.

