Avis de Soutenance

Madame ORNELLA TCHOUPOU SAHA

Biologie-Santé - Spécialité Maladies Infectieuses

Soutiendra publiquement ses travaux de thèse intitulés

EXPLORATION DU MICROBIOTE RESPIRATOIRE DES PATIENTS COVID-19

dirigés par Monsieur Jean-Christophe LAGIER et Monsieur Didier RAOULT

Thèse soutenue le ***vendredi 08 décembre 2023*** à 16h00
Lieu : 19-21 Bd Jean Moulin, 13005 Marseille
Salle : Amphithéâtre

Composition du jury proposé

M. Jean Christophe LAGIER	Aix-Marseille Université	Directeur de thèse
M. Max MAURIN	Université de Grenoble	Rapporteur
M. Michel CARLES	Université Côte d'Azur	Rapporteur
Mme Laurence CAMOIN	Aix-Marseille Université	Président
M. Didier RAOULT	Aix-Marseille Université	Invité

Mots-clés : Microbiote,nasopharynx,COVID-19,Respiratoire,exploration,

Résumé :

L'existence d'un microbiote respiratoire commensal ou pathogène a été mis en évidence à la suite des avancées technologiques et plus particulièrement de la métagénomique depuis une décennie. Un nombre croissant d'études a montré que le microbiote respiratoire pourrait jouer un rôle important dans l'acquisition ou l'évolution clinique d'une infection respiratoire virale. Cependant, les recherches sur le microbiote respiratoire ce sont accentuées avec un pic de production scientifique en 2020 lors de la pandémie à COVID-19, durant laquelle, plusieurs hypothèses ont été émises sur le lien entre le microbiote respiratoire et l'infection à SARS-CoV-2. De ce fait l'objectif principal de notre thèse, est d'explorer le microbiote respiratoire des patients atteints de COVID-19. Notre premier travail a permis d'identifier les taxons bactériens associés au microbiote respiratoire des patients atteints de COVID-19 par le biais d'une recherche bibliographique. En considérant uniquement les taxa rapportés dans au moins deux études différentes nous avons observé que les bactéries pathogènes principalement enrichis au niveau de l'espèce chez les patients COVID-19 décédés par rapport aux témoins étaient Klebsiella pneumoniae, Streptococcus pneumoniae et Staphylococcus aureus. Par ailleurs le microbiote respiratoire supérieur a été le plus exploré au cours de la pandémie de par la réalisation aisée et systématique de prélèvements nasopharyngés. Malgré le petit nombre d'études concernant le microbiote des voies respiratoires inférieures, S. aureus et Acinetobacter baumannii ont été rapportées comme enrichis chez les patients atteints de COVID-19 par rapport aux témoins. Nous avons dans un second temps dans une étude cas-contrôles utilisé une approche polyphasique combinant PCR en temps réel virale, la métagénomique

shotgun et ciblée, et la PCR bactérienne spécifique, nous avons analysé 120 prélèvements nasopharyngés anonymisés, de patients atteints de COVID-19 à différents stades de la maladie et des sujets contrôles. Nous avons d'abord constaté une diminution des bactéries anaérobies chez les patients atteints de COVID-19 quelle que soit la présentation clinique de l'infection. Ensuite nous avons détecté 9 taxons discriminant les patients positifs au SARS-CoV-2 de ceux qui étaient négatifs notamment Corynebacterium propinquum/pseudodiphtericum, Moraxella catarrhalis, Bacillus massiliamazoniensis, Anaerobacillus alkalidiazotrophicus, Staphylococcus capitis subsp. capitis, et Afipia birgiae par séquençage haut débit, et S. pneumoniae, K. pneumoniae, et Enterococcus faecalis par PCR en temps réel. En concevant une PCR spécifique bactérienne en temps réel nous avons également démontré que C. propinquum est diminué chez les individus asymptomatiques par rapport aux patients positifs au SARS-CoV-2. Nos résultats suggèrent qu'il existe des marqueurs bactériens au niveau du microbiote nasopharyngé associés à l'évolution clinique de l'infection par le SARS-CoV-2. Avec la découverte de nouveaux variants de SARS-CoV-2, nous nous sommes également attachés à identifier les bactéries du microbiote nasopharyngé associées aux différents variants de SARS-CoV-2 observés. Par le séquençage génomique et la PCR en temps réel bactérienne, nous avons observé un enrichissement des bactéries tels que C. propinquum et S. aureus chez les patients COVID-19 quel que soit le variant. Les espèces S. aureus et K. pneumoniae ont été retrouvées enrichi chez les patients infectés par le variant Omicron. Nos résultats montrent que le microbiote nasopharyngé est spécifique en fonction des variants. Enfin, nous avons réalisé une étude épidémiologique collaborative dans laquelle nous avons identifié les différents variants en circulation en Lybie.

LE DOYEN

Georges LEONETTI

Résumé

L'existence d'un microbiote respiratoire commensal ou pathogène a été mis en évidence à la suite des avancées technologiques et plus particulièrement de la métagénomique depuis une décennie. Un nombre croissant d'études a montré que le microbiote respiratoire pourrait jouer un rôle important dans l'acquisition ou l'évolution clinique d'une infection respiratoire virale. Cependant, les recherches sur le microbiote respiratoire ce sont accentuées avec un pic de production scientifique en 2020 lors de la pandémie à COVID-19, durant laquelle, plusieurs hypothèses ont été émises sur le lien entre le microbiote respiratoire et l'infection à SARS-CoV-2. De ce fait l'objectif principal de notre thèse, est d'explorer le microbiote respiratoire des patients atteints de COVID-19. Notre premier travail a permis d'identifier les taxons bactériens associés au microbiote respiratoire des patients atteints de COVID-19 par le biais d'une recherche bibliographique. En considérant uniquement les taxa rapportés dans au moins deux études différentes nous avons observé que les bactéries pathogènes principalement enrichis au niveau de l'espèce chez les patients COVID-19 décédés par rapport aux témoins étaient *Klebsiella pneumoniae, Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*. Par ailleurs le microbiote respiratoire supérieur a été le plus exploré au cours de la pandémie de par la réalisation aisée et systématique de prélèvements nasopharyngés. Malgré le petit nombre d'études concernant le microbiote des voies respiratoires inférieures, *S. aureus* et *Acinetobacter baumannii* ont été rapportées comme enrichis chez les patients atteints de COVID-19 par rapport aux témoins. Nous avons dans un second temps dans une étude cas-contrôles utilisé une approche polyphasique combinant PCR en temps réel virale, la métagénomique shotgun et ciblée, et la PCR bactérienne spécifique, nous avons analysé 120 prélèvements nasopharyngés anonymisés, de patients atteints de COVID-19 à différents stades de la maladie et des sujets contrôles. Nous avons d'abord constaté une diminution des bactéries anaérobies chez les patients atteints de COVID-19 quelle que soit la présentation clinique de l'infection. Ensuite nous avons détecté 9 taxons discriminant les patients positifs au SARS-CoV-2 de ceux qui étaient négatifs notamment *Corynebacterium propinquum/pseudodiphtericum, Moraxella catarrhalis, Bacillus massiliamazoniensis, Anaerobacillus alkalidiazotrophicus, Staphylococcus capitis subsp. capitis,* et *Afipia birgiae* par séquençage haut débit, et *S. pneumoniae, K. pneumoniae*, et *Enterococcus faecalis* par PCR en temps réel. En concevant une PCR spécifique bactérienne en temps réel nous avons également démontré que *C. propinquum* est diminué chez les individus asymptomatiques par rapport aux patients positifs

au SARS-CoV-2. Nos résultats suggèrent qu'il existe des marqueurs bactériens au niveau du microbiote nasopharyngé associés à l'évolution clinique de l'infection par le SARS-CoV-2.
Avec la découverte de nouveaux variants de SARS-CoV-2, nous nous sommes également attachés à identifier les bactéries du microbiote nasopharyngé associées aux différents variants de SARS-CoV-2 observés. Par le séquençage génomique et la PCR en temps réel bactérienne, nous avons observé un enrichissement des bactéries tels que *C. propinquum* et *S. aureus* chez les patients COVID-19 quel que soit le variant. Les espèces *S. aureus et K. pneumoniae* ont été retrouvées enrichi chez les patients infectés par le variant Omicron. Nos résultats montrent que le microbiote nasopharyngé est spécifique en fonction des variants. Enfin, nous avons réalisé une étude épidémiologique collaborative dans laquelle nous avons identifié les différents variants en circulation en Lybie.

Mots clés : Microbiote respiratoire ; microbiote nasopharyngé ; Variants ; COVID-19 ; Séquençage de l'ARNr 16S; SARS-CoV-2; métagénomique; PCR temps réel.

Abstract

The existence of a commensal or pathogenic respiratory microbiota has been highlighted over the past decade by technological advances, particularly in metagenomics. A growing number of studies have shown that the respiratory microbiota could play an important role in the acquisition or clinical evolution of a viral respiratory infection. However, research into the respiratory microbiota has intensified, with a peak in scientific production in 2020 during the COVID-19 pandemic, during which several hypotheses were put forward concerning the link between the respiratory microbiota and SARS-CoV-2 infection. The main aim of our thesis is therefore to explore the respiratory microbiota of patients suffering from COVID-19. Our first task was to identify the bacterial taxa associated with the respiratory microbiota of COVID-19 patients by means of a literature search. Considering only taxa reported in at least two different studies, we observed that the pathogenic bacteria mainly enriched at species level in deceased COVID-19 patients compared to controls were *Klebsiella pneumoniae, Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*. Moreover, the upper respiratory microbiota was the most extensively explored during the pandemic, thanks to the ease and systematicity of nasopharyngeal sampling. Despite the small number of studies concerning the lower respiratory tract microbiota, *S. aureus* and *Acinetobacter baumannii* were reported to be enriched in COVID-19 patients compared with controls. In a second case-control study using a polyphasic approach combining viral real-time PCR, shotgun and targeted metagenomics, and specific bacterial PCR, we analyzed 120 anonymized nasopharyngeal swabs from COVID-19 patients at different stages of the disease and control subjects. Firstly, we observed a decrease in anaerobic bacteria in COVID-19 patients, irrespective of the clinical presentation of the infection. Then we detected 9 taxa discriminating SARS-CoV-2 positive patients from those who were negative, including *Corynebacterium propinquum/pseudodiphtericum, Moraxella catarrhalis, Bacillus massiliamazoniensis, Anaerobacillus alkalidiazotrophicus, Staphylococcus capitis subsp. capitis,* and *Afipia birgiae* by high-throughput sequencing, and *S. pneumoniae, K. pneumoniae,* and *Enterococcus faecalis* by real-time PCR. By designing a bacterial-specific real-time PCR we also demonstrated that *C. propinquum* is decreased in asymptomatic individuals compared to SARS-CoV-2 positive patients. Our results suggest that there are bacterial markers in the nasopharyngeal microbiota associated with the clinical course of SARS-CoV-2 infection.

With the discovery of new SARS-CoV-2 variants, we also set out to identify the bacteria in the nasopharyngeal microbiota associated with the different SARS-CoV-2 variants observed.

Through genomic sequencing and bacterial real-time PCR, we observed an enrichment of bacteria such as *C. propinquum* and *S. aureus* in COVID-19 patients, whatever the variant. *S. aureus* and *K. pneumoniae* species were found enriched in patients infected with the Omicron variant. Our results show that the nasopharyngeal microbiota is variant-specific. Finally, we carried out a collaborative epidemiological study in which we identified the different variants circulating in Libya.

Keywords: Respiratory microbiota; nasopharyngeal microbiota; Variants; COVID-19; 16S rRNA sequencing; SARS-CoV-2; metagenomics; real-time PCR.