

## Titre : Microbiote respiratoire en réanimation : Evolution et facteur de risque de PAVM

**Résumé:** Le microbiote pulmonaire, incluant notamment l'étude des populations bactériennes, virales et fongiques, a davantage été exploré dans le cadre des pathologies pulmonaires chroniques que dans le domaine des soins intensifs. Les quelques études descriptives réalisées chez les patients ventilés de réanimation se sont focalisées sur le microbiote bactérien. Malgré ces travaux, de nombreuses incertitudes méthodologiques persistent. Nous avons réalisé une série de travaux à partir d'une cohorte prospective de patients inclus au sein du service de Médecine Intensive et Réanimation (Hôpital Louis Mourier, Colombes).

Une première étude méthodologique visait à comparer deux méthodes d'analyse basées sur l'extraction automatisée des acides nucléiques puis le séquençage de la région hypervariable V4 de l'ADNr16S à l'aide de deux couples d'amorces publiées 515F-806R « S-V4 » pour « Stringent-V4 » et « R-V4 » pour « Relax-V4 ». Vingt-quatre échantillons chez 7 patients dont 3 patients avec une PAVM ont été analysés. L'analyse de concordance des résultats obtenus par séquençage par rapport à la microbiologie conventionnelle a validé le couple d'amorces S-V4 avec une concordance de 89 % contre 44% pour R-V4, soulignant l'importance du choix des amorces.

Une étude de faisabilité de l'analyse du virome a été conduite sur les échantillons de 9 patients dont 3 ayant développés une PAVM en utilisant la même technique d'extraction et la plateforme Illumina NextSeq 500®. Les techniques conventionnelles d'amplification par PCR ciblée étaient réalisées en parallèle. Le séquençage à haut débit a permis d'identifier 11 familles virales, associant bactériophages et virus à eucaryotes, les plus représentées étant celle des *Paramyxoviridae*, *Herpesviridae* et les *Orthomyxoviridae*. Les 3 espèces virales identifiées par PCR conventionnelles et multiplex étaient retrouvées par séquençage. Des bactériophages et d'autres virus eucaryotes non identifiés par PCR multiplex étaient identifiés. Le virome respiratoire peut donc être analysé par séquençage à haut débit sur des échantillons compatibles pour une analyse de l'ADNr16s.

Enfin une étude prospective « cas-témoins » a inclus 19 patients PAVM et 19 contrôles appariés sur 8 facteurs ayant un impact connu sur le microbiote bactérien pulmonaire. Elle a permis de mettre en évidence 281 operational taxonomic unit (OTU) au sein de 293 échantillons répartis selon 4 *phyla* majoritaires *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*. Les facteurs associés à la variabilité dans la composition du microbiote pulmonaire ont été étudiés (PERMANOVA). Les principales causes d'hétérogénéité retrouvées étaient le patient, la durée de ventilation mécanique et la survenue d'une PAVM ( $p < 0,001$ ). A J-0 la diversité des microbiotes pulmonaires et pharyngés était similaire chez les patients PAVM et contrôles. Le *phylum* des *Bacteroidetes* et la classe des *Bacteroidia* était davantage représenté chez les patients PAVM (respectivement  $p = 0,017$  et  $p = 0,018$ ).

L'étude dynamique réalisée a mis en évidence une décroissance globale de la diversité alpha des microbiotes oropharyngés et pulmonaires au cours de la ventilation mécanique ( $p < 0,001$  dans les deux cas).

Il existait une corrélation positive très significative entre l'évolution des microbiotes pulmonaires et oropharyngés pour la diversité  $\alpha$  ( $r = 0,87$  (0,42 ; 1),  $p < 0,001$ ), l'abondance relative des *Bacilli* ( $r = 0,91$  (0,77 ; 1),  $p < 0,001$ ) et des *Bacteroidia* ( $r = 0,99$  (0,94 ; 1),  $p < 0,001$ ).

Chez les patients PAVM, l'évolution de l'abondance relative des *Bacilli* était marquée par une décroissance significativement plus rapide dans l'oropharynx ( $p = 0,049$ ) tandis que celle de l'abondance relative des *Bacteroidia* était marquée par une augmentation plus rapide au niveau pulmonaire ( $p = 0,025$ ).

L'abondance relative initiale des *Bacteroidia*, une baisse rapide des *Bacilli* au sein de l'oropharynx ainsi qu'une augmentation rapide des *Bacteroidia* au sein des aspirations trachéales pourraient donc constituer des marqueurs précoces de l'apparition d'une PAVM.

L'étude du microbiote pulmonaire en réanimation est encore à ses débuts. On peut néanmoins anticiper sa pertinence pour améliorer les critères diagnostiques des PAVM et identifier les patients à risque, dans un objectif de développer de nouvelles techniques préventives ou curatives.

**Mots clefs :** microbiote pulmonaire, virome pulmonaire, ADNr 16S, métagenomique clinique, pneumopathie acquise sous ventilation mécanique, séquençage à haut débit, pneumonie

**Title: Lung microbiome in critical care: evolution and risk factors of VAP**

**Abstract:** The lung microbiota, including the study of bacterial, viral and fungal populations, has been mostly explored in the context of chronic lung diseases. The few descriptive studies carried out in ventilated patients have mainly focused on the bacterial microbiota. Despite these works, many methodological uncertainties persist for the analysis of the pulmonary microbiota. We have carried out a series of studies based on a prospective cohort of patients included in the intensive care unit at Louis Mourier hospital in Colombes, France.

A first methodological study aimed to compare two methods based on the automated extraction of nucleic acids then the sequencing of the V4 hypervariable region of 16S rDNA using two pairs of primers 515F-806R "S- V4" for "Stringent-V4" and "R-V4" for "Relax-V4" whose sequence differed by only one base. Twenty-four samples from seven patients including three patients with a ventilator-associated pneumonia (VAP) were analyzed. The concordance of the results obtained by sequencing and by conventional microbiology validated the primer pair "S-V4" with a concordance of 89% versus 44% for R-V4, highlighting the importance of the primers choice.

A pilot study of virome analysis was conducted on samples from nine patients, including three who developed a VAP, using the same extraction technique and the Illumina NextSeq 500 platform. Conventional targeted PCR amplification techniques were performed in parallel. High throughput sequencing has identified 11 viral families, associating bacteriophages and eukaryotic viruses, the most represented being that of *Paramyxoviridae*, *Herpesviridae* and *Orthomyxoviridae*. The three viral species identified by conventional PCR and multiplex PCR in five patients were all found by high-throughput sequencing. Bacteriophages and other eukaryotic viruses, not identified by multiplex PCR, were also identified by Illumina sequencing. These results confirmed the possibility of analyzing the respiratory virome by high-throughput sequencing on samples adapted for 16s rDNA sequencing.

Finally, a prospective "case-control" study included 19 VAP patients and 19 controls matched on eight factors having a known impact on the lung bacterial microbiota. We identified 281 *taxa* or operational taxonomic unit (OTU) in 293 samples distributed in four predominant phyla: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*. The factors associated with the occurrence of VAP in the initial composition of the lung microbiota were investigated using a PERMANOVA analysis. The main causes of *microbiota* heterogeneity were the patient, the duration of mechanical ventilation, and the occurrence of VAP ( $p < 0.001$ ). On D-0, the diversity of the pulmonary and pharyngeal microbiota was similar in the VAP and control patients. The *Bacteroidetes* phylum and the *Bacteroidia* class were more represented in VAP patients ( $p = 0,017$  and  $p=0,018$  respectively).

The dynamic study demonstrated a decrease in the evolution of the alpha diversity of the oropharyngeal and the lung microbiota during mechanical ventilation.

There was a highly significant positive correlation between changes in lung and oropharyngeal *microbiota* for diversity ( $r=0.87$  (0.42 ;1),  $p < 0.001$ ), relative abundance of *Bacilli* ( $r=0.91$  (0.77 ;1),  $p < 0.001$ ) and *Bacteroidia* ( $r=0.99$  (0.94;1),  $p < 0.001$ )

For VAP patients the evolution of the relative abundance of *Bacilli* was marked by a significantly faster decrease in the oropharynx ( $p = 0,049$ ) whereas these of the *Bacteroidia* was marked by a significantly faster increase in the lungs ( $p=0,025$ ).

The initial relative abundance of *Bacteroidia*, the evolution of *Bacilli* within the oropharynx as well as the evolution of *Bacteroidia* within the lungs could therefore constitute early markers of the onset of VAP.

The study of the lung *microbiota* in intensive care is still in its infancy. We can nevertheless anticipate its relevance for improving the diagnostic criteria of VAP and identifying at-risk patients, with the aim of developing new preventive or curative therapies.

**Key words:** lung microbiome, lung virome, 16SrDNA, clinical metagenomics, shotgunsequencing, ventilator-associated pneumonia, high-throughput sequencing, pneumonia