



HAL
open science

Caractérisation du microbiome respiratoire et de la diversité génomique virale au cours des formes de grippes sévères

Maxime Pichon

► **To cite this version:**

Maxime Pichon. Caractérisation du microbiome respiratoire et de la diversité génomique virale au cours des formes de grippes sévères. Virologie. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1271 . tel-03042137

HAL Id: tel-03042137

<https://theses.hal.science/tel-03042137v1>

Submitted on 6 Dec 2020

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.



N° D'ordre NNT 2018LYSE1271

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale 341

Évolution Écosystèmes Microbiologie Modélisation

Spécialité de doctorat

Discipline Physiologie, interaction et biologie des organismes

Soutenue publiquement le **5.12.2018**, par
Maxime, Jean, Michel PICHON

Caractérisation du microbiome respiratoire et de la diversité génomique virale au cours des formes de grippes sévères

Devant le jury composé de

Pr Astrid Vabret PU-PH (U2RM - EA 4655)	Présidente
Dr Mustapha Si-Tahar DR2 (CEPR - U1100)	Rapporteur
Dr Sylvie Pillet MCU- PH (GIMAP - EA3064)	Rapporteur
Pr Florence Ader PU-PH (CIRI- U1111)	Examineur
Dr Jean Claude Manuguerra (Institut Pasteur)	Examineur
Pr Bruno Lina PU-PH (CIRI - U1111)	Directeur de thèse
Dr Laurence Josset MCU- PH (CIRI - U1111)	Examineur
	Co-directrice de thèse
	Examineur

Unité de recherche :

Laboratoire de Virologie et Pathologies humaines – VirPath
CIRI - Centre International de Recherche en Infectiologie
- Inserm U1111 - CNRS UMR 5308 - ENS de Lyon - UCBL1
Faculté de médecine RTH Laennec
7-11, rue Guillaume Paradin - 69372 Lyon cedex 08

Résumé

La grippe est une infection respiratoire responsable de complications respiratoires ou neurologiques et nécessitant une prise en charge rapide et adaptée. L'émergence des technologies de séquençage à haut débit (NGS) permet l'étude des communautés microbiennes résidentes ainsi qu'une étude approfondie du génome des pathogènes impliqués. Cette thèse a pour objectif de caractériser le microbiome respiratoire et la diversité génomique virale des patients infectés par les virus grippaux, en corrélant les données clinicobiologiques recueillies. Après recueil des prélèvements respiratoires d'enfants hospitalisés entre 2010 et 2014, le séquençage de leur microbiome respiratoire a mis en évidence une augmentation de la diversité microbienne ainsi qu'une signature microbienne différentielle entre formes cliniques. Une répartition différentielle de taxons (OTU) permet la prédiction de complications chez les enfants infectés. L'étude d'échantillons respiratoires de patients adultes permettra de compléter la signature prédictive. Après validation des processus analytiques et bio-informatiques par reconstitution artificielles de quasi espèces et recueil de 125 prélèvements cliniques respiratoires, le séquençage du génome entier par NGS des virus grippaux permet de différencier les diversités initiales en fonction de la nature du virus infectant et de la complication. En comparaison du prélèvement initial précoce les échantillons prélevés successivement mettent en évidence une diversification différentielle entre les différents segments des virus grippaux infectant les patients, que ce soit chez les patients immunocompétents ou chez un patient immunodéprimé à l'excrétion prolongé.

Mots clés : Grippe, Microbiome respiratoire, Virome respiratoire, Séquençage 16S, Séquençage profond (UDS), NGS, Virus influenza, Diversification virale, Quasi-espèces

Title (Anglais): Respiratory microbiome and viral genomic diversity: characterization in severe forms of influenza diseases**Abstract (Anglais)**

Influenza is a respiratory infection responsible for respiratory or neurological complications and require rapid and adapted management. The emergence of next-generation sequencing (NGS) allows the study of resident microbial communities as well as an in-depth study of the genome of the pathogens. This thesis aimed to characterize the respiratory microbiome and the viral genomic diversity of influenza virus infected patients, correlating these data to the collected clinical data.

After sampling of respiratory specimens from hospitalized children between 2010 and 2014, the sequencing of their respiratory microbiome revealed an increase in microbial diversity and a differential microbial signature between clinical forms. A differential taxon distribution (OTU) allows the prediction of complications in infected children. The study of adult respiratory samples will complete the predictive signature.

After validation of the analytical and bioinformatic processes by artificial reconstitution of quasi-species and collection of 125 respiratory clinical specimens, the sequencing of the whole genome by NGS of the influenza viruses allow to differentiate the initial diversities according to the nature of the infecting virus and the complication. Compared to early samples, specimen sampled successively show a differential diversification between the different segments of influenza viruses, whether in immunocompetent patients or in an immunocompromised patient with prolonged excretion.

Keywords (Anglais): *Influenza*, Influenzavirus, Respiratory microbiome, Respiratory virome, 16S sequencing, viral diversity, quasispecies analysis

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G. RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E. PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Aux membres de mon jury :

- **À Madame le Professeur Astrid VABRET**, vous me faites l'honneur de présider mon jury, recevez ici mes plus sincères remerciements
- **À Madame le Docteur Sylvie PILLET et à Monsieur le Docteur Mustapha SI-TAHAR** vous avez accepté d'être rapporteurs de mon travail et je vous en remercie.
- **À Madame le Professeur Florence ADER et à Monsieur le Docteur Jean Claude MANUGUERRA**, je vous remercie d'avoir accepté d'examiner ce travail de thèse.
- **À mes directeurs de thèses, Monsieur le Professeur Bruno LINA et Madame le Docteur Laurence JOSSET**, j'ai eu le plaisir de travailler avec vous ces quelques années d'internat et de thèse. Votre rigueur et votre passion de la microbiologie auront été un exemple pour moi, je vous remercie pour vos commentaires constructifs et bienveillants.

-
- **À mes parents, à mon frère, à mes grands-parents**, vous êtes un soutien de tous les instants, recevez ici tous mes remerciements. Cette thèse n'est qu'un reflet de mon amour.
 - **À ma famille : Frédérique, Antoine, Philippe, Elisabeth, Aliénor, Bruno, Maya, Willy, François, Anne, Julien, Marion, Élisabeth, Pascal, Marie-Charlotte, Valentin, Tessa**, cette thèse finie j'espère avoir le temps de vous voir encore plus souvent. Merci pour tout!
 - **À mes amis et collègues : Alexandre, Antonin, Bruno, Camille, Dimitri, Gregory, Guilhem, Lauriane, Marina, Mathilde, Mick, Mich, Pauline, Yann**. Cette liste alphabétique n'est en rien une liste d'ordre de préférence, je vous aime tous et vous me manquez !
 - **Aux techniciens et secrétaires des laboratoires : Gwendolyne, Clio, Rémi, Delphine, Nathalie, Sylvie, Murielle, Mendy, Fanny, Marie Claire et Solange**. Je ne suis loin des laboratoires lyonnais que depuis peu de temps mais les choses ne sont plus pareilles. Merci pour ce que vous êtes!
 - **Aux biologistes Lyonnais, qui de collègues sont devenus des amis : Martine, Isabelle, Jean-Sébastien, Yahia, Vanessa, Émilie, Michèle, Damien**, votre enthousiasme m'a porté ces quelques années et fait de moi un microbiologiste émérite (du moins je l'espère)
 - **À Poitiers, merci de votre soutien et de votre accueil : Christophe, Chloé, Anthony, Lauranne Julie et les autres !** En peu de temps j'ai l'impression d'être de la famille, merci pour votre soutien indéfectible (en toute circonstance et dans toutes mes galères).
 - **À Ludivine**, cette thèse n'est rien en comparaison de tout ce qui nous attend. Mon amour pour toi grandit de jour en jour (même si je vais avoir à te partager...)
 - **À Mamie Crine, À Jean Michel**, j'espère que vous êtes fiers de moi et que vous veillez sur moi de là où vous êtes... Toute cette thèse vous est dédiée!

Table des Matières

Remerciements	5
Table des Matières	6
Liste des Figures	9
Liste des Tableaux	10
Liste des annexes	11
Liste des abréviations.....	12
Partie A. Étude Bibliographique	14
Chapitre 1. La grippe : une maladie polymorphe.....	15
Introduction	15
Article publié	15
Conclusion	15
Chapitre 2 Le microbiome respiratoire : une flore résidente	16
Introduction	16
1. Caractérisation et étude du microbiote respiratoire bactérien	17
2. Caractéristiques du microbiome respiratoire sain	21
3. Impact du microbiote respiratoire bactérien dans la pathogénèse des maladies virales respiratoires	24
3.1. Notions importantes sur le microbiote bactérien dans les études de pathologies	24
3.2. Impact direct	28
3.3. Impact indirect	28
4. Impact clinique du microbiome respiratoire	32
4.1. Utilisation thérapeutique dans le cadre de la prise en charge des infections virales	32
4.2. Utilisation en biomarqueurs	36
Conclusions	37
Chapitre 3 La diversification virale facteur évolutif ou péjoratif ?	39
Introduction	39
1. Diversité et évolution des technologies de séquençage.....	41
2. Mesure de la diversité génomique	44
3. Conséquences phénotypiques de la diversification génomique virale sur la virulence des infections virales.....	46
3.1. La diversification génomique virale comme facteur de virulence	46
3.2. La diversification génomique virale limitant la virulence	47

4. La diversification génomique des virus respiratoires.....	50
Conclusion	52
Projet de Thèse.....	53
Partie B. Résultats	54
Chapitre 1. Microbiome respiratoires des populations pédiatriques un marqueur prédictif de l'évolution péjorative ?.....	55
1. Objectif.....	55
2. Article publié	55
Chapitre 2. Le microbiome respiratoire des adultes est-il utile dans la maladie grippale ?.....	76
1. Objectif.....	76
2. Méthodes	76
2.1. Sélection des patients	76
2.2. Préparation des librairies et séquençage.....	77
2.3. Analyse bio-informatique et statistique.....	77
2.4. Considération éthique.....	77
3. Résultats préliminaires.....	77
4. Conclusion	79
Chapitre 3. Les populations minoritaires détectées par Séquençage à haut débit sont-elles détectables par PCR digitale avec des performances satisfaisantes ?.....	80
1. Objectif.....	80
2. Article publié	80
Chapitre 4. Diversification des populations virales minoritaires au cours de l'évolution de la maladie grippale facteur de gravité ou facteur d'extinction ?	89
1. Objectif.....	89
2. Article soumis.....	89
Chapitre 5. La diversité des populations virales minoritaires au temps précoce de la maladie : un facteur prédisposant aux formes graves ou aux échecs vaccinaux chez l'hôte sans facteur de risque prédisposant ?.....	128
1. Objectifs	128
2. Article en préparation	128
3. Article soumis.....	156
Chapitre 6. Existe-t-il des différences de diversité génomique virale minoritaire à l'état de base ou au cours de la diversification chez les hôtes à risque de formes graves ?.....	172
1. Objectif.....	172
2. Article	172
Partie C. Conclusion.....	182

1.	Propos général	183
2.	Le microbiome respiratoire dans la maladie grippale : impact et prise en compte	184
2.1.	Microbiome respiratoire et population pédiatrique : une preuve de concept	185
2.2.	Microbiome respiratoire et population adulte : une standardisation complexe	188
2.3.	Futures études à mettre en place dans le cadre de l'étude du microbiome respiratoire grippal	190
3.	Diversité génomique virale : impact d'un marqueur viral intrinsèque	191
3.1.	Technologies de PCR digitale et quantification des sous-populations résistantes	191
3.2.	La diversité initiale du génome viral : description précise dans le cadre d'une excrétion longue de l'immunodéprimé.....	194
3.3.	La diversification génomique virale : un paramètre de virulence ?.....	196
3.4.	La diversité initiale du génome viral : une discrimination possible des souches virulentes ?	200
4.	Conclusion générale	204
	Partie D. Bibliographie.....	207
	Partie E. Annexes	223
	Annexe A. PICHON M., Gaymard A., Bouscambert-Duchamp M. Lina B. [<i>Orthomyxoviridae</i>]. Traité de Virologie Médicale, 2 nd Edition.....	224
	Annexe B. PICHON M., Lina B., Josset L. [Caractérisations et impact du microbiome bactérien respiratoire sur les maladies virales] Virologie 2018, 22 (3) : 161-72.....	254
	Annexe C. PICHON M., Lina B., Josset L. Impact of the microbiome on host responses to respiratory viral infection. Vaccines 5, 40; November 11, 2017	268
	Annexe D. PICHON M., Pellisier R., Valette M., Lina B., Josset L. [Biodiversité génomique virale : évaluation et conséquences sur la virulence des infections respiratoires.] Virologie. 2018, 22 (3): 173-8.....	283
	Annexe E. Brevet. Inventeurs: PICHON M., Josset L., Lina B., Katze M., Langevin S.; Université Lyon 1 – HCL; Titre: [Biomarkers for early determination of severity of influenza related disease] Application number: 15306499.3-1405; Date 18.12.2015.....	294
	Annexe F. Listes des publications acceptés, soumises, des communications orales et affichées et des activités d'expertise au cours des années de thèse du candidat (hors travaux de thèse).	295

Liste des Figures

Figure 1. Structure secondaire de l'ARN 16S d'<i>Escherichia coli</i>.	19
Figure 2. Évolution des données bibliométriques portant sur le microbiome respiratoire de 2000 à 2017.	22
Figure 3. Répartition des publications scientifiques concernant les microbiomes par site anatomique en fonction de la niche écologique (A) ou en fonction des différentes composantes (B).	26
Figure 4. Interaction du système immunitaire et du microbiote respiratoire bactérien au cours d'une infection respiratoire virale.	27
Figure 5. Effet histologique de l'antibiothérapie préalable à une infection respiratoire virale.	30
Figure 6. Impact de la déplétion des microbiomes sur la voie TLR-7.	31
Figure 7. Approche intégrative des maladies infectieuses.	38
Figure 8. Principe de diversification génomique virale.	40
Figure 9. Point de définition.	41
Figure 10. Données bibliométriques des publications portant sur la diversité virale (1980-2018).	42
Figure 11. Pouvoir discriminant de l'étude phylogénique (Neighbor-Joining, NJ) des méthodes de séquençage historiques (A) et de nouvelle génération (B).	43
Figure 12. Impact clinique de la diversification génomique virale. A/ Processus analytiques ; B/ Comparaison des souches sauvages et des souches à polymérase à fidélité augmentée ; C/ Comparaison des souches sauvages et des souches à polymérase mutée artificiellement diversifiés (G64SeQs).	48

Liste des Tableaux

Tableau 1. Amorces du gène codant l'ARN 16S bactérien.....	20
Tableau 2. Espèces bactériennes dominant le microbiome bactérien respiratoire.	23
Tableau 3. Bactérie du microbiome respiratoire impliquée ou modifiée au cours d'une infection virale.....	33
Tableau 4. Estimateurs mathématiques de la diversité génomique.....	46
Tableau 5. Caractéristiques démographiques et cliniques à l'inclusion, évolution clinique et thérapeutique des patients inclus.....	78

Liste des annexes

Annexe A. PICHON M., Gaymard A., Bouscambert-Duchamp M. Lina B. [Orthomyxoviridae]. Traité de Virologie Médicale, 2nd Edition.

Annexe B. PICHON M., Lina B., Josset L. [Caractérisations et impact du microbiome bactérien respiratoire sur les maladies virales] Virologie 2018, 22 (3) : 161-72

Annexe C. PICHON M., Lina B., Josset L. Impact of the microbiome on host responses to respiratory viral infection. Vaccines 5, 40; November 11, 2017

Annexe D. PICHON M., Pellisier R., Valette M., Lina B., Josset L. [Biodiversité génomique virale : évaluation et conséquences sur la virulence des infections respiratoires.] Virologie. 2018, 22 (3) : 173-82

Annexe E. Brevet : Inventeurs: PICHON M., Josset L., Lina B., Katze M., Langevin S.; Université Lyon 1 – HCL; Titre: [Biomarkers for early determination of severity of influenza related disease] Application number: 15306499.3-1405; Date 18.12.2015

Annexe F. Listes des publications acceptés, soumises, des communications orales et affichées et des activités de reviewing au cours des années de these du candidat (hors travaux de thèse).

Liste des abréviations

Sigle	Signification
ADN	Acide DésoxyRibonucléique
ARN	Acide RiboNucléique
ARN 16S	Acide Ribonucléique ribosomal de la sous unité 16S
BPCO	Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive
CD	Cluster de Différentiation
CLIN	Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales
CNR	Centre National de Référence
Ct	Cycle seuil (Cycle Threshold)
ddPCR	Réaction en Chaîne de polymérisation en gouttelette digitale (Digital Droplet Polymerase Chain Reaction)
DGGE	Électrophorèse sur gel à gradient de dénaturation (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
DICS	Déficit Immunitaire Combiné Sévère
ECDC	Centre Européen de Contrôle des maladies (European Centre for Disease Control)
Gp120	Glycoprotéine 120 du VIH
HA	Hémagglutinine
HCL	Hospices Civils de Lyon
HMP	Projet Microbiome Humain (Human Microbiome Project)
IAV	Virus Influenza de type A
IBV	Virus Influenza de type B
ICV	Virus Influenza de type C
IC50	Concentration inhibant 50% de la cible
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukines
INA	Inhibiteurs de la Neuraminidase
ITS	Espace transcrit interne (Internal Transcribed Spacer)
Jx	Jour du prélèvement X ^e jour
LBA	Lavage Broncho-Alvéolaire
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
LPS	Lipopolysaccharides

M1	Protéine de Matrice 1
M2	Protéine de Matrice 2
MDCK	Type cellulaire de Rein de Chien (Madin-Darby Canine Kidney)
NG	Écouvillon Nez-Gorge
NJ	Neighbors Joining
NP	Nucléoprotéine
NS1	Protéine Non-Structurale 1
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OTU	Taxon (Operational Taxonomic Units)
NA	Neuraminidase
NG	Écouvillonnage Nez-Gorge
NGS	Next-Generation Sequencing (Séquençage de Nouvelle-Génération)
PA	Protéine Acide
PAMPS	Motifs moléculaires associés aux pathogènes (Pathogen Associated Molecular Patterns)
PB	Protéine accrochée à la Polymérase (Polymerase Binding protein)
PB1	Protéine Basique 1
PB2	Protéine Basique 2
PCR	Réaction en Chaîne de polymérisation (Polymerase Chain Reaction)
PFU	Plaque Forming Unit (Unité Formant Plaque)
PRISM III	Risque Pédiatrique de Mortalité 3 ^e version (Pediatric Risk of Mortality III)
RT	Rétro transcription
SDRA	Syndrome de Détresse Respiratoire Aigüe
SNV	Variant à Nucléotide Unique (Single Nucleotide Variant)
SPF	Exempt de Pathogène Spécifique (Specific Pathogène Free)
TROD	Test Rapide d'Orientation Diagnostic
TNF	Facteur de Nécrose Tumorale (Tumoral Necrosis Factor)
Vx	Région Variable
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VRS	Virus Respiratoire Syncytial
VSV	Virus de la stomatite vésiculeuse
WT	Sauvage (Wild-type)

Partie A. Étude Bibliographique

Chapitre 1. La grippe : une maladie polymorphe

Introduction

Cette partie de l'étude bibliographique a pour objectif de décrire les aspects de virologie conventionnelle, de physiopathologie, de diagnostic et de thérapeutique permettant d'appréhender la problématique de ce travail de thèse.

Article publié

Cette section comporte des éléments adaptés de la publication suivante (Annexe A) :

**Gaymard A., PICHON M., Bouscambert-Duchamp M., Lina B. [Virus Influenzae]
Traité de virologie 2e édition**

Conclusion

Au vu des différentes caractéristiques et problématiques cliniques liées à la maladie grippale, il est évident que de nouvelles pistes de recherche sont nécessaires. C'est dans ce contexte que l'étude de la diversité virale semble prometteuse pour le développement de nouvelles stratégies préventives ou thérapeutiques.

Chapitre 2 Le microbiome respiratoire : une flore résidente

Cette section comporte des éléments adaptés des deux publications suivantes (Annexes B et C) : **Pichon M., Lina B., Josset L. Caractérisations et impact du microbiome bactérien respiratoire sur les maladies virales. *Virologie* 2018, 22 (3): 161-72** et **Pichon M., Lina B., Josset L. Impact of the microbiome on host responses to respiratory viral infection. *Vaccines* 5, 40 ; Novembre 11, 2017**

Introduction

L'ensemble des micro-organismes présents dans une niche écologique, dénommé « microbiote », recoupe la notion historique de « flore » bactérienne. Malgré la présence de nombreuses publications ayant trait à ce sujet, sa définition reste controversée depuis la première publication par Lederberg *et al.* en 2001 (81). D'un point de vue génomique, le « microbiome » peut se réduire à l'ensemble des génomes du microbiote, mais d'un point de vue écologique, plus large, il correspond à l'ensemble de cette même niche et inclue microorganismes (bactériens, viraux, parasitaires, *archaea*, ...) et facteurs environnementaux de l'habitat considéré (cellules immunitaires, protéases cellulaires, chimiokines, *etc.*). Traditionnellement caractérisé par culture (peu sensible et chronophage), les études du microbiote ont bénéficié de la démocratisation des méthodes de séquençages à haut débit (NGS) des gènes codant l'ARNr16S permettant de définir plus finement sa composition. Ses hautes performances ont permis de définir le microbiote des organes, tractus ou enveloppes de façon très précise qualitativement et quantitativement (82).

L'émergence des méthodes de NGS, produisant une quantité considérable de données par échantillon, autorise la mise en place d'études de grande ampleur comme le Projet Microbiome Humain (*Human Microbiome Project –HMP-*). Ce projet a permis des avancées considérables dans la caractérisation des microbiomes humains, bien que de nombreuses questions restent sans réponse. Alors que certains auteurs depuis les années 1970, évaluaient quantitativement le microbiome à 10 fois le nombre de cellules

d'un individu (soit 10^{14} par individu), certaines études récentes l'amènent à être en nombre équivalent aux cellules eucaryotes (83).

De même que l'ensemble des microbiomes décrits chez l'humain, la composition (et le rôle physiologique, de participation au système immunitaire par exemple) du microbiome respiratoire est de mieux en mieux définie (84). Agissant comme une véritable barrière biologique, une communauté microbienne intègre semble nécessaire pour le maintien de fonctions respiratoires normales, protégeant l'individu de colonisations ou d'invasions par des pathogènes externes.

Bien que la plupart des études aient décrit le microbiote bactérien, il est important de considérer que les parties fongique (mycobiome), *archaea* et virale (virome) en sont des constituants, en proportion, bien plus importants (83,85). Vu qu'aucune étude ne décrit précisément le rôle et la composition des viromes et mycobiomes respiratoires au cours des infections respiratoires aiguës, nous allons principalement nous focaliser sur le rôle du microbiote bactérien dans les infections respiratoires virales dans cette étude bibliographique.

1. Caractérisation et étude du microbiote respiratoire bactérien

Au contraire des niches écologiques comme le tractus digestif, historiquement identifié comme porteur d'une véritable flore bactérienne, le tractus respiratoire bas a longtemps été considéré comme stérile chez les individus sains. Cet état de fait s'explique principalement par les limites techniques des méthodes de cultures (dites « classiques »), ne permettant pas l'isolement de bactérie de culture difficiles ou anaérobies, au contraire des technologies de biologies moléculaires, culture-indépendantes. Depuis, le poumon est reconnu comme une niche écologique à part entière, portant sa propre communauté. À noter qu'il est par ailleurs reconnu que le microbiote varie en densité et en composition le long de l'arbre respiratoire (densité et diversité plus importante au niveau du tractus respiratoire supérieur) (86).

Le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S, gène bactérien universel, associé à des puissances de calcul bio-informatique considérable permettent d'analyser plusieurs millions de séquences par échantillon en un temps relativement bref (87). Ce gène est présent chez tous les procaryotes, à l'instar de l'ADN18S ou de l'*Internal Transcribed Spacer* pour les fungi –ITS-). Après une période d'analyse par restriction de taille (*Restriction Fragment Length Polymorphism* –RFLP-), par électrophorèse sur gel à gradient de dénaturation (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* – DGGE-), ou par clonage, ces gènes ont rapidement été analysés par séquençage à haut débit (88–90). D'une longueur d'environ 1,5 kilobases, le gène codant pour l'ARNr 16S comporte 9 régions hypervariables (V1 à V9) et 10 régions hautement conservées (C1 à C10). Les régions constantes permettent la production d'amorces amplifiant les régions variables sur lesquelles reposent la classification (Figure 4 et Tableau 5). Après production d'amorces de 4 à 12 nucléotides spécifiques de la plateforme utilisée, il est possible, en les attribuant à leur échantillon d'origine, de classer les séquences courtes produites (« reads ») en taxons (OTU ou *Operational Taxonomic Unit*) grâce à de nombreuses suites logiciels (exemple : mothur, QIIME, UPARSE) (91–93). À noter que toutes les étapes de constitution des librairies (« *wet-lab* ») et bio-informatique (« *dry-lab* »), impactent la qualité des résultats, justifiant l'utilisation de contrôles standardisés pour toute étude du microbiome (94,95).

La description des populations bactériennes (à des niveaux de taxonomie variables, le plus souvent au niveau du genre, en fonction de la longueur des données par read) ne permet néanmoins pas d'obtenir des informations quant à l'état d'activation de ces bactéries. Cette caractéristique restant importante pour comprendre la physiopathologie des microbiomes (les bactéries pouvant différer par leur présence et/ou par leur état d'activation), certaines études ont analysé le méta-transcriptome et le méta-métabolome du génome bactérien, permettant d'obtenir des données sur les métabolismes bactérien (mobilités, transduction du signal, transport ionique, métabolisme énergétique) (96).

Enfin, l'analyse de l'ADN16S se basant sur la détection des OTU, elle ne permet pas de distinguer les micro-organismes viables ou non et ne permet de mettre en évidence qu'une diversité généralement sous-estimée (97,98). L'utilisation de technique de métagénomique dite « shotgun », permettant de séquencer l'ensemble du génome bactérien, garde donc tout son intérêt comparativement au séquençage ciblé 16S. Ces techniques permettent de séquencer les gènes présents et d'en déduire les voies métaboliques pouvant théoriquement être exprimées dans un microbiote étudié.

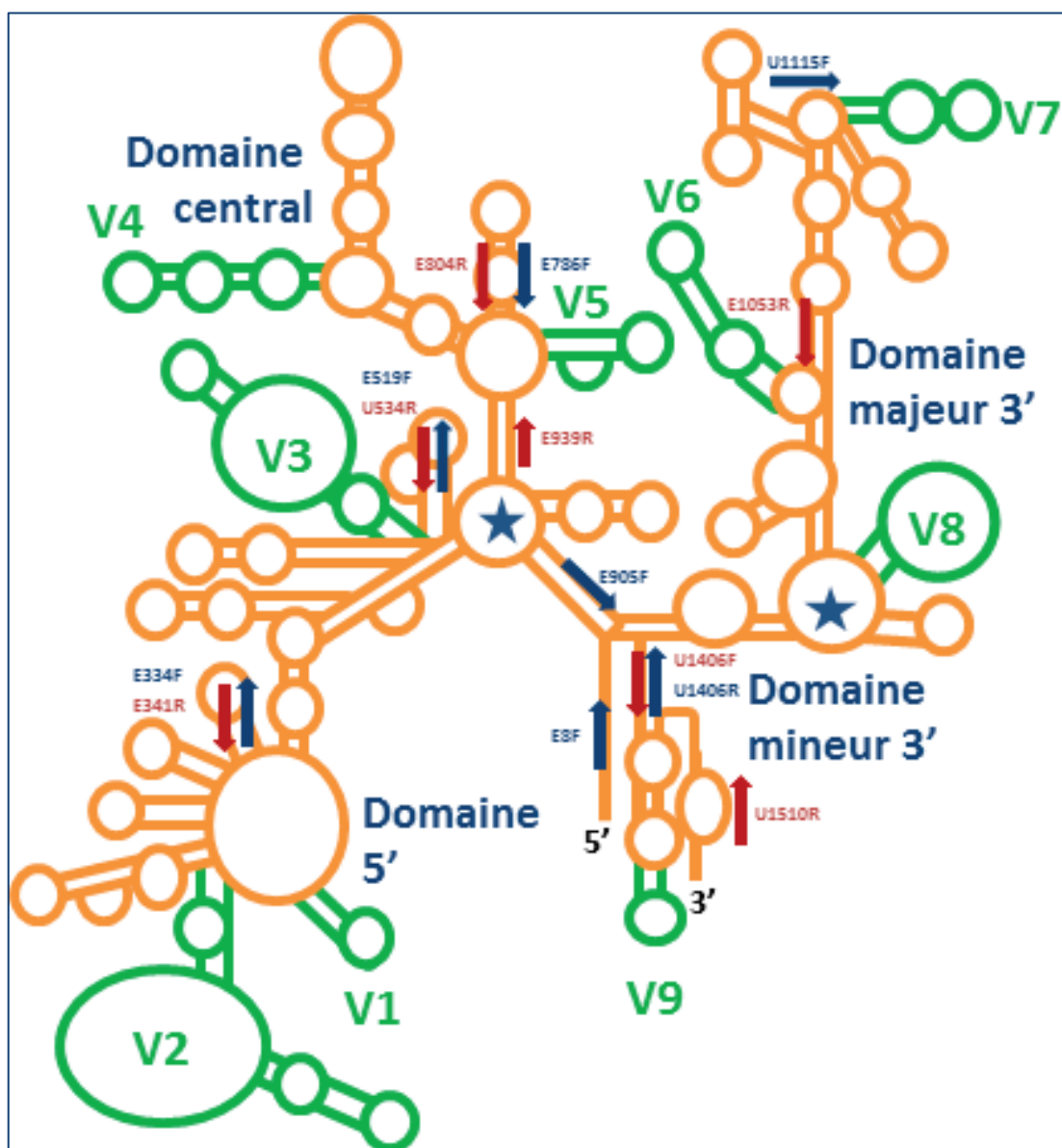


Figure 1. Structure secondaire de l'ARN 16S d'*Escherichia coli*. Les régions variables en vert (Vx) permettent la classification des espèces bactériennes de l'échantillon. Les régions constantes

en orange (Cx) sont ciblées par les amorces de séquençage. Les 4 domaines (5', mineur 3', majeur 3' et central) sont séparés par les boucles indiquées par une étoile. Les flèches représentent les amorces indiquées dans le tableau 2, utilisées dans les protocoles de séquençage.

Tableau 1. Amorces du gène codant l'ARN 16S bactérien Les coordonnées nucléotidiques et séquences sont basées sur *Escherichia coli* (adapté de (17)). Les nucléotides en rouge correspondent aux nucléotides conservés dans les régions variables ciblées et en vert aux nucléotides hypervariables de ces régions.

Séquences des boucles hypervariables [coordonnées nucléotidiques]	Amorce sens (Forward)	Amorce antisens (Reverse)
Région V1 [67-100] GGT AAC AGG AAG AAG CTT GCT TCT TTG CTG ACG	E8F TCT CAA ACT AGT ACC GAG TC	E341R CTG CGT CCC GTA GGA GTC TGG
Région V2 [207-296] TGA TGG AGG GGG ATA ACT ACT GGA AAC GGT AGC TAA TAC CGC ATA ACG TCG CAA GAC CAA AGA GGG GGA CCT TCG GGC CTC TTG CCA TCG	E334F GGT CTG AGG ATG CCC TGC GTC	U534R TAT TAC CGC GGC TGC TGG CTC GGA GTT AG
Région V3 [440-497] CAG CGG GGA GGA AGG GGA GTA AAG TTA ATA CCT TTG CTC ATT GAC GTT ACC CGC AGA A	E519F TCG TCG GCG CCA TTA T	E804R ACT ACC AGG GTA TCT AAT C
Région V4 [660-722] TTG TTA AGT CAG ATG TGA AAT CCC CGG GCT CAA CCT GGG AAC TGC ATC TGA TAC TGG CAA GC	E786F CTA ATC TAT GGG ACC ATC A	E939R CTT GTG CGG GCC CCC GTC AAT TCA ATT CAT TTG AGT TTT T
Région V5 [899-927] TGG AGG TTG TGC CCT GAG GCG TGG CTT C	E905F TTT TGA TTT ACT TAA CTG CCC CCG GGC GTG TTC	U1053R CTG ACG ACA GCC ATG CA
Région V6 [1009-1035] ACG GAA GTT TTC AGA GAT GAG AAT GTG CCT TCG GGA A	U1115F GGG CGT TGC TCG CGT TGG GA	U1406R GAC GGG CGG TGT GTA CA
Région V7 [1119-1157] CCT TTG TTGCCA GCG GTC CGG CCG GGA ACT CAA AGG AG	U1406F ACA TGT GTG GCG GGC AG	U1510R CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT
Région V8 [1242-1295] CGC ATA CAA AGA GAA GCG ACC TCG CGA GAG CAA GCG GAC CTC ATA AAG TGC GT		
Région V9 [1434-1465] GTA GGT AGC TTA ACC TTC GGG AGG GCG CTTA		

2. Caractéristiques du microbiome respiratoire sain

Des études portant sur des cohortes de taille importantes ont permis d'apporter des informations structurelles et de composition du microbiome de différentes niches écologiques à l'état « sain ». Au vu des nombreux facteurs confondant potentiels, il reste néanmoins difficile de définir les caractéristiques d'un patient-type sain, compliquant ainsi la comparabilité inter-étude.

Bien que près de 9 000 publications répondent au mot-clé “microbiome” sur la banque de donnée Medline (recherche sur PubMed), seule une part infime de celles-ci se focalisent sur le microbiote respiratoire. De plus, la plupart des publications portent sur les perturbations liées aux maladies inflammatoires chroniques (asthme et BPCO principalement). Peu de données se concentrent sur les perturbations du microbiome dans les infections virales, même dans le tractus respiratoire (Figure 5).

Ces études ont permis de distinguer deux niveaux de microbiomes, un microbiome dit « central » (ou microbiome « noyau ») et un microbiome dit « satellite ». Le microbiome central est constitué des espèces bactériennes retrouvées de façon constante dans plus de 95% d'une niche écologique considérée de façon partagée entre les individus sains. Il comporte les gènes microbiens, de l'hôte et les voies métaboliques permettant une physiologie adaptée de l'organe considéré.

Dépendant de facteurs environnementaux, thérapeutiques (traitement au long court, thérapie substitutif, ...) et de l'alimentation (alimentation hypercalorique *versus* régime dit « méditerranéen »), le microbiome varie aussi en fonction des caractéristiques intrinsèques de l'hôte comme l'âge, le sexe (avec variations menstruelles chez la femme), et l'origine sociale ou ethnique du foyer familial (100,101).

Chez les jeunes enfants, le mode d'accouchement est un facteur majeur de détermination du microbiome à la naissance, autant qualitativement que quantitativement (102). Les enfants nés par césarienne ont un microbiome respiratoire

dominé (« respirotipe ») pendant une plus longue durée par *Staphylococcus aureus*. Les enfants nés par voie basse ont par contre un microbiome respiratoire se complexifiant plus rapidement en intégrant les *Moraxellae*, *Corynebacteriae*, et *Dolosigranulae* et offrant une meilleure protection contre les infections respiratoires (103,104). De surcroit, l'alimentation au lait maternel renforce cette protection (105). Enfin, le microbiome respiratoire des enfants prématurés est différent de celui des enfants nés à terme (106).

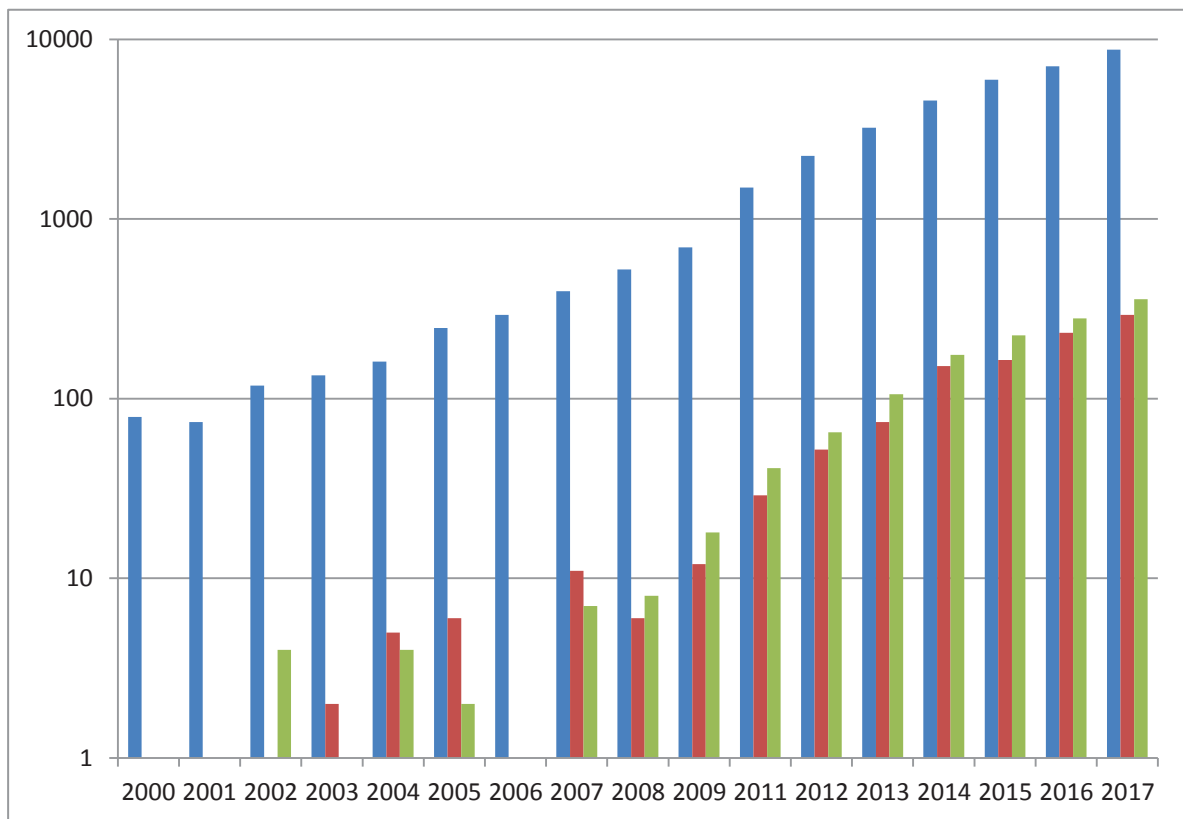


Figure 2. Évolution des données bibliométriques portant sur le microbiome respiratoire de 2000 à 2017. En ordonnée, est noté le nombre de publication relevant des mots clés (« microbiome(ta) » en bleu, « respiratory microbiome(ta) » en rouge et « viral microbiome(ta) » en vert) par année (indiqué en abscisse). À noter que le nombre de publication a considérablement augmenté en 2012-2014, concordant avec la démocratisation de la technologie de séquençage à haut débit. De plus, il est important de remarquer la différence entre le nombre de publication portant sur le microbiome et le microbiome respiratoire particulièrement, pouvant s'expliquer par le défaut d'intérêt de cette niche écologique comparativement au tractus digestif par exemple.

Tableau 2. Espèces bactériennes dominant le microbiome bactérien respiratoire.

Ces espèces sont retrouvées quel que soit le statut, sain ou pathologique, de l'hôte prélevé. À noter que certaines espèces (*) sont présentes constamment et indépendamment de la région prélevée. Ces espèces restent néanmoins une exception.

Localisation anatomique	Tractus respiratoire supérieur			Tractus respiratoire inférieur	
	Cavité buccale	Nasopharynx	Oropharynx	Trachée	Poumon
Mode de prélèvement possible	Écouvillonnage Nez-Gorge			Aspiration Trachéo-bronchique	Lavage Broncho-pulmonaire (Biopsie)
Bactéries retrouvées en majorité (chez l'adulte sain)	<i>Prevotella</i> <i>Streptococcus*</i> <i>Veillonella*</i> <i>Haemophilus</i>	<i>Corynebacterium</i> <i>Streptococcus*</i> <i>Veillonella*</i> <i>Propionibacterium</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Moraxella</i>	<i>Prevotella</i> <i>Streptococcus*</i> <i>Veillonella*</i> <i>Haemophilus</i> <i>Fusobacterium</i>	<i>Prevotella</i> <i>Streptococcus*</i> <i>Veillonella*</i> <i>Cloacibacterium</i> <i>Helicobacter</i>	<i>Prevotella</i> <i>Streptococcus*</i> <i>Veillonella*</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Fusobacterium</i>

Malgré d'importantes variations au cours des premiers mois de vie, les profils bactériens centraux convergent progressivement mais rapidement vers un profil mature dès l'âge de deux mois, se stabilisant par la suite, justifiant la notion de microbiome « noyau ». Par opposition, le microbiome périphérique, correspondant à 5% des OTU inconstamment retrouvés, est sujet à variations rapides mais réversibles en fonction de l'état physiopathologique de l'hôte considéré. Les altérations pouvant l'impacter sont très diverses comme la grossesse chez la femme, le développement chez l'enfant ou la sénescence de la personne âgée. Il est donc le reflet complet de l'interaction entre l'individu et son environnement, comme une prise de thérapeutique, d'antibiotique, une infection virale ou bactérienne, mais aussi une modification des habitudes de vie de l'individu. Ces très nombreux facteurs de variations autant constitutionnels qu'acquis justifient la réalisation d'étude à l'appariement poussé ou d'études longitudinales.

3. Impact du microbiote respiratoire bactérien dans la pathogénèse des maladies virales respiratoires

3.1. Notions importantes sur le microbiote bactérien dans les études de pathologies

Le tractus respiratoire, contrairement à de nombreux organes comme le foie ou le système nerveux, est en contact constant avec l'environnement extérieur (107).

Comme dit précédemment, en 2016, sur plus de 7 000 articles, une faible proportion répondait au microbiome, respiratoire en particulier, et son évolution (Figure 6A). De plus, comme pour l'ensemble des niches écologiques, peu de publication ne concernent pas les composantes bactériennes du microbiome, et étudient les composantes virales et fongiques du microbiome (Figure 6B). Après un premier temps de caractérisation de l'évolution de la composition du microbiome respiratoire dans un contexte « sain », les études se sont ensuite concentrées à caractériser les situations dites « pathologiques », infectieuses ou non. Les infections respiratoires étant majoritairement virales (plus de 70% des infections respiratoires basses de l'adulte), cette partie de l'étude bibliographique se limitera aux descriptions des altérations dues aux infections virales (108). À noter que les principaux virus responsables d'infections respiratoires (*Influenzavirus* –IV- ; Virus Respiratoires Syncytiaux –VRS- et *Rhinovirus* –RV-) sont aussi les plus étudiés.

Comme précisé précédemment, la stabilité du microbiome respiratoire bactérien est acquise à l'approche de la première année de vie. Celui-ci, par sa diversité impacte l'immunité et la physiologie de son hôte (109–113). Ainsi la présence de bactérie appartenant au genre *Moraxella* semble associé à une plus grande sévérité de l'infection à Virus Respiratoire Syncytial (VRS), alors qu'en retour, celui-ci modifie fortement le microbiome respiratoire de l'hôte (104,114–116). Du fait de la fréquence des coinfections VRS - *Moraxella* et du fait de la cocirculation de ces deux pathogènes au cours

de l'hiver, cette collaboration microbienne n'est pas rare. De même, la bronchiolite à VRS se compliquant fréquemment d'une otite moyenne aiguë d'origine bactérienne, il est fortement probable que l'infection virale fasse le lit de la surinfection bactérienne, comme démontré de longue date pour les surinfections pneumococcique de la maladie grippale (117). De nombreux modèles d'interactions bactéries – IV ont été décrits dès la pandémie grippale de 1918 (modèles revus dans (118,119)). Résumées dans la figure 7 dans le cadre de l'infection grippale, les interactions bactéries-virus vont de l'interaction directe (via une activité sialidasique du pneumocoque, libérant les virions néoformés, ou la fixation cellulaire à stabilité augmenté de certains virus entérique par l'adhésion de composant de la paroi bactérienne comme le Lipopolysaccharide – LPS-). Cette interaction (induisant une anergie immunitaire) a aussi un impact anatomique (destruction des jonction épithéliales, altération du surfactant bronchiolaire) et un impact immunitaire (dysfonction des réponses autant innées qu'adaptatives) (120,121).

À noter qu'il est reste important de distinguer la simple détection des micro-organismes par séquençage de l'ADN 16S des propriétés génétiques de ceux-ci (« postulat moléculaire de Koch »). L'étude des génomes bactériens complets réalisée par Leung *et al*, a permis la caractérisation du microbiome des patients grippés, en les appariant aux microbiomes des patients non infectés aux même caractéristiques démographiques (96). Ils ont ainsi pu montrer la plus grande représentation de gènes de mobilité (en réponse au chimiotactisme, expression de flagelle, ...), de gènes de régulation du métabolisme ou de la transcription dans les bactéries des microbiomes des patients infectés. Ces données de méta-transcriptomique comparative suggèrent la présence d'une sélection des micro-organismes aptes à s'adapter aux changements de leur environnement dans un microbiome ouvert comme le microbiome respiratoire. Ces espèces seraient ainsi capables de migrer le long des voies aériennes, d'altérer le tapis muco-ciliaire et de limiter les réponses de l'hôte par production de métabolites immunomodulateurs, modifiant donc fortement le devenir clinique de l'hôte infecté.

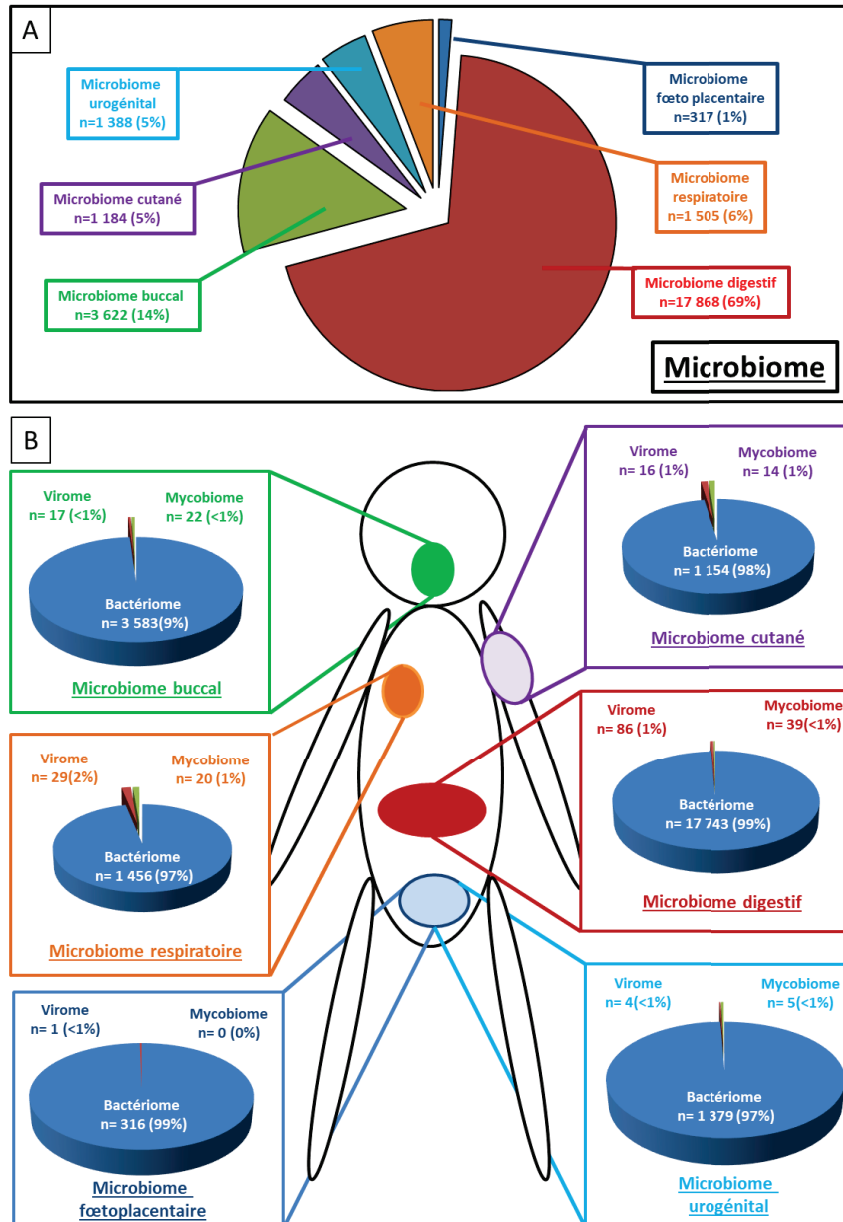


Figure 3. Répartition des publications scientifiques concernant les microbiomes par site anatomique en fonction de la niche écologique (A) ou en fonction des différentes composantes (B). À noter que les recherches à propos du microbiome buccal correspondaient aux mots-clés « microbiome(ta) » et « oral » ; du microbiome respiratoire à « microbiome » et « respiratory » ou « pulmonary » ; du microbiome foeto-placentaire à « microbiome » et « fetal » ou « placenta » ; du microbiome cutanée à « microbiome » et « skin » ; du microbiome digestif à « microbiome » et « gut » ou « digestive » ; du microbiome urogénital à « microbiome » et « urinary » ou « genital » ou « penis » ou « vaginal ».

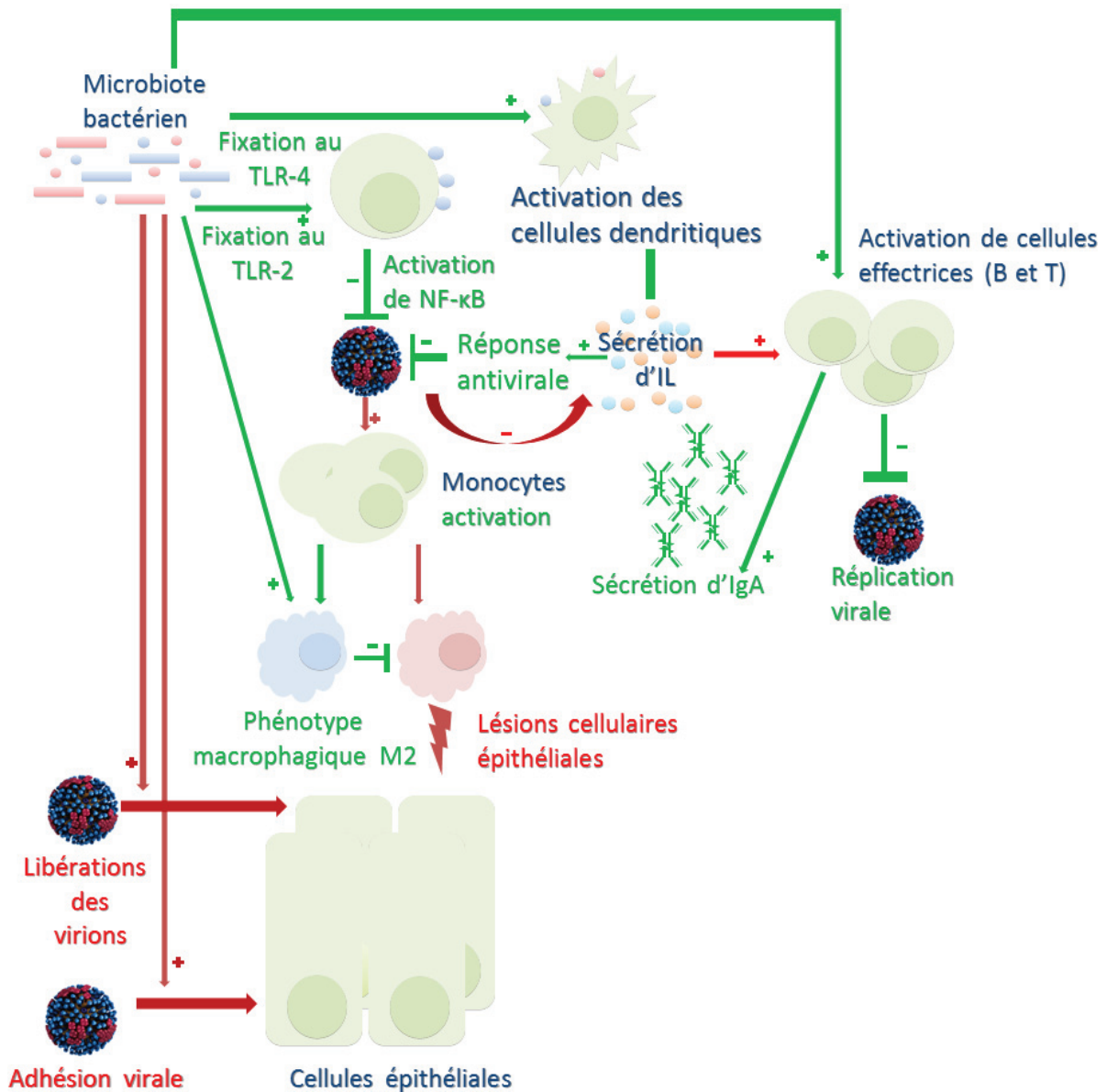


Figure 4. Interaction du système immunitaire et du microbiote respiratoire bactérien au cours d'une infection respiratoire virale. Les flèches vertes et rouges représentent les interactions conduisant respectivement vers des maladies moins ou plus sévères. TLR : Tool Like Receptor ; IL : Interleukines ; NF-KB : Facteur nucléaire. Les interactions virus – bactériomes peuvent donc impacter à 3 niveaux : i/ directement (modification de l'adhésion, clairement établi pour les virus digestifs ou de la libération virale) ; ii/indirectement par modification de la réponse innée (modification des phénotypes macrophagiques ou dendritiques) ; ou iii/indirectement par modification de la réponse adaptative (augmentation de la sécrétion des IgA et activation de cellules effectrices ciblées).

3.2. Impact direct

Au cours de l'infection respiratoire aigüe, le microbiome respiratoire impacte directement l'environnement du tractus respiratoire, influençant par la suite la pathogénicité de l'infection virale. Ce microbiome « basal » varie entre individu, mais il est clair que la colonisation par certaines d'entre elles confère un effet bénéfique ou délétère sur l'infection en cours ou à venir (résumé dans le tableau 7).

Les bactéries du microbiote peuvent par exemple promouvoir l'infection virale, ou sa pathogénicité, par un effet direct sur les épithéliocytes. Une infection *in vitro* par *Haemophilus Influenzae* induirait la surexpression de ICAM-1, qui, associé à une fixation augmentée des *Rhinovirus*, pourrait expliquer une augmentation de sévérité (122).

3.3. Impact indirect

De nombreuses études indiquent que le microbiome respiratoire bactérien impacte l'anatomie pulmonaire, sa fonction, mais aussi le développement du tissu lymphoïde associé (123,124). Un microbiome capable de favoriser une certaine immunomodulation est donc en mesure de limiter les dégâts tissulaires liés à l'exacerbation inflammatoire consécutive à l'infection par un virus. Au moyen d'un modèle murin, Wang *et al.* ont pu prouver l'importance de l'intégrité du microbiome respiratoire sur la tolérance aux infections virales (125). Utilisant des souris exemptes de pathogènes spécifiques (*Specific Pathogen Free* ou SPF), plus sensibles aux infections par des virus *Influenza* que les souris sauvages (contrôles), ils ont pu montrer que l'instillation intranasale de bactéries commensales réduisait considérablement les atteintes histopathologiques des souris SPF (Figure 8). En induisant une modification du phénotype monocytaire-macrophagique, cette colonisation diminuait la létalité de l'infection (125). D'autres auteurs ont montré que l'utilisation d'un cocktail d'antibiotiques à large spectre avant infection de souris par le virus A(H1N1), augmente la morbidité de cette infection, avec amaigrissement et détresse respiratoire importante (126). Ils ont pu mettre en évidence que ces perturbations étaient

associées à une diminution des migrations des cellules dendritiques, tout d'abord, ainsi qu'une diminution de la concentration tissulaire des lymphocytes T, aboutissant *in fine* au maintien d'une charge virale locale élevée. Enfin, il a été montré que l'administration *per os* de traitement probiotique, restaurant certaines voies de réponse inflammatoires, améliorerait la réponse immunitaire des souris à l'infection, en augmentant la clairance virale (Figures 8 et 9).

En conclusion, ces études ont montré que la pathogénèse augmentée de l'infection par le virus grippal, sur un terrain au microbiome altéré, était due, au moins en partie, à une réponse immunitaire locale peu efficiente, restauré en même temps que ce microbiome. Néanmoins, la viabilité complète des micro-organismes de ce microbiome intègre n'est pas indispensable. Il a été ainsi possible de restaurer expérimentalement une réponse immunitaire efficace par l'administration de LPS chez un hôte au microbiome « altéré » (127). Ces protéines bactériennes permettraient l'activation de récepteur de reconnaissance de motifs moléculaire (PAMPS ou « *Pathogen Associated Molecular Patterns* »), augmentant la stimulation des leucocytes à tout niveau. De plus, il a été montré dans des modèles cellulaires et murins d'infection à *Rhinovirus* et VRS que les microbiomes nasopharyngés dominés par *Haemophilus Influenzae* et *Streptococcus* (par opposition à ceux dominés par *Staphylococcus aureus*) présentaient une réponse inflammatoire exacerbée, à l'origine d'un plus grand nombre d'hospitalisation et d'une plus grande létalité (128). Les études réalisées jusqu'alors n'ont néanmoins fait qu'entrevoir une faible partie des mécanismes complexes liant microbiome et réponse de l'hôte.

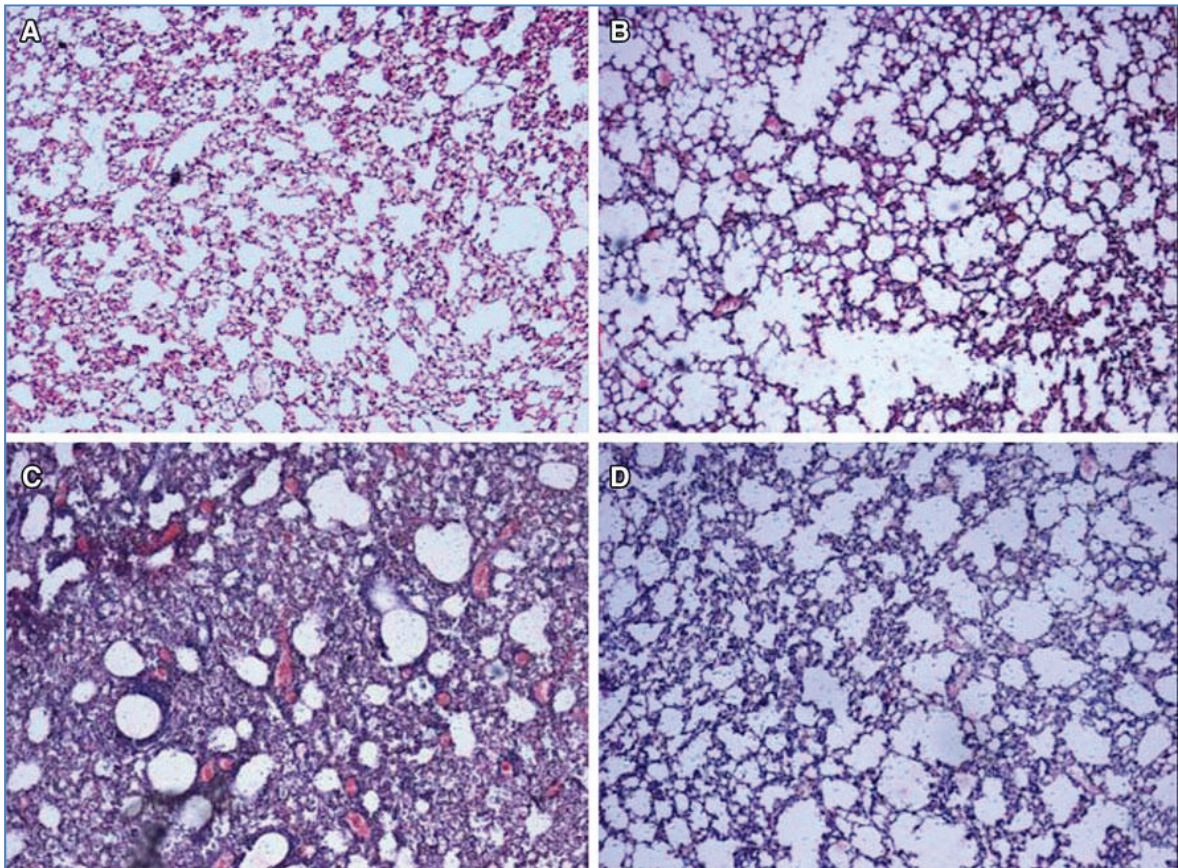


Figure 5. Effet histologique de l'antibiothérapie préalable à une infection respiratoire virale.

Coupe histologique d'un poumon sain (A) ; de poumon infecté par virus *Influenza* (B) ; de poumon infecté par virus *Influenza* chez une souris traitée par antibiothérapie à large spectre (C) et de poumon infecté par virus *Influenza* chez une souris traitée par antibiothérapie large spectre avec administration de probiotiques (D). L'administration d'antibiotique préalable à l'infection virale augmente l'infiltration et l'hyperplasie cellulaire et la fibrose, destructurant l'architecture pulmonaire. Cet effet semble partiellement reversé en cas d'administration de probiotiques (ici *Lactobacillus* sp.)

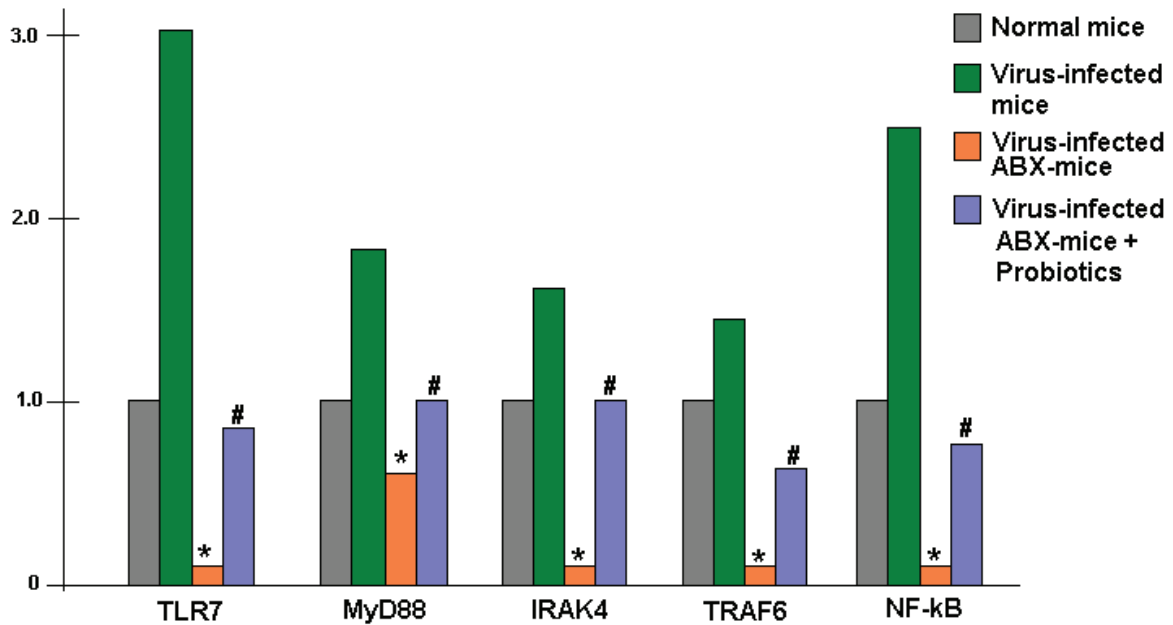


Figure 6. Impact de la déplétion des microbiomes sur la voie TLR-7. L'administration d'antibiotiques, altérant le microbiome présent, diminue fortement la réponse inflammatoire (Toll Like Receptor 7 –TLR7-, Myeloid differentiation primary response 88 –myD88-, interleukin-1 receptor-associated kinase 4 –IRAK4-, TNF receptor associated factor –TRAF6-, nuclear factor-kappa B –NFkB-) aux virus *Influenzae* (« Virus-infected ABX-mice »). Des différences de niveau de réponse ont été retrouvées comparativement aux souris infectées mais non traitées (« virus-infected mice ») pour les souris infectées après antibiothérapie sans (« Virus-infected ABX-mice », en orange) ou avec supplémentation probiotique (« Virus-infected ABX-mice + probiotics », en violet). L'Ordonnée représente une unité arbitraire correspondant à la réponse des souris « normales ». * et # correspondent à des différences significatives comparativement aux souris normales, de référence.

La description des perturbations du microbiome chez l'homme, particulièrement le microbiome respiratoire, dans le cadre de situations pathologiques aiguës, infectieuses ou non, est de réalisation difficile, du fait de la difficulté à obtenir des échantillons cliniques pré-infection (à l'exception des études d'exposition) (129,130). Ainsi si les modèles animaux sont particulièrement utilisés dans cette situation, il est important de garder à l'esprit que leur physiologie n'est pas en tout point identique à l'humain, et que l'impact du

microbiome en tant qu'entité à part entière, est largement sous-étudiée (Tableau 7) (125,127,131).

Dans le microbiome respiratoire comme dans le microbiome digestif, il pourrait par exemple être intéressant de caractériser l'impact des bactériophages, virus de cellules procaryotes, sur la composition et l'effet du microbiome, du fait de leurs impacts lytiques et/ou lysogéniques (132). La simple présence de ces bactériophages dans les muqueuses pourrait contribuer à la barrière antibactérienne, fournissant une simili immunité contre l'envahissement par certains pathogènes bactériens (133).

4. Impact clinique du microbiome respiratoire

4.1. Utilisation thérapeutique dans le cadre de la prise en charge des infections virales

Comme l'impact du microbiome dans la pathogénèse des infections respiratoires virales est fortement probable et par analogie avec certaines thérapies du tractus gastro-intestinal (transplantation fécale), il semble envisageable de moduler le microbiome respiratoire. Certains auteurs ont proposé un modèle animal d'administration directe dans le tractus respiratoire de souches d'*Escherichia coli*, aux effets bénéfiques sur l'inflammation locale, limitant ainsi la symptomatologie clinique (134). De même, un essai thérapeutique dirigé par Bruzzese *et al.* a pu mettre en évidence le bénéfice de l'administration *per os* de *Lactobacillus rhamnosus* sur le nombre et la sévérité des exacerbations de mucoviscidose. L'effet des interventions sur le microbiome peut donc se faire à distance (135). Nécessitant d'être validé sur des cohortes de grande taille, le bénéfice à intervenir sur le microbiote semble donc probable sur les pathologies chroniques. Néanmoins, étant donné leur difficulté de réalisation, peu d'études se sont centrées sur l'étude du bénéfice à modifier le microbiome dans le cas d'infection aiguë comme les infections virales.

Tableau 3. Bactérie du microbiome respiratoire impliquée ou modifiée au cours d'une infection virale. VI : Virus Influenza. MPV : Métapneumovirus. RV : Rhinovirus. VRS : Virus Respiratoire Syncytial. À noter que certaines bactéries (comme les lactobacilles, *Escherichia coli* ou *Staphylococcus aureus*) sont associées à un effet bénéfique indépendamment du modèle viral considéré, alors que certaines (comme le *Streptococcus pneumoniae*) sont associées à un plus grand taux de survenue de complication.

Virus	Modèle considéré	Site de prélèvement	Bactérie considérée	Conséquences biologiques	Conséquences cliniques	Référence
			<i>Acinetobacter baumannii</i>			
	Échantillon clinique humain	Crachat induit	<i>Bacillus spp.</i>	Augmentation du taux de bactérie au cours de l'infection à IAV H1N1	Aucune modification	(96)
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
			<i>Neisseria spp.</i>	Diminution du taux de bactérie au cours de l'infection à IAV H1N1	Aucune modification	(96)
			<i>Prevotella spp.</i>			
	Modèle murin	Homogénat pulmonaire	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Complication (sévérité augmentée)	(117)
			<i>Lactobacillus helveticus</i>			
	Échantillon clinique humain	Écouvillon nasal	<i>Bacteroides ovatus</i>	Réponse IgA augmentée	Protection (sévérité diminuée)	(136)
		Échantillon nasopharyngé	<i>Veillonella dispar</i>	Réponse IgA diminuée	Protection (sévérité diminuée)	(136)
		Écouvillon nasal				

VI

Partie A. Étude Bibliographique

	Échantillon clinique humain	Échantillon nasopharyngé Écouvillon nasal	<i>Prevotella melanogenica</i>	Réponse IgA augmentée	Complication (sévérité augmentée) Protection (sévérité diminuée)	(136)
	Échantillon clinique humain	Écouvillon nasal	<i>Streptococcus infantis</i>	Réponse IgA augmentée	Complication (sévérité augmentée)	(136)
MPV	Modèle cellulaire	Modèle cellulaire	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Augmentation du taux de séroconversion	Protection (sévérité diminuée)	(137)
	Échantillon clinique humain	Échantillon nasopharyngé	<i>Haemophilus Influenzae</i> <i>Streptococcus spp.</i>	-	Complication (sévérité augmentée)	(128)
	Modèle murin	Échantillon nasopharyngé	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Complication (sévérité augmentée)	(104) (116) (114)
VRS	Modèle murin	Échantillon nasopharyngé	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	Protection (sévérité diminuée)	(128) (125)
	Échantillon clinique humain	Homogénat pulmonaire	<i>Escherichia coli</i>	-	Protection (sévérité diminuée)	(138)
	Modèle cellulaire	Modèle cellulaire	<i>Haemophilus Influenzae</i>	Production ICAM-1 et TLR-3 (endocytose)	Complication (sévérité augmentée)	(122)

Dans le cadre des infections à virus *Influenza*, il a été montré le bénéfice à administrer des composants bactériens, pour réduire l'infection des voies aériennes, et particulièrement dans les infections à virus grippal (127). L'administration de LPS (*via* un lysat bactérien) préalable à l'infection accélérât la réponse inflammatoire, en augmentant l'efficacité, éliminant ainsi plus rapidement le virus en cas de contact ultérieur et améliorant la survie des animaux exposés expérimentalement (139). Ces données sont néanmoins à tempérer pour les infections grippales, l'inflammation étant responsable de la plupart des symptômes (particulièrement dans le cadre des complications neurologiques, avec le tristement célèbre « orage cytokinique ») et ce, même si les traitements immunomodulateurs n'ont pas montré d'efficacité majeure dans les essais cliniques (50). La difficulté du contrôle de l'inflammation de la maladie grippale reste donc principalement liée à la temporalité de la prise en charge (140).

Ces caractéristiques sont également valables dans les infections à virus non grippal. Le prétraitement par administration intranasale d'agonistes synthétiques des Récepteurs *Toll-Like* TLR-2, TLR-6 et TLR-9 réduit le titre viral des *ParaInfluenzavirus* dans les prélèvements respiratoires sans pour autant en limiter l'impact clinique due à l'hyperactivité bronchique (141). De façon similaire, l'administration de simples toxines inactivées d'*Escherichia coli* ainsi que l'administration de *Lactobacillus rhamnosus* protège contre l'infection par le VRS (ainsi que les virus *Influenza* pour les toxines d'*Escherichia coli*) (142,143). L'effet protecteur des *Lactobacillus* serait dû à la modulation de la production de nombreux médiateurs pro-inflammatoires (Interféron -IFN- et Interleukines —IL-) et de l'activation des cellules immunitaires (cellules dendritiques principalement) *via* l'expression de CD103 et CD11b (144). Par ailleurs, comme évoqué précédemment, l'effet antiviral, indirect, de certains antibiotiques (comme l'érythromycine) au cours des infections à *Rhinovirus*, s'expliquerait par une perturbation de l'interaction virus-bactérie en plus de l'effet anti-toxinique potentiel. En effet, l'antibiotique limite l'expression d'ICAM, protéine d'adhésion des épithéliocytes (limitant ainsi l'adhésion des *Rhinovirus*), mais aussi de TLR-3, récepteur fortement impliqué dans la détection des génomes viraux, limitant ainsi la destruction tissulaire viro-induite (145).

L'administration de pré- et/ou probiotiques a aussi été évaluée dans la prise en charge des infections virales (129,146–150). Ainsi dans un essai thérapeutique, Luoto *et al.* ont pu montrer l'effet de l'administration de *Lactobacillus rhamnosus* et/ou d'un mélange de prébiotiques (galacto-oligosaccharide –polydextrose) connus pour augmenter la croissance

de bifidobactéries et de lactobacilles. Ces stratégies ont permis de prévenir les infections respiratoires symptomatiques à *Rhinovirus*, mais reste sans effet détectable dans le cadre d'infections à VRS.

En conclusion et malgré le caractère encourageant de ces études, un long chemin est encore à parcourir avant de pouvoir utiliser les approches de modification et/ou d'enrichissement bactérien pour prévenir ou traiter une infection virale. De nombreuses études de taille importantes, ainsi que le passage en routine des technologies de caractérisation des microbiomes en sont donc un point clé.

4.2. Utilisation en biomarqueurs

Au vu de toutes les caractéristiques détaillées jusque-là, l'utilisation du microbiome en tant que marqueur d'orientation des infections respiratoires ou non a pu être évoquée. Bien avant l'étude du microbiome, il avait déjà été observé que la colonisation respiratoire de patients ayant une mucoviscidose par certaines bactéries du genre *Pseudomonas* marquait un tournant extrêmement péjoratif de leur maladie (151).

Ainsi, et même si peu de données sont encore disponibles, la compréhension des mécanismes régissant la composition du microbiome d'un individu pourrait permettre de comprendre la pathologie en cours ou à venir. Le portage nasal de *Streptococcus pneumoniae* chez un enfant est par exemple positivement associé à la séropositivité au MPV. Après vérification au moyen d'un modèle cellulaire afin d'en comprendre l'imputabilité, il a pu être conclu à l'implication de cette bactérie dans la susceptibilité de l'hôte au MPV (137).

De plus, dans une importante cohorte de nouveau-nés infectés par le VRS, Téo *et al.* ont pu mettre en évidence que le microbiome nasopharyngé pouvait être le marqueur des infections respiratoires aiguës et/ou des dyspnée chroniques, consécutives aux bronchiolites sévères (104). De façon intéressante, la colonisation précoce (avant l'âge de deux mois) par un *Streptococcae* est associée à terme à un risque accru d'asthme à 5 ans. Cette colonisation peut donc être le marqueur d'un devenir péjoratif, avec une apparition prévisible de dyspnées chroniques, des années après l'infection initiale.

Bien qu'aucune relation causale stricte entre les caractéristiques du microbiome nasopharyngé et la réponse de l'hôte aux infections virales ne puisse être déduite, l'étude du microbiome de l'hôte semble d'utilité pour prédire les conséquences de ces infections. Réciproquement, la vaccination ou l'administration de molécules pré- ou anti-biotiques,

pourraient avoir des conséquences (bénéfiques ou non) sur les infections ultérieures, et pourraient relever d'une stratégie de prévention primaire ou secondaire (152,153).

Conclusions

En conclusion, les études réalisées et présentées ci-avant semblent suggérer que le microbiome bactérien respiratoire a un rôle majeur dans la réponse de l'hôte à l'infection virale, et ce, aux différentes étapes de sa mise en place. Ces démonstrations, réalisées sur modèles principalement *in vitro*, d'infection chronique, ou encore portant sur des populations standardisées (non représentatives de la population générale car immunodéprimées ou néo-/péri-natales) il reste difficile d'extrapoler leurs conclusions. De nombreux travaux chez l'humain, restent donc à réaliser pour apporter une compréhension suffisante en vue d'utiliser le microbiome en routine thérapeutique ou clinique. Certaines données suggèrent néanmoins sa possible utilisation dans le domaine de la santé humaine, le microbiome étant à la fois cause et reflet de la maladie et permettant, conjointement avec l'amélioration des technologies de biologie moléculaire, de mettre en place une « médecine personnalisée ».

La recherche sur le microbiome constitue donc un vaste champ d'investigation, aussi bien à l'échelle d'un simple pathogène qu'au niveau de l'étude de la communauté microbienne. Le développement des technologies de séquençage à haut débit du microbiome a apporté une considérable compréhension des situations physiologiques comme pathologiques. L'étude des interactions avec les autres composants du microbiome, virales et fongiques principalement restent néanmoins très limitées mais augurent de nombreuses avancées à court terme.

L'ensemble de ces découvertes tranche avec la précédente approche des maladies infectieuses, qui se focalisaient sur le pathogène lui-même. Depuis les premières descriptions des pathologies infectieuses, il était généralement admis que la compréhension d'une pathologie infectieuse passe par la caractérisation du pathogène. Une nouvelle approche, intégrative, s'efforce de prendre en compte l'ensemble des acteurs endogènes ou exogènes en présence (cibles cellulaires, réponse immunitaire, intervention thérapeutique, ...) mais surtout le corps de l'hôte dans sa globalité en tant que niche écologiques (Figure 10). En utilisant cette approche prenant en compte l'ensemble des paramètres, dont la maladie est le reflet du déséquilibre, il sera possible d'apporter nombre de données valides et pertinentes, et ce, même si aucune approche consensuelle de la question n'est apportée à ce jour par la communauté scientifique. Enfin, c'est seulement après consolidation de la compréhension mécanistique de la problématique, au moyen de modèles animaux pertinents ou des cohortes

de taille suffisante, qu'il sera possible d'appliquer les connaissances du microbiome à la prise en charge clinique des pathologies, qu'elles soient infectieuses ou non.

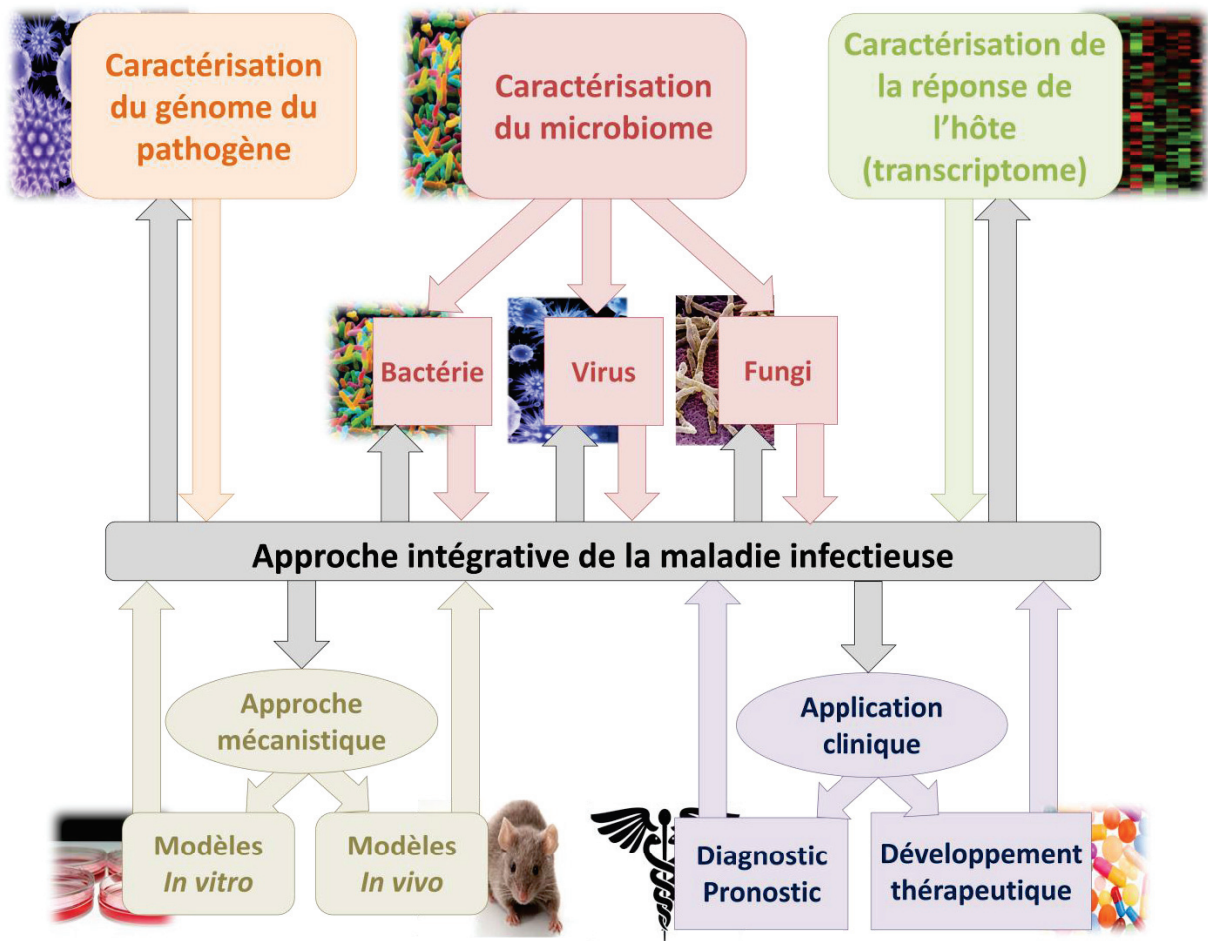


Figure 7. Approche intégrative des maladies infectieuses. Avant la mise en place d'approche mécanistique, la caractérisation des génomes du pathogène, du microbiome en cause ainsi que de l'hôte considéré est fondamentale. Avec ces éléments de compréhension seront possibles la mise en place d'applications cliniques innovantes autant diagnostiques, pronostiques ou thérapeutiques.

Chapitre 3 La diversification virale facteur évolutif ou péjoratif ?

Cette section comporte des éléments adaptés de la publication suivante (article publié en Annexe D) : **Pichon M., Pellisier R., Valette M., Lina B., Josset L. Biodiversité génomique virale : évaluation et conséquences sur la virulence des infections respiratoires. Virologie. 2018, 22 (3) : 173-82**

Introduction

Au cours d'une infection virale (principalement à virus à ARN), la réplication virale est à l'origine de populations génétiquement diversifiées au sein de la niche écologique infectée. Cette diversification résulte de caractéristiques du virus (nombre de génome initialement en présence, vitesse et fidélité de la polymérase, modalité de transmission inter-hôte) et de l'hôte (intégrité des barrières physiques, pression de sélection immunitaire et microbiome en présence). Chez un hôte, les virus sont donc présents en de nombreuses population distinctes, antigéniquement et génomiquement proches, appelées « quasi-espèce » virale (154–157).

Ces variations s'expliquent principalement par le défaut de fidélité des polymérases des virus, responsables de la réplication du génome. Le taux de mutation ainsi généré dépend de la nature du virus et de son génome, les virus à ARN présentant un taux élevé alors que les virus à ADN restent 10 fois plus fidèles (10^{-7} à 10^{-8} substitutions par site nucléotidique par cycle d'infection cellulaire) (158). En comparaison le taux d'erreur d'une polymérase cellulaire est proche de 10^{-8} à 10^{-9} substitutions par site nucléotidique par cycle cellulaire. En effet et contrairement aux enzymes eucaryotes, les enzymes virales ne présentent aucune propriété de correction et introduisent un certain nombre de variation nucléotidiques (substitution, délétion, insertion) à chaque cycle répliatif. Pour les polymérases eucaryotes, un système d'autocorrection permet une excision, par activité exonucléasique, de 90 à 99,9% des anomalies ainsi générées (159).

Ces populations nouvellement formées rejoignent donc le concept de quasi-espèces proposé par Eigen dès 1971. Initialement purement théorique, ce concept décrivait un groupe d'individus, au sens biologique du terme, différents mais reliés génétiquement au cours de l'apparition de la Vie. Par voie de conséquence, ce concept suggère que les erreurs de polymérases sont de véritables moteurs de l'évolution, permettant la création de nouveaux

mutants, isolés ou non, aptes à résister à de nouvelles conditions environnementales (160). Aboutissant ainsi à de véritables populations, ces variants présentent de très nombreux phénotypes, pouvant aussi se transmettre entre hôtes infectés, se disperser au cours de l'étape d'invasion, ou même être issus de la dissémination de l'infection au sein des différents organes chez un individu donné (résumé par la Figure 11) (158,161–167).

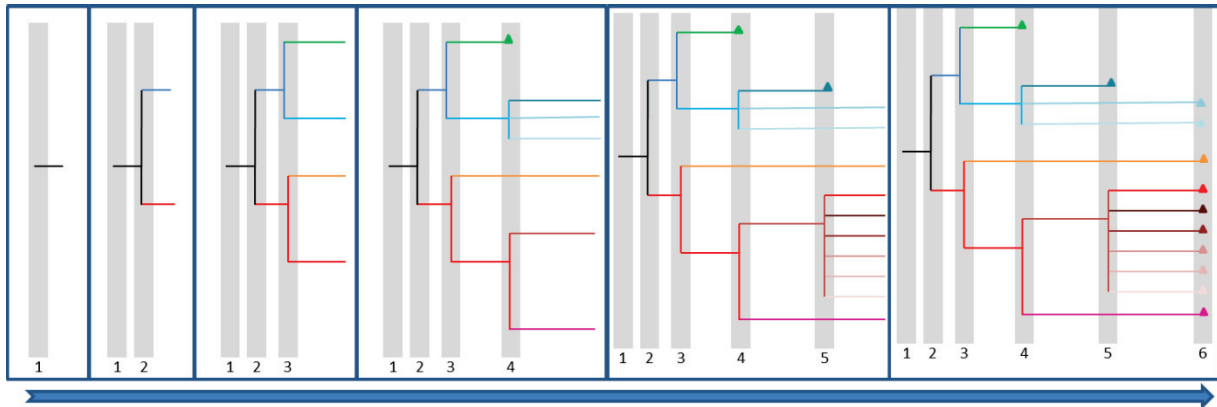


Figure 8. Principe de diversification génomique virale. À chaque cycle répliatif les erreurs aléatoires introduites entraînent la divergence antigénique et nucléotidique des virus, créant de nouvelles sous-populations, appelés aussi « quasi-espèces ». Certaines sous populations s'éteignent spontanément (population verte) alors que des sous population intermédiaires ne sont simplement plus visibles (population noire).

La plasticité et la variabilité des génomes sont donc des propriétés évolutives intrinsèques aux virus (et principalement à ceux à ARN). Il est donc important de marquer la différence de définition entre les séquences « consensus » et « majoritaires » (Figure 12). La séquence consensus, retrouvée par toutes les technologies de séquençage, même classique, est une reconstruction, parfois absente de la réalité, constituée des bases les plus représentées à chaque coordonnée nucléotidique. Elle ne peut néanmoins pas expliquer toutes les caractéristiques des micro-organismes étudiés, et pour cause, il n'est nullement fait état de sa représentativité biologique en tant qu'entité. Cette séquence est à distinguer de la séquence majoritaire qui, comme son nom l'indique, représente la majorité des séquences retrouvées, en tant que telle. Seule une approche permettant de reconstituer les haplotypes viraux est en mesure de mettre en évidence les génomes constitués des mêmes séquences, en dehors de la séquence majoritaire.

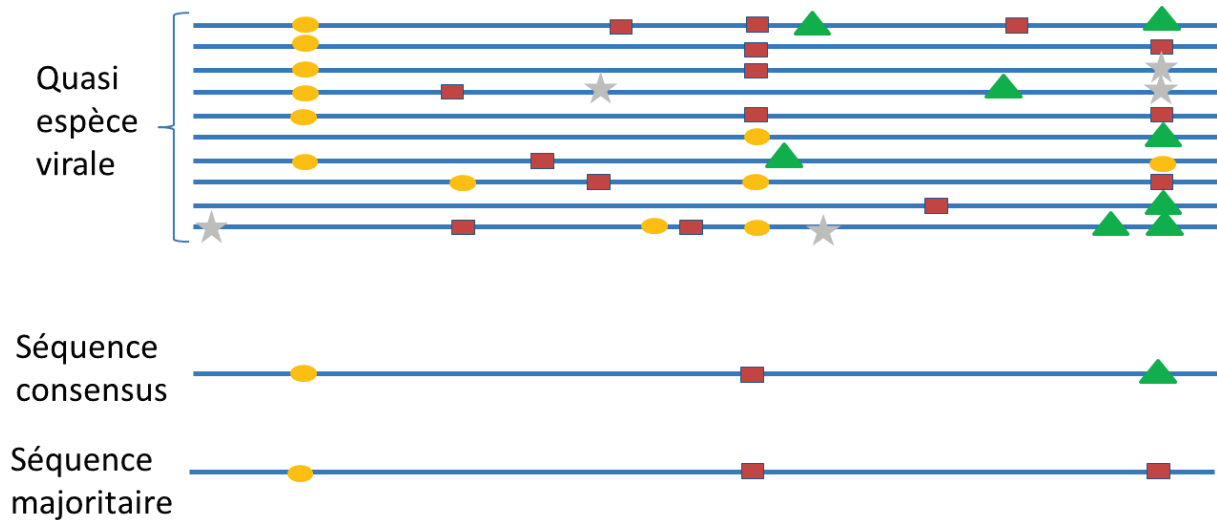


Figure 9. Point de définition. Les lignes horizontales représentent la présence d'un type de génome viral alors que les symboles (rond, carrés, triangles, étoiles) représentent des mutations ponctuelles (mutations, insertion, délétion). En séquençant cette population, on constate que la séquence consensus obtenue (présentant trois mutations présentes dans plus de 50% des virus en présence) serait distincte de la séquence majoritaire (présente dans sa globalité, dans le plus de virus en présence).

1. Diversité et évolution des technologies de séquençage

Comme évoqué précédemment, les quasi-espèces virales qui résultent de la diversification au cours des cycles réplicatifs, sont une notion étudiée depuis près de 40 ans, d'abord en théorie et récemment en pratique (par biologie moléculaire). Les technologies de séquençage à haut débit ont depuis permis de générer, à faible coût, des données en quantité parfois impressionnante, portant sur les génomes viraux. Les données ainsi produites ont permis de faire basculer les théories vers une conception expérimentale, ouvrant des possibilités d'investigation non envisagées jusqu'alors, aussi bien pour les méthodes de vaccination que de thérapies anti-infectieuses innovantes. À noter qu'initialement concentrée sur les recherches portant sur les virus des hépatites et du VIH, les centres d'intérêt se multiplient, portant tant sur les virus à ARN qu'à ADN, ou même sur les virus responsables d'infections aiguës. Depuis quelques années le nombre de publication portant sur la diversité virale a néanmoins explosé (mot-clé : « viral diversity » est triplé en 10 ans, passant de 300 en 2003 à plus de 900 en 2013, croissance qui ne fait qu'augmenter (Figure 13).

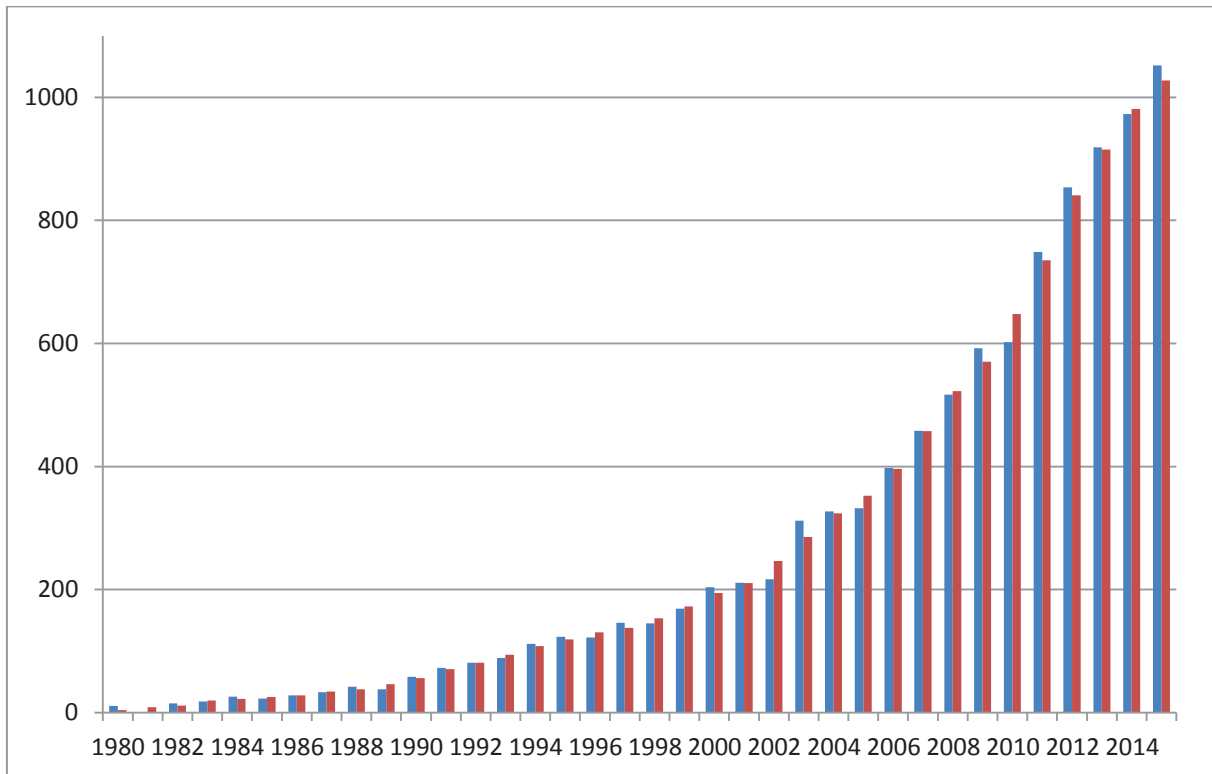


Figure 10. Données bibliométriques des publications portant sur la diversité virale (1980-2018).

En ordonnée, est représenté le total cumulé d'étude portant sur la diversité génomique virale (bleu, le nombre de publication de l'année n ; rouge, la moyenne du nombre de publication entre les années $n-1$ à $n+1$).

Le nombre de publications portant sur cette diversité augmente ainsi de façon quasi-exponentielle, suivant le perfectionnement des technologies de séquençage. En effet, le passage de technologie classique de séquençage, par méthode dite « de Sanger » aux technologies de séquençage à haut débit (comme la technologie par terminateur réversibles fluorescents d'Illumina) permet de discriminer plus efficacement les espèces en présence dans un échantillon, reflet de la diversification intra-hôte (Figure 14). Cette amélioration de technologie n'est néanmoins pas exempte de problème, le taux d'erreur s'élevant à plus de 1% dans certains modèles expérimentaux (168). De plus, les biais de chaque plateforme d'étude doivent être connus et maîtrisés autant que possible pour limiter un problème de comparabilité inter-échantillon (et encore plus inter-runs). Par ailleurs, les taux d'erreur sont disproportionnés dans les régions riches en GC, à la fin d'un *read* (unité de séquence) et en fonction de la structure secondaire de l'acide nucléique séquencé (169,170). Ainsi, dans le cadre de l'analyse de certains variants, une proportion importante des erreurs sont des substitutions, qu'il est difficile, sinon impossible, de distinguer d'un réel variant nucléotidique, présent à très faible fréquence dans la population virale.

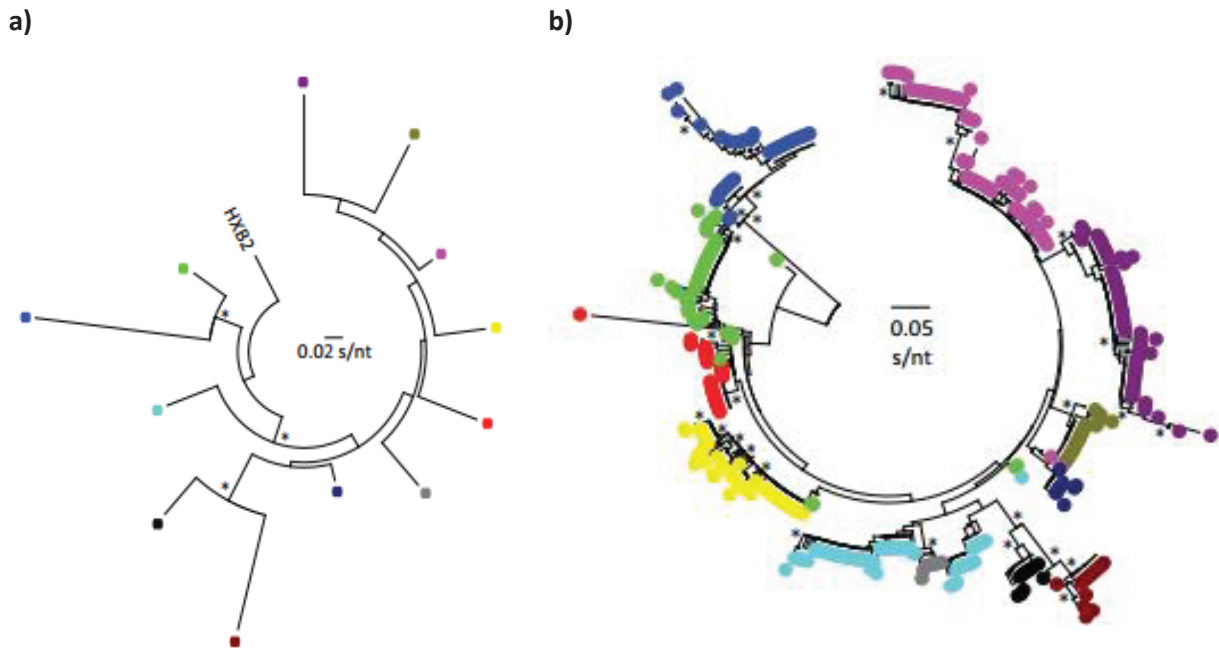


Figure 11. Pouvoir discriminant de l'étude phylogénique (Neighbor-Joining, NJ) des méthodes de séquençage historiques (A) et de nouvelle génération (B). Cette étude phylogénique, appliquée à la région V1-V3 de la glycoprotéine gp120 du VIH montre une plus grande diversité dans le cadre des nouvelles technologies, et ce malgré le fait que les deux technologies aient été appliquées au même échantillon (171).

L'étude des diversifications virales reste tout de même un champ complexe d'investigation, et particulièrement dans le cadre des infections respiratoires. En effet, les infections respiratoires, qu'elles soient à virus *Influenza*, à VRS ou à *Rhinovirus*, sont généralement aiguës. L'importance de la diversification au cours d'une évolution clinique aussi brève reste donc particulièrement difficile à apprécier, car, au contraire d'une infection chronique, aucun prélèvement n'est réalisé systématiquement en pratique clinique, à échéance, pour contrôler ou suivre la décroissance de l'infection. Peu d'études ont donc exploré cette diversification génomique au cours de l'infection respiratoires, à l'exception de situation d'excrétion prolongés comme chez les patients immunodéprimées (172).

Dans cette étude bibliographique, nous allons donc décrire, après en avoir détaillé les principaux estimateurs et méthodes de calculs, les conséquences cliniques de cette diversification. Nous nous limiterons aux conséquences cliniques de cette diversification dans le cadre des infections respiratoires virales de l'Homme.

2. Mesure de la diversité génomique

Comme évoqué précédemment, de nombreux paramètres peuvent impacter la diversité génomique virale, il est donc nécessaire de définir la ou les unité(s) de mesure permettant sa quantification (Tableau 5).

Tout d'abord, il est important, avant toute évaluation de prendre en considération que la diversité génomique observée est la résultante de la diversité réelle, biologique, mais aussi de la diversité artificielle, induite par les préparations de bibliothèques (amplification, fragmentation, l'adénylation, l'indexation) et le séquençage en lui-même. La rétrotranscription et l'amplification par RT-PCR induit par exemple un taux d'erreur de 10^{-5} à 10^{-4} substitution par coordonnée nucléotidique par cycle de PCR. Si ce taux d'erreur global est important avant l'analyse, le traitement informatique permet de le ramener à 0.1% (pour les plateformes Illumina), 0.5% (pour le Ion PGM) mais peut rester à 15% (pour le PacBio) (173,174).

La validation de la qualité du processus analytique est donc cruciale, et ce spécialement quand il s'agit d'étudier les variants minoritaires. L'utilisation de virus clonaux (comme les virus « de plage de lyse ») ou les plasmides utilisés dans le cadre de génomique inverse permet d'obtenir des performances de contrôle satisfaisantes (175). En principe strictement identiques avant leur introduction dans le processus analytique la mise en évidence de variant dans les séquences correspondantes permettra donc la mise en évidence des erreurs de séquençage et ainsi d'approcher l'estimation de la diversité génomique réelle des virus séquencés au cours d'un même run. Cette validation de processus est importante afin de limiter au maximum les biais de sous-/ ou de sur-/ représentation de la diversité génomique biologique (176). En effet, une surestimation du bruit de fond, contrôlable par l'utilisation de standard, comme un échantillon biologique réel ou artificiel parfaitement quantifié, ou d'un pipeline informatique préalablement vérifié, peut conduire à une sous-estimation de la diversité interprétée. Réciproquement, l'utilisation de données corrompues par un trop grand laxisme quant à la qualité des données analysées, de même que l'utilisation de suite logicielles non adaptées, peut conduire à une surestimation de cette diversité. Il est important d'insister sur le bénéfice incontestable à utiliser un protocole de constitution des bibliothèques ainsi qu'à utiliser une suite de logiciel parfaitement optimisée pour la détection de variants de faible fréquence afin de prendre en compte l'impact des erreurs produites par le séquençage (176).

La standardisation des méthodes d'analyse, propre à chaque étude en l'absence de consensus universellement admis, permettrait, après validation extensive, de s'affranchir des biais inter-expérimentation, plateforme dépendante, générant des données de qualité satisfaisante en toute occasion, et ce même sur les génomes imparfaitement séquencés, ou présentant une variabilité importante, comme dans le cas des virus à ARN. L'ensemble des biais d'analyse, dont la prise en compte reste encore incomplète à l'heure actuelle est un facteur à interpréter de manière extrêmement prudente et raisonnée avant de conclure sur un éventuel impact biologique, à plus forte raison quand les variants de faible fréquences constituent, en les sommant, la majorité de la population étudiée (177).

Par ailleurs, il est important d'analyser autant que possible les génomes viraux sans les fragmenter, afin d'étudier parfaitement les haplotypes viraux. Cette fragmentation reste néanmoins nécessaire, dans les technologies de séquençage à haut débit de 2^e génération (que ce soit sur phase solide, comme les technologies Illumina-Solexa ou en émulsion, comme les technologies Ion PGM/Proton) (178). Ces technologies permettent en effet le séquençage en quantité importante de séquences courtes (75 à 300 bases par *read*) obtenues après fragmentation, enzymatique ou mécanique. La reconstitution des génomes dans leur intégralité se fait donc *in silico*, par certaines solutions informatiques les reconstituant. Ces logiciels restent néanmoins imparfaits, car basés sur des calculs de probabilités. Comme dits précédemment, ces logiciels sont donc parfois à l'origine d'une augmentation/diminution de la diversification génomique. Pour limiter ces problèmes, l'utilisation (conjointe) de technologies de 3^e ou 4^e génération comme le PacBio ou le MinIon pourrait être envisagée. Grevées par de faibles fidélités, induisant un taux d'erreur parfois important, elles permettent néanmoins de séquencer les génomes viraux en un seul et unique read, sans fragmentation préalable. L'association des deux technologies permettrait donc de quantifier plus finement le nombre d'haplotypes, mais nécessitent néanmoins une optimisation de leur performances de séquençage en terme de fidélité (15 à 20% d'erreur pour le PacBio avant traitement informatique) (179).

Ainsi, une étude de Debbink *et al.* parue récemment insiste sur l'intérêt de quantifier la population introduite dans le processus de constitution des bibliothèques. Dans le cadre des études de diversité virale, il a ainsi été noté que d'importante variation de la charge virale présente initialement, influencent les performances de détection des polymorphismes génomiques, et par là, la quantité de diversité génomique mise en évidence (180).

Tableau 4. Estimateurs mathématiques de la diversité génomique. Abr. Abréviation. p : fréquence relative des espèces. Nu : nombre moyen de différences nucléotidique entre paires de séquences. L : nombre total de sites. N : nombre d'individus. D : espèces différentes parmi les S existantes.

Estimateur (année de publication)	Abr.	Formule	Groupe	Avantages	Inconvénients
Fréquences minimales ou maximales	n	$n = \sum_{k=1}^{S_{obs}} fk$	Abondance fonctionnelle	Utilisation et compréhension simple	Population de taille finie connue
Diversité nucléotidique	π	$\pi = Nu/L$			
Indice de Simpson (1949)	λ	$\lambda = \sum_{s=1}^S p^2$	Abondance relative	Valeurs intuitives	Poids majoré sur les espèces les plus abondantes
Indice de Shannon (1949)	H	$H(p) = \sum_{i=1}^K pi \log(pi)$		Insensible à la richesse spécifique	Saturabilité de l'indice
Indice de Hill (1973)	N_h	$N_h(\alpha) = \left(\sum_{i=1}^s pi \right)^{1/(1-\alpha)}$		Synthèse des indices de Shannon et Simpson	Interprétable en association avec l'un des Indices dont il est la synthèse
Indice de Chao2 (1987)	S	$S = D + \frac{(N-1)(f^2_1)}{2N(f_2)}$		Estimation de la fraction non observée par la présence de la fraction observée	Postulat de départ contraignant (N et grand et probabilité d'observation faible) Estimation du nombre minimum d'espèces en présence

3. Conséquences phénotypiques de la diversification génomique virale sur la virulence des infections virales

3.1. La diversification génomique virale comme facteur de virulence

Plusieurs études liant diversification génomique virales et virulence ont été réalisées dans le cadre des infections à *Poliovirus* (181,182).

Vignuzzi *et al.* ont pu mettre en évidence une mutation (G64S) augmentant la fidélité de la polymérase virale (« *high-fidelity enzyme* ») sans en altérer la processivité. Ils ont aussi pu confirmer la génération de population virale à faible diversité génétique. *In vivo*, cette population nouvellement formée ne pouvait pas être létale sans être administrée à très haute concentration (IC50 élevée), et directement dans le système nerveux central. En effet, ces virus mutés, clonaux, ne pouvaient franchir la barrière hématoencéphalique pour atteindre le site majeur de réplication du virus, à savoir le système nerveux central. Pour s'assurer de l'imputabilité de la restriction de diversification sur cette faible diversité, le virus muté a été artificiellement diversifié par adjonction de ribavirine ou 5-fluoro-uracile au milieu de culture (183). La population ainsi artificiellement générée, présentait une diversité et une létalité augmentée, allant jusqu'à égaler les souches virales sauvage et atteignant la dose létale de 1,6 millions d'unités formant plaque (« *plaque-forming unit* » ou PFU) par injection. Les auteurs ont confirmé leur découverte par l'administration orale de cette population artificiellement diversifiée initialement mais prélevée localement dans le LCR, qui ne conduisait pas à une dissémination neuroméningée. La population non diversifiée (diversification 2 à 3 fois plus faible) ne semble donc pas comporter de variants particulièrement létaux. Les auteurs concluent en évoquant l'idée d'une coopération entre variants viraux, permettant de franchir les différents obstacles à l'infection, que ce soit colonisation et franchissement de l'épithélium intestinal ou neuroméningé ou même détournement du système immunitaire. Cette expérience est résumée par la figure 15.

3.2. La diversification génomique virale limitant la virulence

En contradiction avec ce qui a été démontré sur les modèles de *Poliovirus*, la ribavirine, peut augmenter la fréquence de mutation au-delà d'un seuil tolérable, expliquant en partie son efficacité sur de nombreuses cibles virales ADN ou ARN (*Herpesviridae*, *Orthomyxovirus*, *Paramyxovirus*, *Filovirus*, ...), le virus étant conduit naturellement à son extinction (183,184). Contrairement aux notions introduites dans le paragraphe précédent, une importante mutagenèse par déstabilisation thérapeutique de la polymérase, peut donc, comme cela a été prouvé dans les espèces comme les virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) et les *Hantavirus*, conduire à la clairance virale (185–189). Les auteurs parlent donc de dépassement du seuil d'erreur toléré, ou « *error catastrophe* » (190).

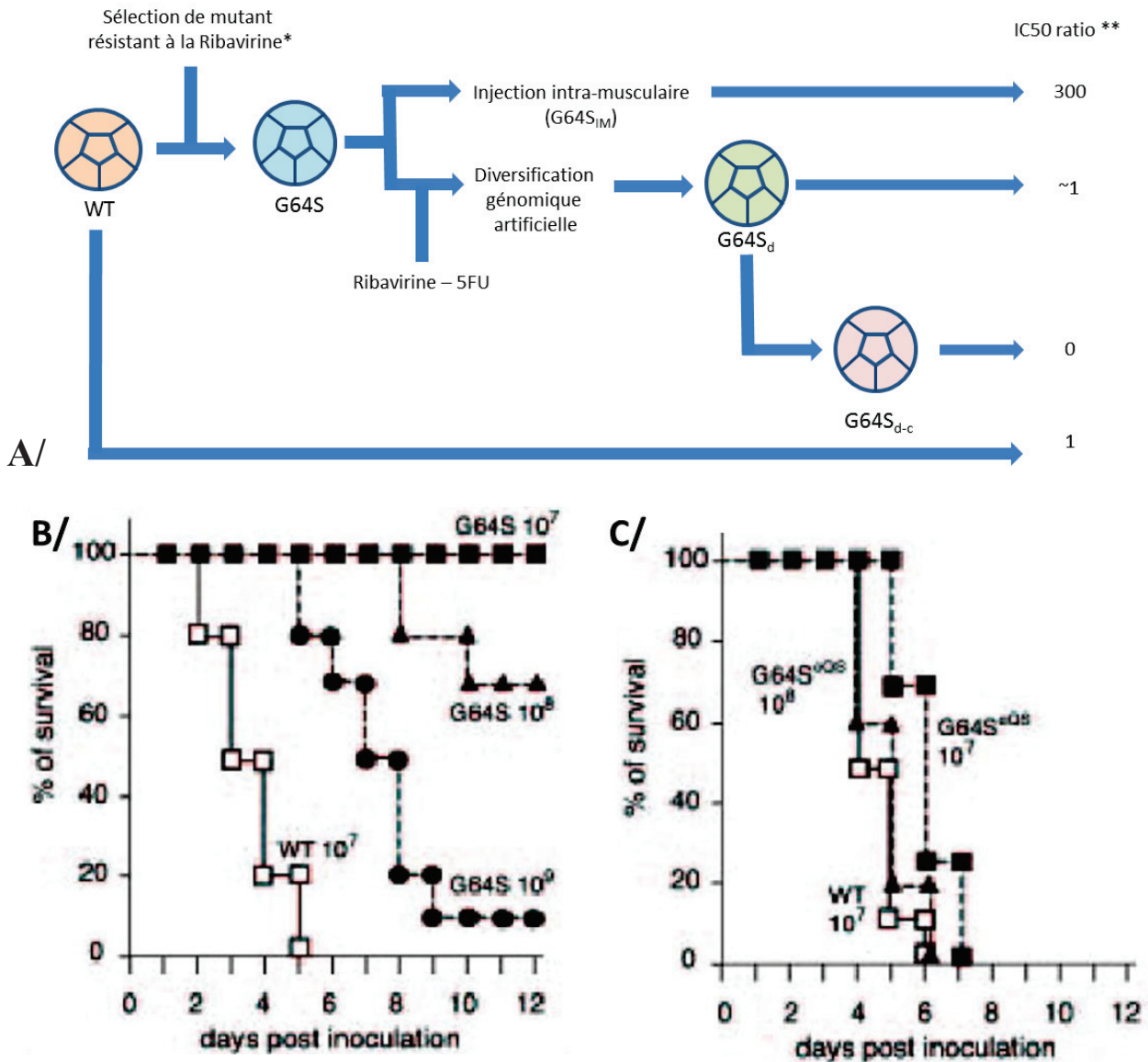


Figure 12. Impact clinique de la diversification génomique virale. A/ Processus analytiques ; **B/** Comparaison des souches sauvages et des souches à polymérase à fidélité augmentée ; **C/** Comparaison des souches sauvages et des souches à polymérase mutée artificiellement diversifiés (G64S^Qs). IC50 : quantité suffisante pour tuer 50% de la population infectée. WT : *Poliovirus* sauvage. G64S : *Poliovirus* mutant (polymérase à fidélité augmentée). G64S_d : population mutante diversifiée artificiellement. G64S_{d-c} : population mutante diversifiée artificiellement récupérée dans le liquide cérébro-spinal du sujet infecté. * sélection de mutant par culture. ** ratio déterminé par normalisation de l'IC50 à l'IC50 du virus sauvage. Dans le cas de la comparaison des souches sauvages et des souches à polymérase hyper-fidèle, la proportion de souris infectée survivant est bien plus basse avec les virus sauvages et ce, malgré une augmentation de l'inoculation (10⁶ à 10⁹ PFU). La diversification artificielle de ces mutants à fidélité augmentée rétablit une létalité des souches comparable à celle des souches sauvages.

Holland *et al.*, sur un modèle animal d'infection à VSV, ont pu montrer que l'exposition des virus à des mutagènes comme le 5 fluoro-uracile ou la 5-azacytidine restaure un taux de mutation identique à celui des virus sauvages, tout en gardant un pouvoir infectieux similaire. Ces résultats confortent l'hypothèse de dépassement d'un seuil de mutation, conduisant à la disparition des virus mutants, et donc à l'extinction de la population complète (191). La présence d'une population virale diversifiée artificiellement ou non pourrait aussi entraver le pouvoir infectieux de la sous-population virale naturelle. Ce phénomène, étudié dans le cadre des *Cocksackievirus* et du syndrome pied-main-bouche est dénommé « défection létale » (192,193). La principale hypothèse mécanistique serait liée à la formation de complexes protéiques interférant, codés par les virus anormalement mutés, limitant la réplication et donc la charge virale de la sous population sauvage.

L'applicabilité de l'utilisation clinique de mutagénèses virales létales a été montrée dès 2011, dans le cadre d'un essai clinique portant sur le VIH-1. Les auteurs ont pu démontrer que le taux de mutation du VIH-1 étant proche du seuil maximum d'erreur toléré, une augmentation, aussi minime soit-elle, conduit à l'extinction rapide de cette population (194). L'extrapolation de résultats *in vitro* afin de prédire le délai et l'efficacité de telles thérapeutiques dans le cadre de clinique humaine reste néanmoins très difficile, du fait, dans le cas du VIH, de la présence de réservoirs cellulaire ou d'impasse immunitaires, ainsi que de variations dans le fitness viral des souches mutées.

De même, si les molécules, habituellement utilisées dans le traitement de maladies cancéreuses, ont prouvé leur utilité dans les modèles murins d'infection à *Arenavirus*, aucune application médicale humaine n'a été validée à ce jour, du fait des très grandes variabilités des niveaux de mutagénèses nécessaires entre virus et situations cliniques (195). Ces seuils sont de plus difficiles à considérer comme un ensemble, du fait de leurs variations entre les régions nucléotidiques (196). Il est probable par ailleurs que ces thérapeutiques ne fonctionneront que chez les patients à système immunitaire efficace, les patients immunodéprimés ne pouvant pas, dans la plupart des cas, éliminer une infection virale, aussi « affaiblis » que soient les virus considérés.

En conclusion de cette partie, le taux de mutation viral est une conséquence évolutive finement déterminée par une accumulation de cycles réplcatifs. Même si une accumulation de mutation peut conduire à l'extinction d'une population, l'absence (ou le taux modéré) de mutation limite leur survie en milieux changeants, comme en cas de réponses hostiles

aux virus comme la réponse immunitaire de l'hôte. La survie d'un virus est donc la résultante de la plasticité et la stabilité génomique.

4. La diversification génomique des virus respiratoires

À l'inverse des modèles présentés ci-avant, peu d'études ont pu mettre en évidence de lien entre la diversité génomique virale d'un virus respiratoire et la sévérité clinique de la maladie dont il est responsable. Les virus respiratoires, principalement à ARN, ont fait l'objet de publications récentes définissant leur diversité génomique.

Avec un taux de mutation estimé entre 10^{-5} et 10^{-4} substitutions par nucléotide par cycle d'infection cellulaire, la polymérase et les substitutions qu'elle engendre est le moteur de l'évolution des virus *Influenza* (158). Cette évaluation des taux de mutation est probablement par ailleurs très sous-estimée, certains modes de détermination du taux de mutation montre un taux deux fois supérieur à celui observé par NGS (197,198). Chaque cycle réplcatifs étant responsables de 2 à 3 mutations des transversions (mutation de A vers G ou U vers C) et considérant que 28 à 31% des mutations ayant une conséquence létale, la probabilité de réplication efficace d'un génome virale ne représente qu'un tiers à la moitié des réplcations (199). Sur les virions ainsi produits, moins de 1% des virions possèdent un pouvoir infectieux, et ce, indépendamment du modèle cellulaire infecté. Ces caractéristiques placent les virus *Influenza* à la limite du taux d'erreur tolérable pour rester efficacement réplcatif (197). De plus, la génération de souches non-infectieuses impacte fortement l'ensemble de la population virale, et est donc un facteur de limitation de la virulence de l'infection (200).

Il est donc crucial pour construire des modèles complets de la maladie grippale de comprendre la diversification virale, aussi bien intra- qu' inter-hôte et autant dans sa génération que dans l'interaction des virus avec le système immunitaire de l'hôte infecté (163,201).

Cette diversité a été principalement étudiée chez les patients immunodéprimés ou dans le cadre des virus résistants (202). À noter que les antiviraux mutagènes (comme la ribavirine) ne sont aucunement associés à l'émergence de résistance, même après de nombreux passages sur culture cellulaire (200). Néanmoins, en l'absence de données cliniques complètes, les caractéristiques de la diversité génomique grippale au temps précoce

de la maladie ou au cours de l'évolution restent incomprises, car peu étudiées, même si ces quelques données suggèrent une diversité faible lors de l'infection.

Pour les VRS, une étude a montré la présence de région du génome hautement ou faiblement diversifiées (points chauds « *hotspots* » ou points froids « *coldspots* » de mutations) (196). Dans son ensemble, le taux de mutation du VRS est 100 à 1000 fois plus important que celui des virus *Influenza*, soit estimée à 10^{-3} substitutions par coordonnées nucléotidique par cycle d'infection cellulaire (203). Les régions de points chauds de mutation sont décrites comme les régions les plus variables (méthode d'optimisation du fitness viral, ou d'échappement au système immunitaire) et les régions de points froids de mutation comme les plus constantes du génome (régions codant une protéine fondamentale, au carrefour de nombreuses fonctions vitales du micro-organisme). Un génome présentant un nombre important de points froids conforte l'idée d'un virus restreint dans sa diversification, cohérente avec la faible diversification épidémiologique décrite au cours de l'épidémiologie des 50 dernières années (204). Ces données sont néanmoins à mettre en balance avec l'absence de corrélation entre ces variations génétiques et la sévérité clinique de l'infection. La diversification doit donc se voir comme la résultante de la proportion (et du taux respectif de mutations) de ces régions génomiques chaudes et froides.

La diversification théorique doit néanmoins être corrélée à la possibilité de transmission des variants, majoritaires comme minoritaires (166). La diversité transmise est toujours inférieure à la diversité à long terme, suggérant que les variants transmis ne correspondent pas à l'intégralité des variants générés (203). Cette transmission est un facteur impactant fortement la diversité génomique virale, indépendamment de toute considération de diversification. Dans le cadre d'une infection expérimentale par *Rhinovirus*, la diversité génomique virale retrouvée au temps précoce chez un hôte après infection n'est pas limitée par la transmission préférentielle d'une proportion faible de variants minoritaires, la quasi-totalité des variants étant secondairement retrouvée chez les hôtes après infection (205). À l'inverse, dans une étude de la transmission de la diversité génétique des virus grippaux, les auteurs ont mis en évidence l'association inverse entre sévérité de la maladie (ampleur de la fièvre) et transmission de diversité inter-hôte (162,206). Cette observation reste cohérente avec le « besoin » d'acquisition d'un large panel de mutation/réassortiment pour permettre l'obtention d'un fitness optimisé, à l'instar d'une boîte à outils permettant de répondre à de possibles nouvelles problématiques biologiques (166).

Conclusion

L'évolution des techniques de séquençage de nouvelle génération ouvre un champ majeur d'investigation en microbiologie. Initiée par le séquençage de Sanger, l'étude du génome viral a été considérablement accélérée depuis quelques années. Si de nombreuses études suggèrent un lien fort entre la diversité ou diversification génomique d'un pathogène et la sévérité clinique de l'infection, il reste néanmoins difficile d'obtenir des données cliniques suffisamment fiables dans le cadre des infections respiratoires virales. En effet, les formes bénignes sont souvent manquées par les études épidémiologiques, au contraire des formes sévères, systématiquement étudiées. La mise en place d'études prospectives, permettant des prélèvements à échéance fixe, est donc cruciale pour obtenir des informations exploitables. La compréhension du lien entre cette diversité et l'évolution de la maladie permettra d'améliorer la compréhension des maladies infectieuses, et permettra d'identifier, à terme, des biomarqueurs utilisables en routine clinique. L'utilisation de tels marqueurs optimisera la prise en charge des patients présentant des infections respiratoires virales, en cas de complications prévisibles. Le classement des espèces virales en fonction de leur sensibilité au seuil de catastrophe, permettra la mise en place de thérapies innovantes, déstabilisant seulement la polymérase virale. De plus, l'utilisation de polymérase à fidélité augmentée permettra la mise en place de processus industriels utilisant des souches à virulence atténuée voire annihilée, en vue de mettre en place des programmes vaccinaux à sécurité augmentée. Néanmoins, si les résultats possibles sont très encourageants, les limites de ces études restent principalement financières et humaines mais elles permettront à terme d'apporter des améliorations majeures à la prise en charge des maladies infectieuses virales.

Projet de Thèse

Comme nous l'avons vu dans l'introduction (**Partie A, Chapitre 1 ; Annexe A**), la maladie grippale est un problème de santé public récurrent dont l'impact saisonnier reste important malgré la présence d'une vaccination à la composition révisée chaque année et d'antiviraux efficaces si administrés précocement.

L'amélioration des techniques de séquençage et l'avènement de techniques de biologie moléculaire extrêmement performantes permettant une caractérisation des sous-populations au sein du microbiome permettent de démontrer que le virus grippal n'est pas seul responsable des symptômes ainsi que de leur gravité (**Partie A, Chapitres 2 et 3 ; Annexes B et C**). Ces technologies de séquençage ont permis l'étude d'une propriété virale à l'intérêt croissant, la diversification du génome viral, à l'origine de nombreuses populations minoritaires (**Annexe D**).

Les objectifs de ce travail de thèse étaient donc la caractérisation de ces facteurs dans le cadre de la pathogénèse grippale, en étudiant une large collection de prélèvements cliniques de patients consultants ou hospitalisés au sein des Hospices Civils de Lyon.

Dans la première partie de ce travail (**Partie B, Chapitres 1 et 2**), nous avons étudié les populations bactériennes constituant le bactériome respiratoire des patients infectés par la grippe, en corrélant les données du microbiote bactérien aux données cliniques. Dans la deuxième partie de ce travail (**Partie B, Chapitres 3 et 6**), nous avons étudié, par séquençage profond, les virus grippaux impliqués dans les formes cliniques de la maladie. Après avoir validé notre approche de séquençage profond en comparaison à une approche de biologie moléculaire innovante (PCR digitale) permettant une quantification absolue des cibles (**Partie B, Chapitre 3**), nous avons étudié la diversification des virus grippaux chez les patients immunocompétents (**Partie B, Chapitre 4**). Enfin nous avons étudié la diversité initiale au temps précoce de l'infection pour l'ensemble des patients immunocompétents ayant présenté une infection à virus *Influenza*, qu'ils présentent ou non des facteurs de risque de complication (**Partie B, Chapitre 5**). Nous avons enfin étudié la diversification des virus grippaux chez un hôte au déficit immunitaire profond (**Partie B, Chapitre 6**), cette situation constituant une particularité.

Partie B. Résultats

Chapitre 1. Microbiome respiratoires des populations pédiatriques un marqueur prédictif de l'évolution péjorative ?

1. Objectif

Cette étude a pour objectif de déterminer une signature microbienne discriminant les patients en fonction de leur devenir clinique, bénin ou sévère. Cette signature pourrait être utilisée en tant que marqueur pronostic des conséquences de l'infection grippale et ce, dès les temps précoces de la maladie.

2. Article publié

Langevin S., PICHON M., Smith E., Morrison J., Bent Z., Green R., Baker K., Solberg O., Gillet Y., Javouhey E., Lina B., Katze MG., Josset L. Early nasopharyngeal microbial signatures are associated with severe influenza in children. J Gen Virol, 2017 Aug.

À noter que ce travail a par ailleurs fait l'objet d'un brevet industriel, présent en **Annexe E**.

Early nasopharyngeal microbial signature associated with severe influenza in children: a retrospective pilot study

Stanley Langevin,^{1,2}† Maxime Pichon,^{3,4,5,*}† Elise Smith,¹ Juliet Morrison,¹ Zachary Bent,² Richard Green,¹ Kristi Barker,¹ Owen Solberg,² Yves Gillet,⁶ Etienne Javouhey,⁷ Bruno Lina,^{3,4,5} Michael G. Katze^{1,8} and Laurence Josset^{3,4,5,*}

Abstract

A few studies have highlighted the importance of the respiratory microbiome in modulating the frequency and outcome of viral respiratory infections. However, there are insufficient data on the use of microbial signatures as prognostic biomarkers to predict respiratory disease outcomes. In this study, we aimed to evaluate whether specific bacterial community compositions in the nasopharynx of children at the time of hospitalization are associated with different influenza clinical outcomes. We utilized retrospective nasopharyngeal (NP) samples ($n=36$) collected at the time of hospital arrival from children who were infected with influenza virus and had been symptomatic for less than 2 days. Based on their clinical course, children were classified into two groups: patients with mild influenza, and patients with severe respiratory or neurological complications. We implemented custom 16S rRNA gene sequencing, metagenomic sequencing and computational analysis workflows to classify the bacteria present in NP specimens at the species level. We found that increased bacterial diversity in the nasopharynx of children was strongly associated with influenza severity. In addition, patients with severe influenza had decreased relative abundance of *Staphylococcus aureus* and increased abundance of *Prevotella* (including *P. melaninogenica*), *Streptobacillus*, *Porphyromonas*, *Granulicatella* (including *G. elegans*), *Veillonella* (including *V. dispar*), *Fusobacterium* and *Haemophilus* in their nasopharynx. This pilot study provides proof-of-concept data for the use of microbial signatures as prognostic biomarkers of influenza outcomes. Further large prospective cohort studies are needed to refine and validate the performance of such microbial signatures in clinical settings.

INTRODUCTION

Seasonal influenza in children is a major burden on public health. It is estimated that between 20 to 30% of children are infected with influenza each winter (WHO). While most of the children develop uncomplicated influenza illness, between 1.5 to 4% of infected children are hospitalized for influenza complications [1] including pneumonia, asthma exacerbations, neurological complications and death [2]. Risk factors for hospital admission in children include age <2 years and having underlying medical conditions (such as

neurological disorders, prematurity, immunosuppression, diabetes, or sickle cell disease) [3]. However, about half of paediatric hospitalizations from seasonal influenza occur in children without a high-risk medical condition [4].

From a clinical perspective, failure to identify influenza-infected patients that have a higher risk of developing severe disease delays the delivery of appropriate treatment, and may have profound consequences for the recovery and long-term health of the patient. It has been reported, in an adult population, that a delay of 1 day from onset of

Received 27 April 2017; Accepted 13 August 2017

Author affiliations: ¹Department of Microbiology, School of Medicine, University of Washington, Seattle, Washington, USA; ²Department of Systems Biology, Sandia National Laboratories, Livermore, California, USA; ³University Lyon, Virpath, CIRI, INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, F-69372 Lyon, France; ⁴Laboratoire de Virologie, IAI, CBN, Groupement Hospitalier Nord, Lyon, France; ⁵Centre National de Référence Virus Influenzae, IAI, CBN, Groupement Hospitalier Nord, Lyon, France; ⁶Department of Pediatric Emergency, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Femme Mère Enfant, Bron, France; ⁷Department of Pediatric Intensive Care, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Femme Mère Enfant, Bron, France; ⁸Washington National Primate Research Center, University of Washington, Seattle, Washington, USA.

*Correspondence: Maxime Pichon, maxime.pichon01@chu-lyon.fr; Laurence Josset, laurence.josset@chu-lyon.fr

†These authors contributed equally to this work.

Keywords: microbiome; influenza; biomarker; children; emergency unit; intensive care.

Abbreviations: ACE, abundance-based coverage estimator; ANOVA, analysis of variance; CCEIRS, Centers of Excellence for Influenza Research and Surveillance; Ct, cycle threshold; DNA, deoxyribo nucleic acid; glm, generalized linear model; H, Shannon diversity index; ICU, intensive care unit; IRB, institutional review board; LOOCV, leave-one-out cross-validation; NMDS, non-metric multidimensional scaling; NP, nasopharyngeal; OTU, operational taxonomic unit; PRISM, paediatric risk of mortality; RNA, ribonucleic acid; VI/V3, variable region of the 16S DNA.

†These authors contributed equally to this work.

Sequence Accession Number: The Sequence Read Archive (SRA) accession number for the raw sequences is SUB1938413.

Six supplementary tables and three supplementary figures are available with the online Supplementary Material.

symptoms to hospital admission increased the risk of death from influenza-caused disease by 5.5 % [5]. Several attempts have been made to develop prognostic indicators that help to identify patients at risk of severe influenza disease progression. Influenza viral load is not predictive of clinical outcome [6], but increased serum levels for several cytokines in adults infected with 2009 H1N1 influenza virus are correlated with disease progression [7], and increased nasal levels of two proinflammatory cytokines are associated with severe influenza [6]. However, at present, there are no biomarkers readily available to the physician at the time of hospital admission that are able to predict the likelihood of disease progression in all patients.

Improving severe influenza prognosis and treatment requires a better understanding of influenza disease. Influenza severity is determined by a complex interplay between viral, environmental and host factors, which is not yet fully understood and which cannot be comprehended without looking at the system as a whole [8]. One factor that has been poorly studied and needs to be integrated in influenza pathogenesis models is the microbiome, defined as the microbial communities colonizing the human body (microbiota) together with the surrounding environment [9, 10]. Secondary bacterial pneumonia is a well-known cause of pulmonary complications resulting from influenza infection, and was reported as a major cause of mortality during the 1918 pandemic [11]. However, the idea that the microbiota might also be involved in influenza pathogenesis is a recent concept. Leung *et al.* recently reported that the oropharyngeal microbiota of a pool of patients with H1N1 pneumonia was different from that of patients with non-H1N1 pneumonia [12]. A second metagenomic study observed that patients infected with H1N1 had a higher amount of *Proteobacteria* in the upper respiratory tract than was observed in previously published normal reference nasopharyngeal (NP) microbial profiles [13]. This study also showed a variation in NP microbiota depending on patient age. However, sequencing was performed on pools of anonymized samples with no associated clinical data and therefore could not link specific changes in microbiota composition with different influenza outcomes.

In addition, several studies using mice have shown that the gut microbiota protects against influenza disease. Antibiotic-treated mice exhibit impaired antiviral immune responses following influenza virus infection, resulting in delayed viral clearance [14], while oral administration of probiotics in mice prior to influenza infection reduces viral titres [15]. Finally, a recent mouse study showed that *Staphylococcus aureus* colonization in the upper respiratory mucosa attenuated influenza infection compared with germ-free mice [16]. However, germ-free mice may not be appropriate to study the role of the microbiome in influenza, as they have important physiological defects, such as altered immune systems, which can perturb responses to influenza infection (reviewed in [17]). Further, there are

significant differences between the microbiomes of mice and humans [17].

Because of the heterogeneity of the respiratory microbiome in humans, and the low proportion of severe cases in seasonal influenza, large prospective studies are needed to link the respiratory microbiome with influenza severity in patients. As a proof-of-concept, we utilized NP specimens from a retrospective collection of influenza-positive samples from children infected with influenza virus with different disease outcomes, mild or severe, and tested whether specific bacterial species in the nasopharynx of patients at the time of hospitalization correlated with influenza disease severity. We determined a differential microbial signature discriminating patients with severe and mild influenza. Such a signature could be used as a prognostic biomarker for early diagnosis of severe influenza.

RESULTS

Selected patients

We profiled the microbial communities of 36 NP samples collected at the time of hospital arrival from patients classified retrospectively into two groups based on their clinical course: patients with mild influenza ($n=22$) or severe influenza ($n=14$) outcomes. Patients had been symptomatic for less than 2 days before hospital admission. None of the patients received antibiotics for up to 3 weeks before sample collection. After sampling, severe patients were treated preemptively. The demographics and clinical parameters of the 36 patients are summarized in Table 1 (baseline characteristics for Table 1a and follow-up characteristics for Table 1b). Among the patients who developed severe influenza, 4 patients had severe respiratory complications requiring ventilatory support and hospitalization in an intensive care unit (ICU), and 10 patients had neurological complications requiring hospitalization in the ICU ($n=6$ from 10; 60 %) or in other units. The most common neurological complications were coma ($n=4$ from 10; 40 %) and epilepsy ($n=5$ from 10; 50 %). The average time of hospitalization was similar among the two severe groups (7.4 and 9.8 days for the patients with neurological and respiratory complications, respectively). Patients with mild influenza were either discharged or hospitalized in emergency short-stay units. Their median time of hospitalization of 1 day corresponds to a monitoring of more than 6 h in emergency service, which is considered in France to be a hospitalization. Because of the insufficiently large number of patients included, no age- and sex-matched analyses could be performed on this cohort with adequate power. As the respiratory microbiome changes with age and sex [18], our results have been adjusted for these parameters in the rest of the study using multivariate analysis (see the Methods section). Finally, cycle threshold (Ct) values from influenza real-time RT-PCR, as described in the Methods section, were used as a proxy measure of viral load and were not significantly different between the groups, suggesting that there is no

Table 1. (a) Baseline demographic and clinical characteristics of all patients included in the study and (b) clinical evolution and therapeutic management of all patients included in the study

(a)		Baseline demographics and clinical characteristics	Severe influenza		
			Mild influenza	Neurological	Respiratory
Baseline demographics	No. of patients	22	10	4	
	Sex: male	7 (31.8 %)	4 (40%)	3 (75 %)	
	Median age in months (Q1–Q3)	3 (2–4)	16.5 (15–27.8)	17.5 (4.8–56.8)	
	Characteristics at the time of admission	Sample nature: NP aspirate	17 (77.3 %)	8 (80%)	4 (100%)
		Sample nature: NP swab	5 (22.7 %)	2 (20%)	0 (0 %)
		Days since symptom onset:0	6 (27.3 %)	2 (20%)	0 (0 %)
		Days since symptom onset:1	12 (54.5 %)	4 (40%)	1 (25 %)
		Days since symptom onset:2	4 (18.2 %)	4 (40%)	3 (75 %)
		Influenza B virus	3 (13.6 %)	2 (20%)	1 (25 %)
		Influenza A virus (H1N1)	6 (27.3 %)	4 (40%)	1 (25 %)
		Influenza A virus (H3N2)	12 (54.5 %)	4 (40%)	2 (50 %)
		Median influenza RT-PCR Ct (Q1–Q3)	20 (18.4–23.5)	21.5 (21–23.5)	28.5 (23.8–34.6)
		Comorbidities ^a : neurological disorder	0 (0 %)	2 (20%)	0 (0 %)
Comorbidities ^a : other (not known as a risk factor for severe influenza)	1 (4.5 %)	0 (0%)	3 (75 %)		
Comorbidities: none	21 (95.5 %)	8 (80%)	1 (25 %)		
(b)					
Outcome	Hospitalized in ICU	0 (0 %)	6 (60%)	4 (100%)	
	Median days hospitalized (Q1–Q3)	1 (0–3)	3 (2 - 3)	8 (7–10.8)	
	Median days hospitalized in ICU (Q1–Q3)	0 (0–0)	2 (0–3)	7.5 (4.8–10.8)	
	Ventilation	0 (0 %)	3 (30%)	4 (100%)	
	Signs of respiratory distress [†]	6 (27.3 %)	0 (0%)	4 (100%)	
	Bacterial pneumonia complicating influenza	0 (0 %)	1 (10%)	1 (25 %)	
	Coma	0 (0 %)	4 (40%)	0 (0 %)	
	Encephalitis	0 (0 %)	2 (20%)	0 (0 %)	
	Epilepsy	0 (0 %)	5 (50%)	0 (0 %)	
	Multiple or prolonged seizure	0 (0 %)	5 (50%)	0 (0 %)	
	Death	0 (0 %)	0 (0%)	0 (0 %)	
	Treatment	No antiviral	20 (90.9 %)	3 (30%)	0 (0 %)
		Antiviral: aciclovir	0 (0 %)	3 (30%)	0 (0 %)
Antiviral: Tamiflu		2 (9.1 %)	4 (40%)	4 (100%)	
No antibiotic		20 (90.9 %)	7 (70%)	1 (25 %)	
Antibiotherapy		2 (9.1 %)	3 (30%)	3 (75 %)	

^aNone of these comorbidities were previously associated with changes in NP microbiota composition. Neurological disorder: viral encephalitis sequelae and tuberous sclerosis of Bourneville. Other comorbidities: Down's syndrome for one patient in the mild influenza group and one patient in the respiratory complication group; Prader–Willi syndrome for one patient in the respiratory complication group; myopathy for one patient in the respiratory complication group.

[†]Signs of respiratory distress included: modification of breathing rate, increased heart rate, colour changes, grunting, nose flaring, retractions, sweating wheezing, stridor, accessory muscle use, or changes in alertness.

relationship between initial viral load and disease outcome, as previously described [6].

NP microbiota composition of children infected with influenza virus

Across all 36 respiratory samples, >5.2 million high-quality 16S RNA sequences were classified into 300 operational

taxonomic units (OTUs), with 101 OTUs supported by >1000 reads each (Fig. S1, available in the online Supplementary Material). All OTUs were classified up to the genus level and 49 % were classified up to the species level. The relative abundance is given for all 300 OTUs in each sample (Fig. 1a). Five OTUs dominated the NP bacterial profiles (defined as a relative abundance >50 % in at least one

Table 2. Taxonomy and average relative abundance for the OTUs differentially abundant between mild and severe influenza groups after adjusting for covariates (age, sex, sample nature and time since symptom onset)

	Genus	Species	Average relative abundance in mild influenza (%)	Average relative abundance in severe influenza (%)	P-value
OTU_3	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	9.4164	0.0094	0.0136
OTU_10	<i>Prevotella</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>	0.2967	2.3501	0.0381
OTU_16	<i>Prevotella</i>	NA	0.3789	2.1213	0.0011
OTU_22	<i>Streptobacillus</i>	NA	0.2686	2.0337	0.0021
OTU_31	<i>Porphyromonas</i>	NA	0.0001	0.3730	0.0220
OTU_64	<i>Veillonella</i>	<i>Veillonella dispar</i>	0.0527	0.6623	0.0234
OTU_80	<i>Fusobacterium</i>	NA	0.0040	0.3361	0.0082
OTU_85	<i>Haemophilus</i>	NA	0.0404	0.6245	0.0065
OTU_92	<i>Lachnospiraceae incertae sedis</i>	NA	0.0358	0.0954	0.0381
OTU_101	<i>Granulicatella</i>	<i>Granulicatella elegans</i>	0.0621	0.2280	0.0082
OTU_148	<i>Veillonella</i>	NA	0.0381	0.1316	0.0409
OTU_355	<i>Veillonella</i>	NA	0.0003	0.0152	0.0442

sample). Among these five OTUs, the genera were *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Haemophilus* (Fig. 1b). *Moraxella catharrhalis* was found as the dominant species in 11 out of 36 samples (30%). *Moraxella nonliquefaciens* was also detected and was the dominant species in four samples. *Staphylococcus aureus* was the dominant species in two samples. OTU_4 was only classified to the genus level – *Streptococcus* – and was the dominant species in five samples. Finally, OTU_5 (*Haemophilus*) was the dominant OTU in four samples. In the remaining 10 (28%) samples, there was more than one dominant OTU: for three samples, there were two major OTUs (with a relative abundance of between 25 and 50%), and for seven samples the bacterial profiles were more complex. Importantly, the presence of a dominant OTU was not significantly associated with influenza outcomes after adjustment with covariates (Table S1). To validate the bacteria taxonomy classifications inferred from the 16S ribosomal profiling, we performed shotgun metagenomic sequencing on a subset of NP specimens obtained from patients with mild ($n=10$) and severe ($n=10$) influenza. Comparable bacterial compositions were found in the 16S targeted sequencing and shotgun metagenomic datasets (Fig. S2).

NP microbiota composition differentiates influenza outcomes

To examine whether variations in the composition of NP bacterial communities were related to the clinical and/or demographic characteristics of the patients, a UniFrac distance matrix was calculated and used in PerMANOVA analyses against five clinical variables (clinical outcome, days between sampling and symptom onset, patient's age, patient's sex and nature of sample). This analysis revealed that differences in NP microbiota composition were strongly associated with influenza outcomes (P -value=0.00025) (Fig. 2 and Table S2). Similarly, unsupervised hierarchical clustering of the samples based on whole-microbiota profiles, was able to segregate mild and severe cases, with all but one patient with mild influenza belonging in the first cluster,

and all but four patients with severe influenza belonged in the second cluster (Fig. S3). The age of the patients was also associated with NP microbiota composition in PerMANOVA analysis (P -value=0.03450), but less strongly than influenza outcome. There was no evidence of significant interaction between age and clinical outcome in terms of an effect on NP microbiota composition (Table S2). Finally, we tested whether there was a difference in microbiota composition between patients with respiratory or neurological complications. After adjusting for covariates, the type of severe influenza complication was not significantly associated with whole-microbiota profiles (Table S3).

Patients with mild influenza have a less diverse NP microbiota than patients that develop severe influenza

We further tested whether NP microbiota diversity (alpha diversity) was also associated with the patients' demographics and/or clinical features. Several diversity indices were calculated (Fig. 3) and were further used in statistical analysis to examine whether species diversity in NP samples were related to five variables (clinical outcome, days between sampling and symptom onset, patient's age, patient's sex, nature of sample). Using multiway ANOVA, we found that NP microbiota diversity, as estimated by the Shannon diversity index (H), ACE, Chao1, Fisher and Simpson indices, was strongly associated with influenza outcome (Table S4). Simpson's reciprocal index was the only one that was not significantly associated with influenza outcome (Table S4). This observation could be linked to the size of the cohort, with this index being the most sensitive to a lack of power. Patients with mild influenza had significantly lower bacterial diversity (average $H=0.57$) than patients with severe influenza (average $H=2.03$). The NP microbiota diversity was weakly associated with patient age (Table S4). There was no evidence of significant interaction between age and clinical outcome, in terms of an effect on NP microbiota diversity (Table S4). In addition, there was no significant difference in microbiota diversity between patients with neurological and respiratory

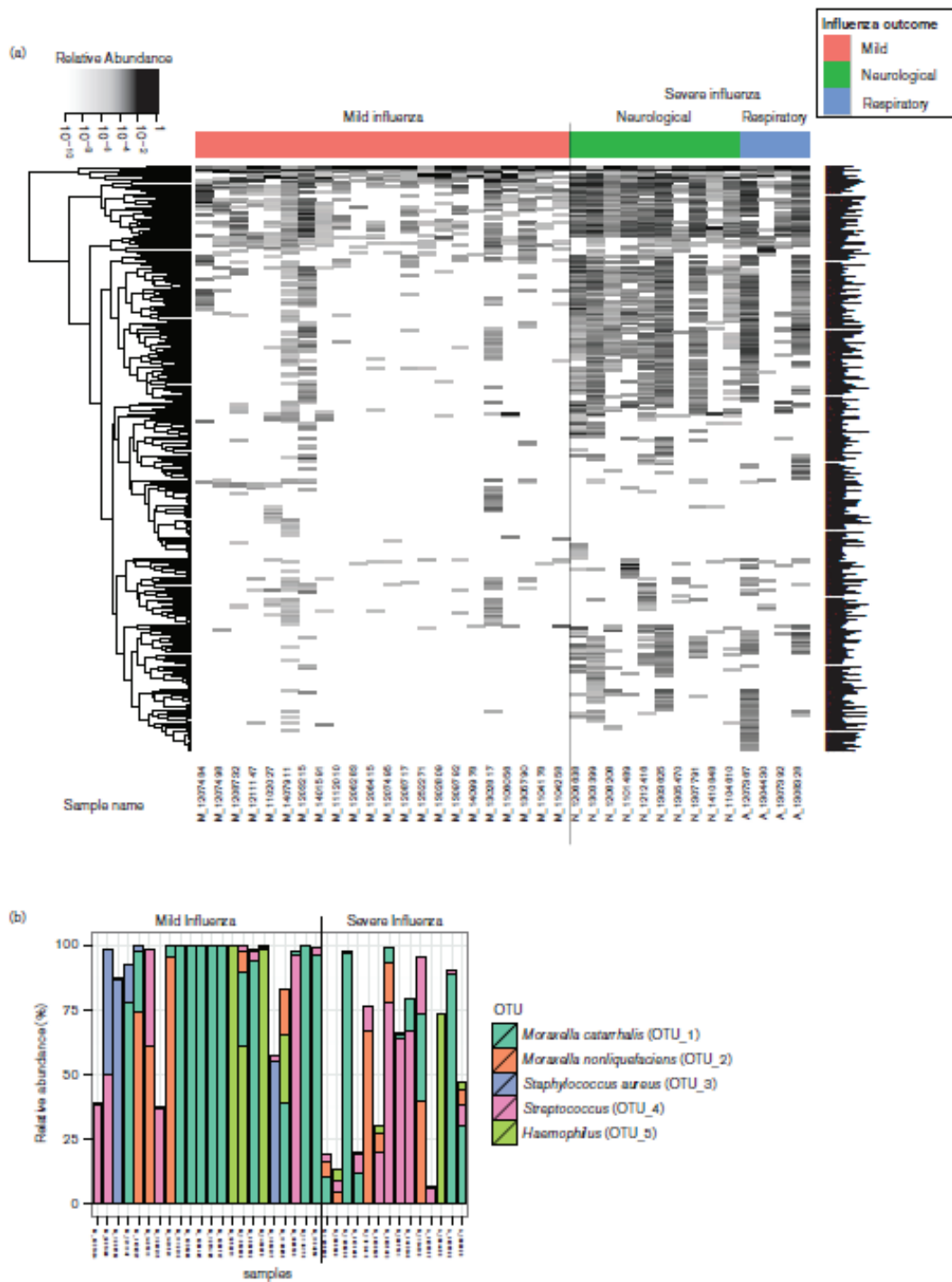


Fig. 1. NP microbiota composition associated with each respiratory sample. (a) heat map displaying the relative abundance of the 300 OTUs detected in each NP sample. Relative abundance is shown with a black to white gradient scale, with OTUs that were not quantified in white, and OTUs with a relative abundance of 1 in black. The samples were ordered based on patient group and sample number. OTUs were clustered based on their relative abundance values across samples using Euclidian distances and a complete linkage

function. (b) Bar plot showing relative abundance of the five most abundant OTUs in each sample, coloured by OTUs. The samples were ordered as in (a).

complications (Table S5). Overall, we found that increased bacterial diversity in the upper respiratory tract was associated with influenza severity.

Differential microbial abundance between patients with mild or severe influenza

Statistical analysis to characterize the differential microbial species abundance between patients with mild influenza and patients with severe influenza was performed using a generalized linear model, adjusting for age, sex, time since symptom onset and sample nature. Twelve OTUs were found to be differentially abundant between the two groups of patients (Fig. 4a). The average abundance in each group for the 12 differential OTUs is given Table 2. Among the differential OTUs, one was among the five most abundant OTUs detected in the respiratory microbiome profiles: *Staphylococcus aureus* was more abundant in patients with mild influenza than in patients with severe influenza (Table 2).

The remaining 11 differential OTUs had limited abundance (<3% on average) and were all more abundant in patients with severe influenza. The genera of these 11 OTUs were: *Prevotella* for two of them, *Streptobacillus*, *Porphyromonas* and *Veillonella* for three of them, and *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Lachnospiraceae incertae sedis* and *Granulicatella*. Some of these OTUs were detected almost exclusively in patients with severe influenza, for example *Porphyromonas* (OTU_31) was detected in 11 (76%) patients with severe influenza, but only 2 (9%) patients with mild influenza.

In addition, we performed a similar statistical analysis on the severe influenza group only, to determine whether there were differences between patients with neurological and respiratory complications. Seven OTUs (*Moraxella catarrhalis*, *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Dolosigranulum pigrum*, *Chryseobacterium*, *Prevotella* and *Parvimonas micra*) were found to be differentially abundant (Fig. 4b and Table 3). Except for *Moraxella catarrhalis* and *Parvimonas micra*, these

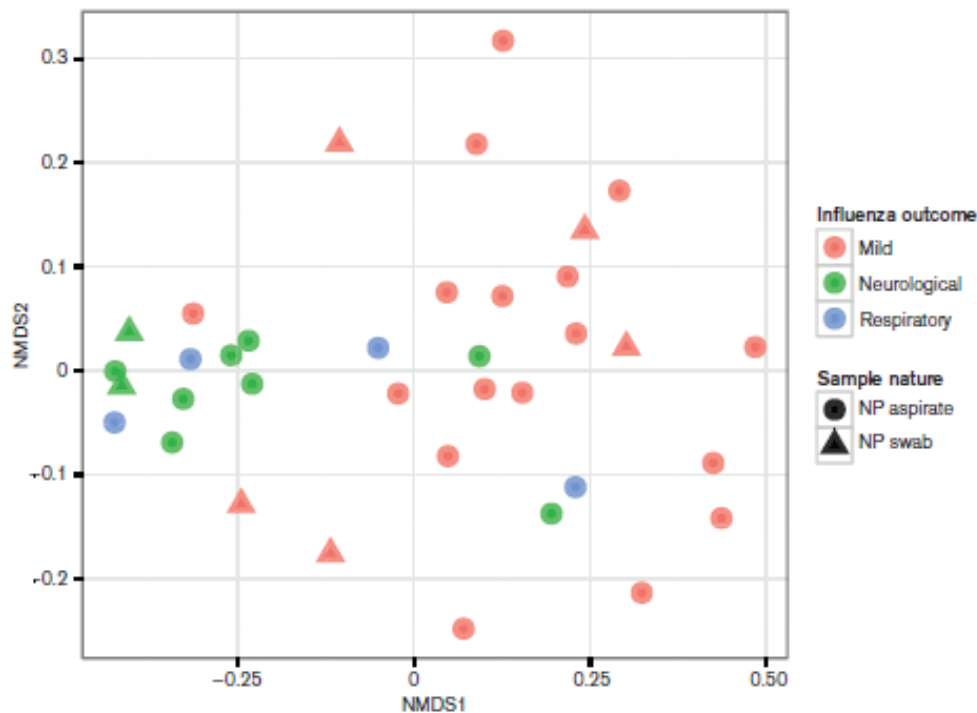


Fig. 2. The NP microbiota composition differentiates influenza severity. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot comparing the global NP microbial profiles with distances calculated using Unifrac distance. Each dot represents a sample: samples with similar microbial profiles are close together in the NMDS plot, while increasing distances in the plot between samples suggest divergent microbial profiles. Patients' groups are depicted with different colours, and the sample natures (NP aspirate or swab) with different shapes. Stress=0.1102

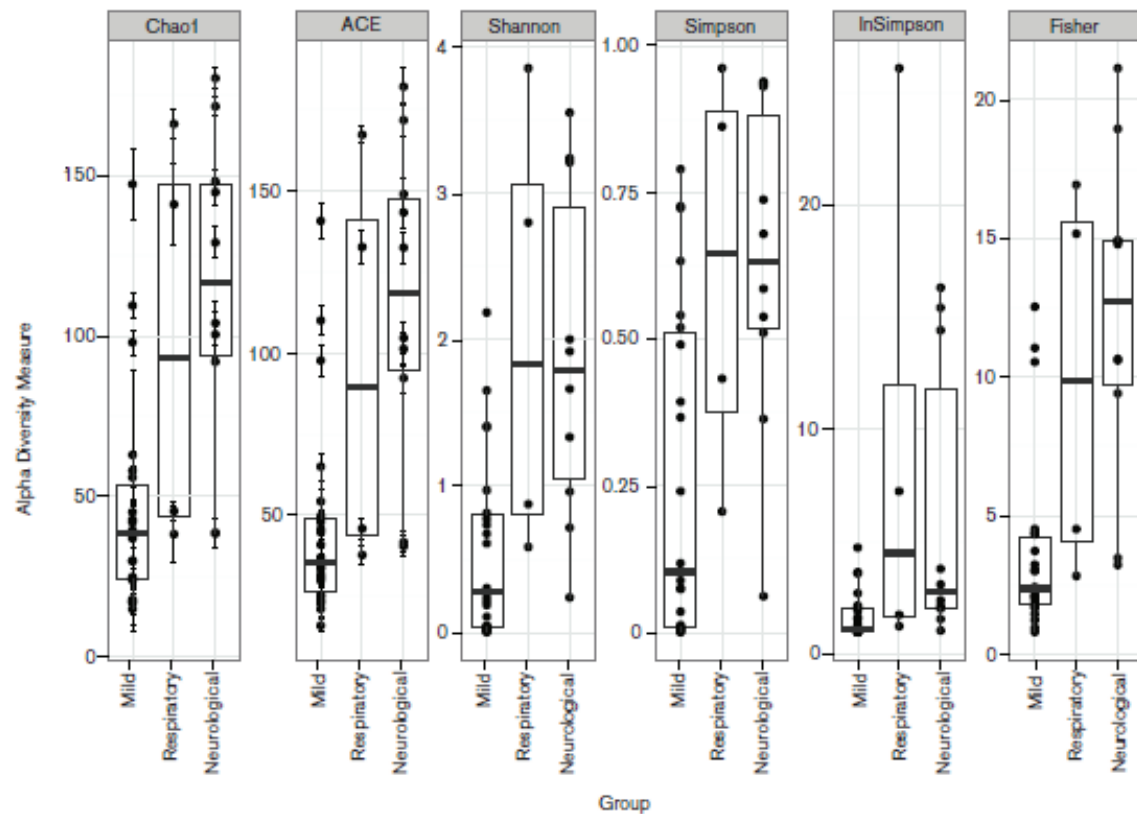


Fig. 3. Patients developing severe influenza have more diverse NP bacterial communities than patients with mild influenza. Box plots showing different alpha diversity measures for the three groups of patients (mild, neurological complications and respiratory complications).

OTUs were significantly more abundant in neurological severe forms than in respiratory severe forms. As already described, *Moraxella catarrhalis* remain abundant in both severe forms (17.39% vs 29.89%), unlike all other OTUs, with limited abundance in both groups (<1% in average).

Minimal microbial signatures classify mild versus severe cases

To determine whether a smaller subset of OTUs could efficiently classify patients into mild and severe groups, we used an association rule mining algorithm among differentially abundant OTUs. To test the signatures' predictive performance, we used the trained rules to determine the influenza disease severity of patients excluded from the training set [leave-one-out cross-validation (LOOCV)]. In addition, only rules that were found in all cross-validation instances were considered to be robust. This analysis revealed 5 robust association rules comprising two to three OTUs able to classify mild versus severe patients with cross-validated sensitivity of up to 93% and specificity of up to 100% (Table 4). For instance, the quantification of OTU_22 (*Streptobacillus*) at a

relative abundance higher than $8.8e-06$ and the quantification of OTU_85 (*Haemophilus*) at a relative abundance higher than $4.8e-05$ predict that the patient will develop a severe influenza with a sensitivity of 92.86% and a specificity of 90.91%. The performance of these different rules needs to be validated in prospective cohort studies, but these data indicate that microbial signatures comprising very few bacterial species have the potential to predict influenza outcomes with substantial accuracy.

Altogether, these results demonstrate that differences in NP microbiota composition early after infection are associated with influenza severity and provide proof-of-concept data for the use of microbial signatures as prognostic biomarkers of influenza outcomes in a clinical setting.

DISCUSSION

Influenza virus transmission and pathogenesis in humans is unpredictable at the population and individual level in terms of clinical severity. While rapidly identifying patients at risk of influenza complications is crucial for patient

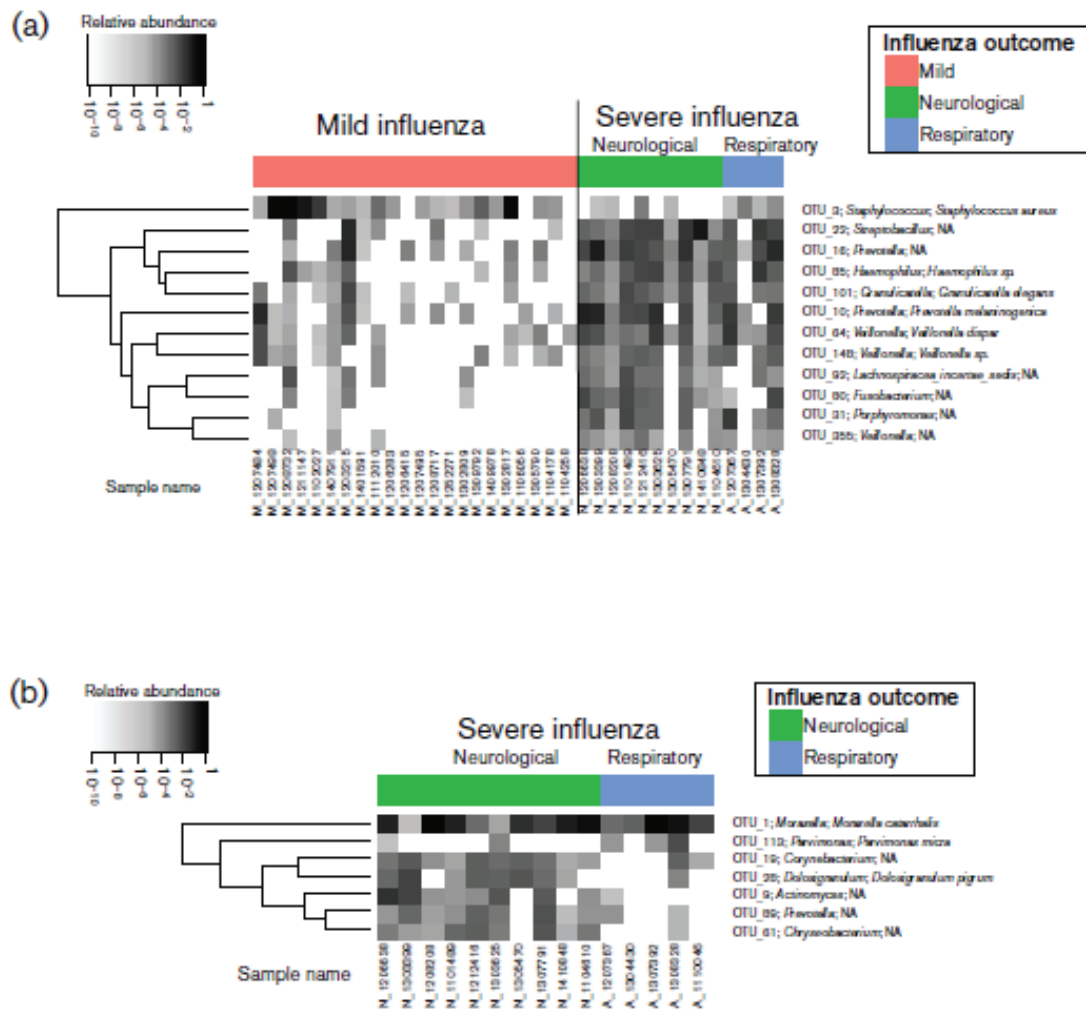


Fig. 4. Bacterial species that were differentially abundant between patients with mild and severe influenza (a) and between patients with respiratory and neurological complications. (b) The heat map shows the relative abundance of 12 OTUs that were found to be differentially abundant between patients with mild or severe disease after adjustment for covariates (P -value < 0.05). Relative abundance is shown with a black to white gradient scale, with OTUs that were not quantified in white, and OTUs with a relative abundance of 1 in black. The samples were ordered based on patient group and sample number. OTUs were clustered based on their relative abundance values across samples using Euclidian distances and a complete linkage function.

management and survival, there is currently no host biomarker assay available to predict influenza severity at the time of infection. In this study, we used a retrospective collection of early NP samples from children infected with influenza virus to test the feasibility of using a prognostic microbial signature to predict influenza disease outcome in a clinical setting. By comparing the relative abundance and diversity of microbial populations in the upper respiratory tract of children at the time of hospitalization, we identified bacterial profiles that differentiated children that developed severe disease versus non-progressive mild influenza infection using five different diversity indexes. All but one

showed statistical differences between these two groups. This difference was not significant for Simpson's reciprocal index, the most dependent on cohort size (as reviewed in [19]). To our knowledge, this is the first study associating influenza severity with NP bacterial composition in children.

There are a limited number of studies describing the composition of the respiratory tract microbiota in healthy and diseased children. Studies profiling the NP microbiota have reported that healthy children younger than 2 years old have their upper respiratory tract colonized by one predominant

Table 3. Taxonomy and average relative abundance for the seven OTUs that were differentially abundant between patients with respiratory and neurological complications after adjustment for covariates (age, sex, nature of sample, time since onset of symptoms)

	Genus	Species	Average relative abundance in patients with neurological complications (%)	Average relative abundance in patients with respiratory complications (%)	P-value
OTU_1	<i>Moraxella</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	17.3854	29.8941	0.0249
OTU_9	<i>Actinomyces</i>	NA	0.7323	0.0001	0.0107
OTU_19	<i>Corynebacterium</i>	NA	0.1472	0.0627	0.0118
OTU_28	<i>Dolosigranulum</i>	<i>Dolosigranulum pigrum</i>	0.3227	0.0094	0.0425
OTU_61	<i>Chryseobacterium</i>	NA	0.1308	0.0004	0.0124
OTU_89	<i>Prevotella</i>	NA	0.1176	0.0040	0.0301
OTU_113	<i>Parvimonas</i>	<i>Parvimonas micra</i>	0.0037	0.2264	0.0424

commensal bacterial genera consisting of *Moraxella*, *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Dolosigranulum*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Flavobacteria* or *Neisseria* [18, 20–22]. Similarly to these studies, we found that most of the children infected with influenza had microbial compositions in their nasopharynx that were dominated by one bacterial species, with *Moraxella*, *Streptococcus*, *Haemophilus* and *Staphylococcus* representing the most abundant bacterial genera. However, the nasopharynx microbiomes of children infected with influenza were not colonized with Gram-positive commensal species (*Anoxybacillus*, *Dolosigranulum*, *Corynebacterium* and *Lactococcus*). It is possible that influenza virus induced a decrease in the abundance of these species early after infection. Interestingly, these Gram-positive commensal species have been shown to control the abundant colonization of pathobionts such as *H. influenza*, *S. pneumoniae*, *S. aureus*, or *M. catarrhalis* and enhanced risk of acquiring acute otitis media [21, 23], pneumonia and bronchiolitis [24]. In future studies, it will be interesting to follow the respiratory microbiome dynamics longitudinally prior and post-influenza infection to characterize early virus–microbiome interactions.

The most common genus found in our population was *Moraxella*, with two main species, *M. catarrhalis* and *M. nonliquefaciens*. High abundance of *M. nonliquefaciens* was previously associated with viral pneumonia caused by adenovirus, rhinovirus or enterovirus, respiratory syncytial virus, or human metapneumovirus infections [20]. In addition, *Moraxella* versus *Alloicoccus* colonization is associated with increased respiratory syncytial virus infections

and severity [22]. As we could not profile the NP microbiota of healthy children in parallel with influenza-infected children, we could not determine whether *Moraxella* colonization was also associated with influenza infection, but we found that *M. catarrhalis* and *M. nonliquefaciens* relative abundance were not predictive of influenza severity after adjustment for covariates, but were predictive of neurological versus respiratory complications. Further evaluation of the effect of specific virus–microbiome interactions is necessary to better define the respiratory microbiota and its influence on clinical disease outcomes for acute respiratory infections in children.

In our study, severe influenza infection was predicted by increased bacterial diversity in the nasopharynx of children. In addition, a microbial signature of 12 OTUs was able to discriminate patients developing severe versus mild influenza. Eleven of these 12 OTUs had higher abundance in severe patients, and included the following genera: *Prevotella*, *Streptobacillus*, *Porphyromonas*, *Granulicatella*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Lachnospiraceae incertae sedis* and *Haemophilus* spp. Except for *Haemophilus*, these genera all belong to obligate or facultative anaerobic bacteria. The species that were found to be more abundant in patients with severe influenza included *Prevotella melaninogenica*, and *Veillonella dispar* – which are anaerobic Gram-negative bacteria that are part of the normal oral [25] and respiratory tract microbiota [26] and can cause anaerobic pulmonary infections [25] or meningitis and endocarditis [27] – and *Granulicatella elegans*, a member of the nutritionally variant streptococci, which are common components of the oral microbiota that have been

Table 4. LOOCV performance characteristics of minimal microbial signatures in discriminating patients with mild versus severe influenza outcomes. Only the rules predicted in all cross-validation instances are displayed in this table. Sensitivity and specificity were calculated using out-of-sample predictions. The rules are sorted based on specificity values, and are placed in descending order.

Patient classified as severe influenza if the following OTUs are detected (with relative abundance)	Sensitivity	Specificity
OTU_16 (>7.6e-05)&OTU_22 (>8.8e-06)&OTU_148 (>3.8e-05)	78.57	100
OTU_22 (>8.8e-06)&OTU_101 (>1.3e-05)&OTU_148 (>3.8e-05)	78.57	95.45
OTU_22 (>8.8e-06)&OTU_85 (>4.8e-05)	92.86	90.91
OTU_22 (>8.8e-06)&OTU_101 (>1.3e-05)	85.71	90.91
OTU_22 (>8.8e-06)&OTU_64 (>5.2e-05)	85.71	90.91

associated with endocarditis and septicaemia [28]. Only one OTU was more abundant in patients with mild symptoms: *Staphylococcus aureus*. This is in line with the study of Wang et al., which reported that *S. aureus* priming prevents influenza-mediated lung injury in a mouse model [16]. In the proposed mechanism *S. aureus* induces monocyte polarization into M2 alveolar macrophages via Toll-like receptor 2 signaling, which inhibits influenza-mediated lethal inflammation [16]. Based on our pilot study, the higher abundance of *S. aureus* in mild non-progressors could explain the lack of severe clinical manifestations observed in our patient cohort, while the presence of a diverse nasopharynx microbiota containing multiple pathobionts significantly increased the risk of acquiring severe influenza-related disease. Furthermore, we compared each of the two severe influenza groups. Seven OTUs were significantly more diverse in one group, the respiratory group for two of them (*Moraxella catarrhalis* and *Parvimonas micra*), and the neurological group for the rest of them (*Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Dolosigranulum pigrum*, *Chryseobacterium* and *Prevotella*). Physiologically, all of these bacteria were commensal of the respiratory tract and oral cavity. They were mainly described in pneumonia and periodontitis infections, but could also be the cause of central nervous system infections, bone infections and endocarditis [29–31]. Interestingly, *Dolosigranulum pigrum*, which is associated with the development of kerato-conjunctivitis, has already been characterized in the respiratory tract microbiome as belonging to a health-associated community that has been developing recently in children born by caesarean section [32]. Note that this analysis remains to a large extent underpowered because of the small number of patients in each severe group in this study.

It is noteworthy that the use of microbial signatures to predict clinical outcomes for influenza could be reduced to only two–three OTUs. If this proves to be robust in future studies, such signatures could open up the possibility of developing a real-time clinical assay using current technology. Rapid PCR panels that accurately quantify both bacterial and viral species [33] could facilitate a practical implementation of prognostic microbial signature-based assays simultaneously with acute respiratory virus diagnostics in a clinical setting.

Our study has limitations that are inherent in its retrospective nature. First, despite the large number of samples ($n=372$) from children infected with influenza virus available in our collection, only 36 samples (9.7%) met our selection criteria. Because of our relatively small cohort, we could not match the patient groups in sex and age. As age and sex were described as being important factors that modify the microbiota in the nasopharynx [18, 22], we had to adjust for these potential confounders in statistical models. We found that the main factor influencing the NP microbiota was age. Sex was not associated with microbiota composition and diversity, as expected for young prepubescent children. The microbiome was also described as changing with seasons [18]. However in our study, samples were

collected over different years, but all were collected during the influenza season (January–March), so there was no seasonal effect to account for. Finally, due to the retrospective nature of our pilot study we could not compare the performance of our signature with existing clinical severity scores, such as the pediatric risk of mortality (PRISM III). The differences in number between the neurological and respiratory groups ($n=10$ vs $n=4$) could be explained by the administration of antimicrobial therapeutics in patients with respiratory complications before the NP sample was collected. Indeed, children with respiratory distress were most likely to have had pre-emptive antibiotics administered at hospital admission before sampling, and so were excluded from analyses. In contrast, when children developing neurological complication had antibiotics administered, this was mainly during hospitalization after NP sample was collected, and the treatments administered prior to admission were mostly anti-epileptic treatments.

Future studies will involve the enrolment of prospective cohorts of children admitted in the emergency departments with longitudinal sample and clinical data collection to validate our microbial signature performance and analyse host–virus–microbiome interactions. Studies that integrate microbiome analysis with a systems biology approach to influenza pathogenesis will accelerate the development of novel diagnostic tools and personalized therapeutics to combat influenza virus infections in children.

METHODS

Ethical statement

Respiratory samples (NP aspirate or swab) were collected for regular disease management during hospital stays and no additional samples were taken. For the purpose of this study, patient confidentiality was strictly protected and informed consent was obtained. This study was approved by the ethical committee of Hospices Civils de Lyon on 14 October 2014. The study was also approved by the University of Washington IRB under expedited category 5 (human subjects application #49811).

Patient selection

We analysed 372 clinical records from children (≤ 15 years) who were admitted to a paediatric hospital (Hôpital Femme-Mère-Enfant, Hospices Civils de Lyon, France) in 2011–2014. All of the analysed samples tested positive for influenza A or B virus using the respiratory multi-well system MWS r-gene kit (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) during routine testing in the virology department of the University Hospital of Lyon. Ct could be obtained and were considered to be an estimated viral load in the sample.

In order to define a prognostic signature, only patients who were symptomatic for less than 2 days and had a respiratory sample collected at the time of hospital arrival were selected. Based on their clinical course after sample collection, patients were classified into two groups: patients with mild influenza or patients with respiratory or neurological

complications (the severe influenza group). The criteria used for classifying children in the severe influenza group with respiratory complications were: utilization of invasive or non-invasive ventilation, blood gas alteration (hypoxemia <95 % in arterial sample) and hospitalization in the ICU for respiratory complications. Neurological complications were defined as symptoms that affected the central or peripheral nervous system, including seizures, encephalopathy, encephalitis, or any focal neurological symptom [34]. Patients with neurological complications were hospitalized either in the ICU or in neurology units specializing in the management of encephalitis or epilepsy. We excluded patients with incomplete clinical files, as well as patients who had received antibiotics prior to respiratory sample collection, as this treatment likely perturbs the microbiome. Other exclusion criteria included known risk factors for severe influenza (defined as chronic respiratory diseases, cardiac diseases, metabolic diseases, immunosuppression, etc.) and known chronic disease associated with respiratory microbiota dysbiosis (such as severe asthma, etc.) [3]. Note that two patients had Down's syndrome, one in the mild influenza group and one in the severe influenza group. In addition, in the respiratory group one patient presented with Prader-Willi syndrome and another presented with an uncategorized myopathy. While individuals with Down's syndrome, Prader-Willi syndrome and myopathy are known to be at risk of respiratory problems, these comorbidities have not been associated with modifications in the NP microbiome, and so we did not exclude these patients. In total, 72 patients were selected, including 42 patients with mild influenza, 11 patients with respiratory distress symptoms and 19 patients with neurological complications. We extracted DNA and RNA using Nudisens EasyMag. Only 36 patients had samples with sufficient quantity and quality of DNA for sequencing, including 22 patients with mild influenza, 4 patients with respiratory distress symptoms and 10 patients with neurological complications.

16S rRNA sequencing and analysis

Genomic DNA was extracted from de-identified patient respiratory samples ($n=36$). Custom primers were synthesized to amplify a 510 bp fragment containing variable regions V1-V3 of the 16S ribosomal gene. Briefly, 5 ng of genomic DNA from each sample was used as a starting template to generate the V1-V3 amplicon libraries. All genomic DNA was subjected to 20 cycles of PCR (Failsafe, Epicentre) and the 16S amplicons were cleaned using 0.8X AMPure XP beads (Beckman Couter, Inc.) following the manufacturer's instructions. Nextera dual index adaptors (Nextera XT adaptors, Illumina, Inc.) were incorporated by performing 10 PCR cycles (Failsafe, Epicentre), cleaned using 1.1X AMPure XP beads (Beckman Couter, Inc.), quantified using a qubit (DNA high sensitivity, Life Technologies) and multiplexed using equal molar ratios of DNA for each sample. The final 16S libraries were loaded on a MiSeq sequencer at 2 pM with 5 % PhiX control and sequenced using custom Illumina read primers to eliminate the V1-V3 16S primer sequences (Table S6). Each sample had an average of 150K

read depth (300bp, paired end) and all 16S ribosomal sequences were classified using the UPARSE metagenomic pipeline [35]. Briefly, this pipeline removed low-quality reads, merged the paired reads to generate ~430 bp fragments, removed sequence artifacts (chimeric sequences and sequence errors), mapped full-length reads to a highly curated 16S ribosomal database derived from the RDP 16S training set (v14), identified sequence reads to genus/species level with a 97 % cut-off based on OTU classification and generated summary tables for downstream statistical analyses. In total, all samples passed our cut-off of at least 50 000 high-quality 16S DNA sequence reads per sample and all OTUs were classified to the genus level (Fig. S1). Rarefaction curves were performed to verify that sampling had exhausted the diversity at the sequence read depth cut-off of 50 000 reads per sample (Fig. S1c). For classification to the species level, we blasted the OTU representative sequences against the SILVA Ref NR99 database (release 119), from which uncultured species were removed. We used BLASTN with the following parameters: '-evalue 1e-50 -perc_identity 99'. The BLAST results were further filtered to only keep results that were identical (up to the genus level) to the UPARSE classification.

The raw sequence data were deposited at SRA (SUB1938413).

Metagenome sequencing and analysis

Genomic DNA (5 ng) from 10 mild and 10 severe influenza patients were fragmented and tagged using Nextera transposase following the manufacturer's instructions (Nextera XT DNA library kit, Illumina). Dual-index adaptors were incorporated by PCR (14 cycles) and the final libraries were multiplexed for sequencing. The final library was loaded on a NextSeq 500 using a 300 cycle high-output kit. All reads were demultiplexed, the adaptor sequences were removed and low-quality reads were discarded. High-quality reads were aligned to a reference mammalian ribosomal RNA database and the human hg19 genome using STAR aligner. Unmapped nonhuman reads were classified using Kraken metagenome analysis software and the MiniKraken DB using the default settings [33]. Genus/species level identification, including total read counts for each bacterial group, was determined.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R statistical Software. The R 'phyloseq' package [36] was used to calculate abundance-based richness estimators (e.g. Chao1 and ACE) and diversity indices (e.g. Shannon, Simpson and Fisher). Multi-way ANOVA (type III) was used to identify the covariates associated with each diversity index. The R phyloseq package was also used to calculate the distance metrics (Bray-Curtis and weighted Unifrac) and visualize the samples in two dimensions using non-metric multidimensional scaling (NMDS). Beta diversity analysis was performed on relative abundance data (i.e. proportions, the counts are divided by total library size). Permutational

Multivariate analysis of variance (PerMANOVA) was performed using the `adonis` function in the R 'vegan' package [37] to test the ability of variables (patient group, sex and age, nature of sample, days since onset of symptoms) to account for the observed variance in microbial profiles. Finally, statistical analyses for the differential abundance of mapped OTU reads were conducted using the ALDEx2 R package with a generalized linear model (GLM) using the `aldex.glm` function [38]. We modified the `aldex.glm` function to enable the effect of several variables in the glm model to be tested, rather than only testing one variable, as in the default `aldex.glm` function. The covariates that were taken into account were age, sex, time since the onset of symptoms and nature of sample. Differential OTUs were defined using a *P*-value cut-off of 0.05.

To determine whether small sets of OTUs could classify the patients, we used classification based on association rules using the R 'arules' package. For this analysis, the relative abundance matrix of differentially abundant OTUs was transformed into a binary matrix based on the median relative of each OTU, with 1 meaning that the relative abundance of OTU_{*x*} in sample (*i*) is greater than the median value of OTU_{*x*} across all samples. The rules were mined with support >0.3 and confidence >0.8. Redundant rules were further pruned. We judged the robustness of the rules using an LOOCV approach. For each subject, association rules were predicted on all other subjects, excluding the one for which we made a prediction. After we had performed this procedure for all subjects, we selected the rules that were found in all instances and calculated their sensitivities and specificities from predicted versus true classifications.

Funding information

This work was supported by federal funds from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health and the Department of Health and Human Services under Centers of Excellence for Influenza Research and Surveillance (CEIRS) contract no. HHSN272201400005C. The funding sources did not play any role in the study or in the preparation of the article or the decision to publish.

Acknowledgements

The authors thank Marcus Korth and Bruno Simon for valuable feedback on the manuscript.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Belongia EA, Irving SA, Waring SC, Coleman LA, Meece JK et al. Clinical characteristics and 30-day outcomes for influenza A 2009 (H1N1), 2008-2009 (H1N1), and 2007-2008 (H3N2) infections. *JAMA* 2010;304:1091-1098.
- Dawood FS, Chaves SS, Pérez A, Reingold A, Meek J et al. Complications and associated bacterial coinfections among children hospitalized with seasonal or pandemic influenza, United States, 2003-2010. *J Infect Dis* 2014;209:686-694.
- Gill PJ, Ashdown HF, Wang K, Heneghan C, Roberts NW et al. Identification of children at risk of influenza-related complications in primary and ambulatory care: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Respir Med* 2015;3:139-149.
- Committee on Infectious Diseases, American Academy of Pediatrics. Recommendations for prevention and control of influenza in children, 2012-2013. *Pediatrics* 2012;130:780-792.
- Campbell A, Rodin R, Kropp R, Mao Y, Hong Z et al. Risk of severe outcomes among patients admitted to hospital with pandemic (H1N1) influenza. *Can Med Assoc J* 2010;182:349-355.
- Oshansky CM, Gartland AJ, Wong SS, Jeevan T, Wang D et al. Mucosal immune responses predict clinical outcomes during influenza infection independently of age and viral load. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;189:449-462.
- Davey RT, Lynfield R, Dwyer DE, Lusso MH, Cozzi-Lepri A et al. The association between serum biomarkers and disease outcome in influenza A(H1N1)pdm09 virus infection: results of two international observational cohort studies. *PLoS One* 2013;8:e57121.
- Josset L, Tisoncik-Go J, Katze MG. Moving H5N1 studies into the era of systems biology. *Virus Res* 2013;178:151-167.
- Weinstock GM. Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature* 2012;489:250-256.
- Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* 2015;3:31.
- Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J Infect Dis* 2008;198:962-970.
- Leung RK, Zhou JW, Guan W, Li SK, Yang ZF et al. Modulation of potential respiratory pathogens by pH1N1 viral infection. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:930-935.
- Chaban B, Albert A, Links MG, Gardy J, Tang P et al. Characterization of the upper respiratory tract microbiomes of patients with pandemic H1N1 influenza. *PLoS One* 2013;8:e69559.
- Ichinohe T, Pang IK, Kumamoto Y, Peaper DR, Ho JH et al. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:5354-5359.
- Hori T, Kiyoshima J, Shida K, Yasui H. Augmentation of cellular immunity and reduction of influenza virus titer in aged mice fed *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:105-108.
- Wang J, Li F, Sun R, Gao X, Wei H et al. Bacterial colonization dampens influenza-mediated acute lung injury via induction of M2 alveolar macrophages. *Nat Commun* 2013;4:2106.
- Fritz JV, Desai MS, Shah P, Schneider JG, Wilmes P. From meta-omics to causality: experimental models for human microbiome research. *Microbiome* 2013;1:14.
- Bogaert D, Keijsers B, Huse S, Rossen J, Veenhoven R et al. Variability and diversity of nasopharyngeal microbiota in children: a metagenomic analysis. *PLoS One* 2011;6:e17035.
- Chao A, Chiu C-H, Jost L, Diversity US, Diversity P. Functional diversity, and related similarity and differentiation measures through hill numbers. *Annu Rev Ecol Syst* 2014;45:297-324.
- Sakwinska O, Bastic Schmid V, Berger B, Bruttin A, Keitel K et al. Nasopharyngeal microbiota in healthy children and pneumonia patients. *J Clin Microbiol* 2014;52:1590-1594.
- Hilty M, Qi W, Brugger SD, Frei L, Agyeman P et al. Nasopharyngeal microbiota in infants with acute otitis media. *J Infect Dis* 2012;205:1048-1055.
- Teo SM, Mok D, Pham K, Kusel M, Serralha M et al. The infant nasopharyngeal microbiome impacts severity of lower respiratory infection and risk of asthma development. *Cell Host Microbe* 2015;17:704-715.
- Pettigrew MM, Laufer AS, Gent JF, Kong Y, Fennie KP et al. Upper respiratory tract microbial communities, acute otitis media pathogens, and antibiotic use in healthy and sick children. *Appl Environ Microbiol* 2012;78:6262-6270.
- Vissing NH, Chaves BL, Bisgaard H. Increased risk of pneumonia and broncholitis after bacterial colonization of the airways as neonates. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188:1246-1252.
- Schreiner A. Anaerobic pulmonary infections. *Scand J Infect Dis Suppl* 1979;19:77-79.

26. De Steenhuijsen Piters WA, Heinonen S, Hasrat R, Bunsow E, Smith B et al. Nasopharyngeal microbiota, host transcriptome, and disease severity in children with respiratory syncytial virus infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;194:1104–1115.
27. Loughrey AC, Chew EW. Endocarditis caused by *Veillonella dispar*. *J Infect* 1990;21:319–321.
28. Yacoub AT, Krishnan J, Acevedo IM, Halliday J, Greene JN. Nutritionally variant streptococci bacteremia in cancer patients: a retrospective study, 1999–2014. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2015;7:2015030.
29. Abou Abdallah R, Cimmino T, Baron S, Cadoret F, Michelle C et al. Description of *Chryseobacterium timonianum* sp. nov., isolated from a patient with pneumonia. *Antonie van Leeuwenhoek* 2017: 1121–1132.
30. Cobo F, Rodriguez-Granger J, Sampedro A, Aliaga-Martinez L, Navarro-Mari JM. Pleural effusion due to *parvimonas micra*. A case report and a literature review of 30 cases. *Rev Esp Quimioter* 2017;30:285–292.
31. Wong VK, Turmezei TD, Weston VC. Actinomycosis. *BMJ* 2011; 343:d6099.
32. Bosch AA, Levin E, van Houten MA, Hasrat R, Kalkman G et al. Development of upper respiratory tract microbiota in infancy is affected by mode of delivery. *EBioMedicine* 2016;9:336–345.
33. Wood DE, Salzberg SL. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol* 2014;15:R46.
34. Khandaker G, Zurynski Y, Buttery J, Marshall H, Richmond PC et al. Neurologic complications of influenza A(H1N1)pdm09: surveillance in 6 pediatric hospitals. *Neurology* 2012;79:1474–1481.
35. Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods* 2013;10:996–998.
36. Mcmurdie PJ, Holmes S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 2013;8:e61217.
37. Oksanen J, Kindt R, Legendre P, O'Hara RB. *Vegan: community ecology package*. *Bioconductor* 2015.
38. Fernandes AD, Reid JN, Macklaim JM, Mcmurrough TA, Edgell DR et al. Unifying the analysis of high-throughput sequencing datasets: characterizing RNA-seq, 16S rRNA gene sequencing and selective growth experiments by compositional data analysis. *Microbiome* 2014;2:15.

Five reasons to publish your next article with a Microbiology Society journal

1. The Microbiology Society is a not-for-profit organization.
2. We offer fast and rigorous peer review – average time to first decision is 4–6 weeks.
3. Our journals have a global readership with subscriptions held in research institutions around the world.
4. 80% of our authors rate our submission process as 'excellent' or 'very good'.
5. Your article will be published on an interactive journal platform with advanced metrics.

Find out more and submit your article at microbiologyresearch.org.

Figure S1

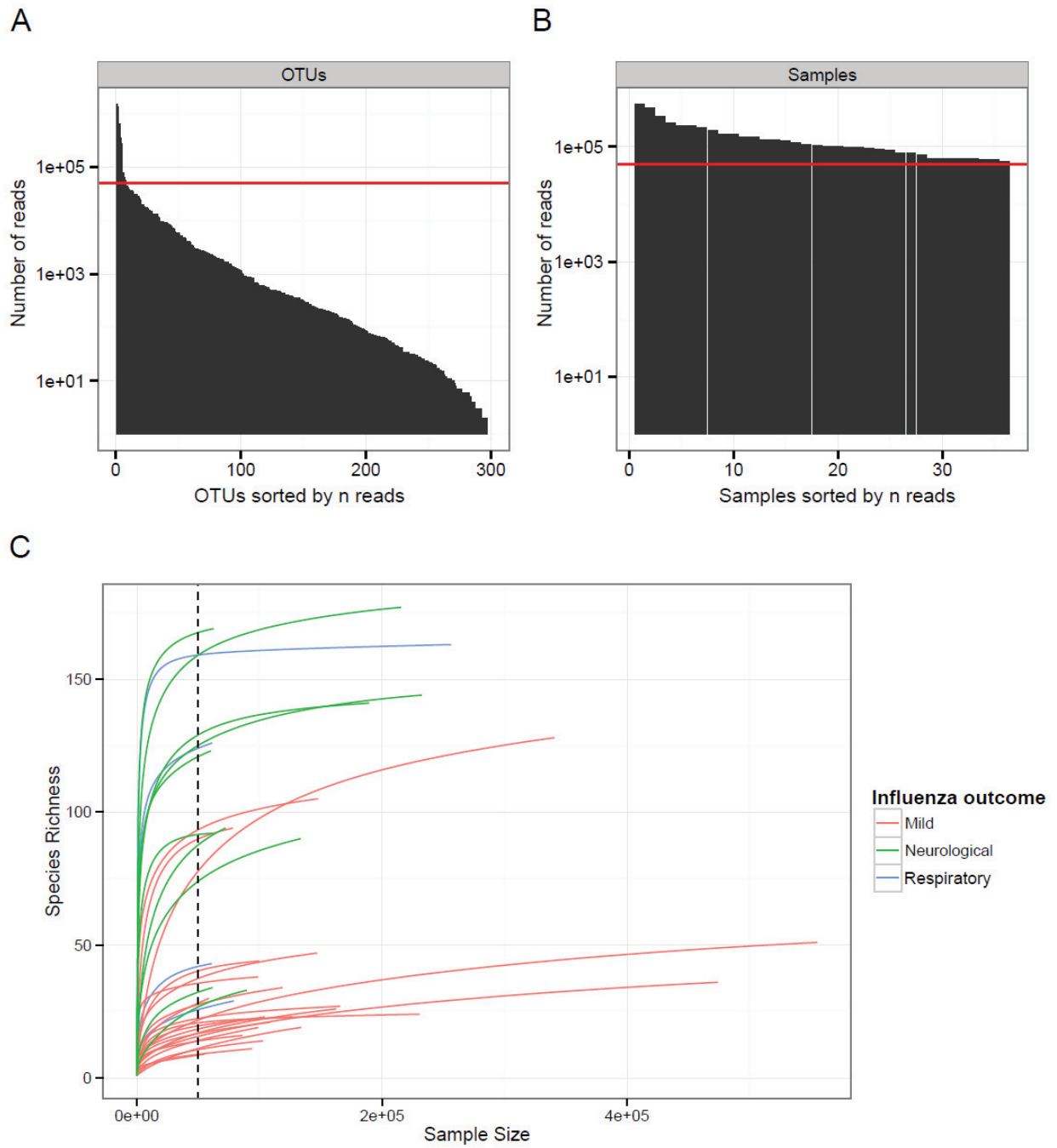


Figure S2

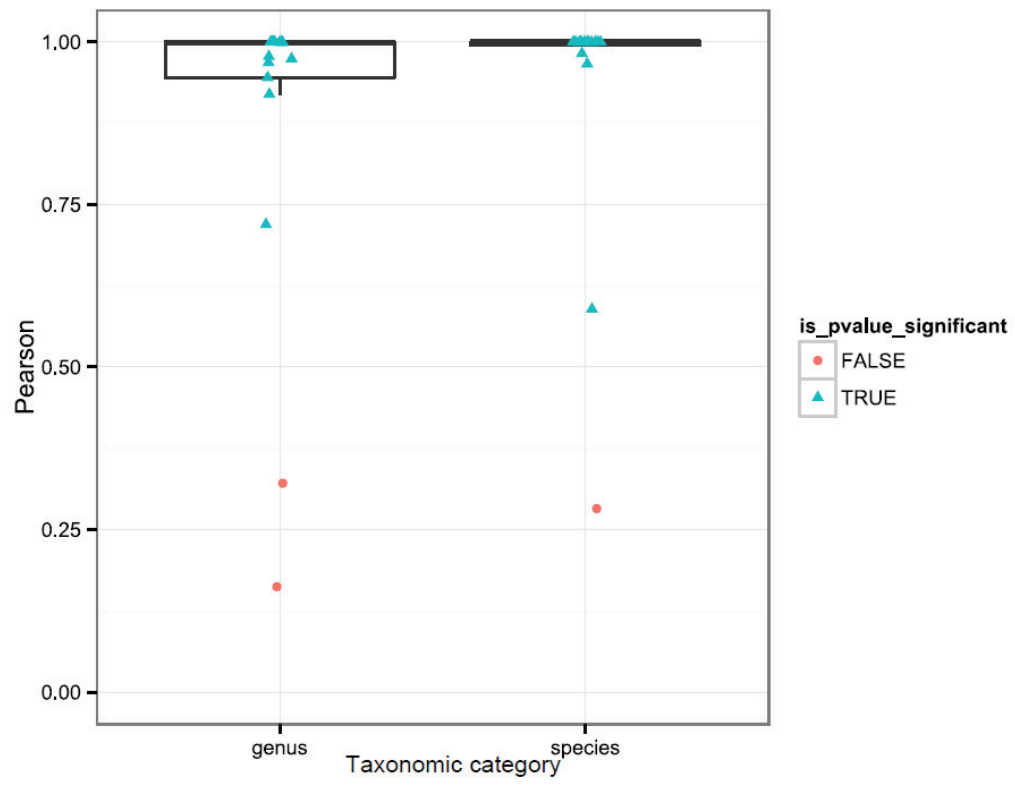
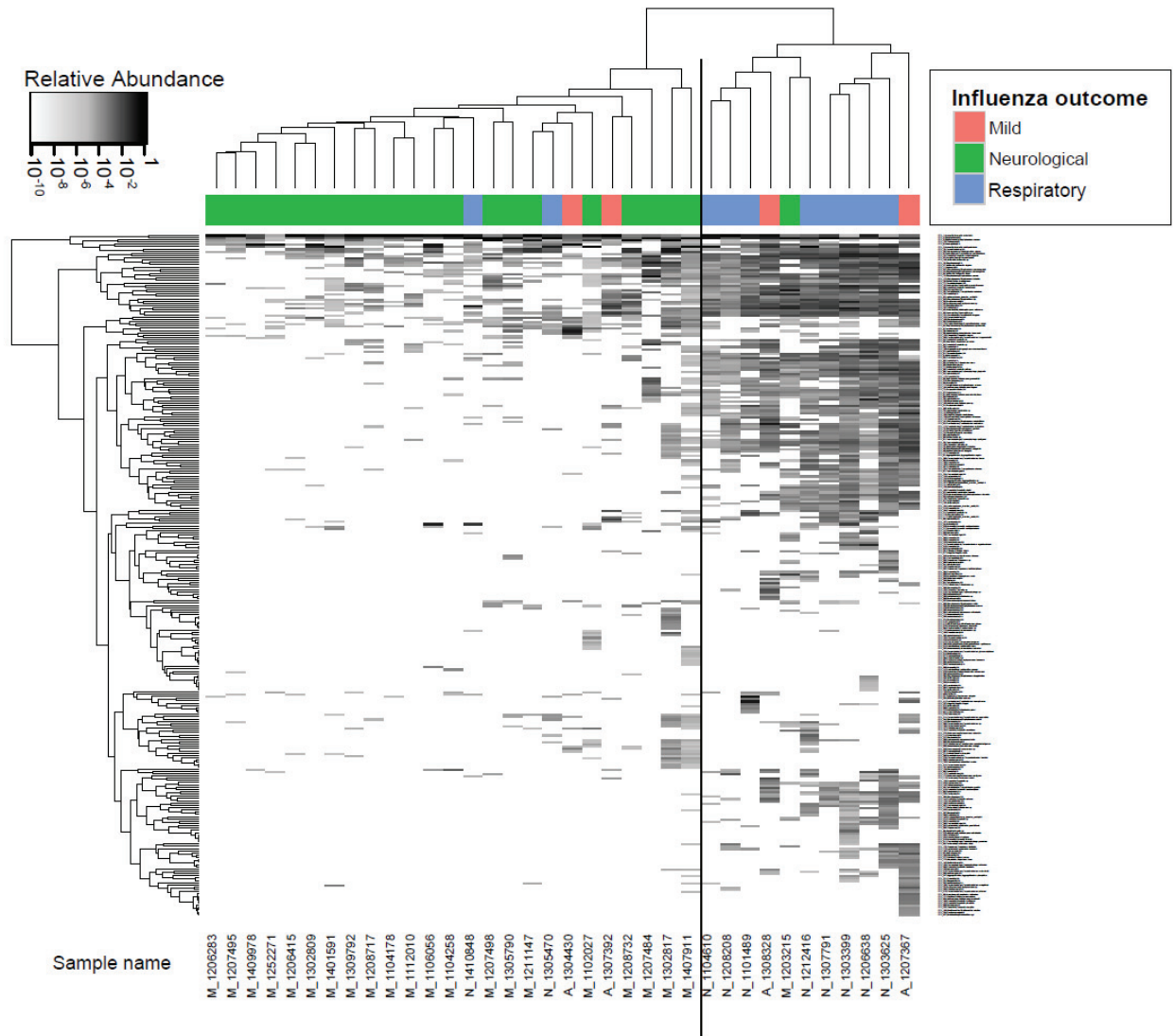


Figure S3



Supplementary material

SUPPLEMENTARY TABLES

Table S1. Logistic regression testing association between presence of one dominant OTU and samples covariate.

	Estimate	Std. Error	z value	p value
Influenza outcome : Severe vs Mild	-6.64	8.86	-0.75	0.45
Age (in months)	-0.85	0.70	-1.22	0.22
Sample Nature : NPS vs NPA	-6.41	6.59	-0.97	0.33
Sex : M vs F	3.52	2.25	1.57	0.12
Days since symptom onset	1.16	0.98	1.18	0.24
Influenza outcome : Age	0.63	0.69	0.91	0.36

Table S2. Permutational multivariate analysis of variance (PerMANOVA) was used to test statistical significances of association of NP microbiota composition with patients and sample factors.

Factor	F statistic	p-value
Influenza outcome (severe or mild)	3.58	0.00025
Age*	1.81	0.03450
Sample nature	1.58	0.11175
Sex	1.16	0.26225
days since symptom onset	0.64	0.83575
Influenza outcome : Age	1.19	0.23850

* age was categorized into 3 groups (1-2 months, 3-12 months and more than 1 year old)

Table S3. Permutational multivariate analysis of variance (PerMANOVA) was used to test statistical significances of association of NP microbiota composition with patients and sample factors.

Factor	F statistic	p-value
Influenza complication (Respiratory vs. Neurological)	0.928274	0.46
Age*	1.65080386	0.14425
Sample nature	0.95688833	0.39
Sex	1.38516229	0.2065
days since symptom onset	0.70191464	0.6195
Influenza outcome : Age	2.28696032	0.0585

* age was categorized into 3 groups (1-2 months, 3-12 months and more than 1 year old)

Table S4. Multi Way ANOVA results testing diversity indices association with influenza outcome and samples covariates.

Factor	ACE		Chao1		Fisher		InvSimpson		Shannon		Simpson	
	F-statistic	p-value	F-statistic	p-value	F-statistic	p-value	F-statistic	p-value	F-statistic	p-value	F-statistic	p-value
Influenza outcome (severe or mild)	12.26	0.00	10.72	0.00	13.10	0.00	0.00	0.99	12.44	0.00	14.66	0.00
Age (in months)	4.26	0.04	3.65	0.06	3.35	0.07	1.02	0.32	6.58	0.01	7.87	0.00
Sample Nature	2.09	0.15	1.75	0.19	1.49	0.23	4.55	0.04	3.55	0.06	4.82	0.03
Sex	2.00	0.16	1.83	0.18	1.89	0.17	2.04	0.16	0.44	0.51	0.45	0.50
Days since symptom onset	0.45	0.50	0.24	0.63	0.20	0.65	0.13	0.71	0.90	0.35	2.49	0.12
Influenza outcome : Age	2.82	0.10	2.41	0.13	2.15	0.15	0.10	0.75	3.81	0.06	6.09	0.01
		41		14		29		51		07		98

Table S5. Multi Way ANOVA results testing diversity indices association with influenza severe complications type and samples covariates.

Factor	ACE		Chao1		Fisher		InvSimpson		Shannon		Simpson	
	F-statistic	p-value	F-statistic	p-value	F-statistic	p-value	F-statistic	p-value	F-statistic	p-value	F-statistic	p-value
Influenza complication (Respiratory vs. Neurological)	1.28	0.2946	1.06	0.3367	0.77	0.4099	0.00	0.9909	0.00	0.9646	0.01	0.9387
Age (in months)	3.67	0.0970	3.14	0.1198	2.28	0.1746	9	0.009	5.59	0.0501	3.01	0.1263
Sample Nature	0.91	0.3727	0.87	0.3831	0.22	0.6553	2.99	0.1272	0.74	0.4169	0.39	0.528
Sex	1.43	0.2702	1.56	0.2521	0.97	0.3564	0.13	0.7249	0.00	0.9468	0.16	0.7028
Days since symptom onset	0.03	0.8722	0.02	0.9023	0.12	0.7372	0.08	0.7832	0.06	0.8141	0.10	0.7641
Influenza outcome : Age	0.14	0.7207	0.14	0.7236	0.00	0.9752	0.57	0.4743	0.00	0.9733	0.00	0.9463

Table S6. Custom V1-V3 16S amplicon with the Nextera™ XT dual index adaptor sequences. This table represents the V1-V3 amplicon primers, Nextera™ XT adaptors, and the MiSeq read/index primer sequences utilized generate 16S libraries and sequence the amplicons. Bacterial 16S specific sequences (red) were synthesized with partial nextera adaptor sequences (black). A single primer set amplifies the V1-V3 16S region and sequences the amplicon on an Illumina® platform.

Primer	Sequence (5'—3')
16S V1 (27F) amplicon and Read 1	TCGTCGGCAGCGTCGAGTTGATCMTGGCTCAG
16S V3 (536R) amplicon and Read 2	GTCTCGTGGGCTCGG WATTACCGCGCKGCTG
16S V1-V3 Nextera™ XT i5 index	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC
16S V1-V3 Nextera™ XT i7 index	CAGCMGCCGCGTAAT WCCGAGCCCACGAGAC
Nextera™ XT i5 adaptor 1	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[i5]TCGTCGGCAGCGTC
Nextera™ XT i7 adaptor 2	GCTCGGGTGTCTG[i7]TAGAGCATACGGCAGAAGACGAAC

Chapitre 2. Le microbiome respiratoire des adultes est-il utile dans la maladie grippale ?

1. Objectif

Dans le cadre de la caractérisation du microbiome respiratoire des infections respiratoires liées aux virus *Influenza*, cette étude a pour objectif de déterminer une signature microbienne discriminant les patients en fonction de leur devenir clinique, bénin ou sévère. Cette signature pourrait être utilisée en tant que marqueur pronostic pour pronostiquer les conséquences de l'infection grippale et ce, dès les temps précoces de la maladie.

2. Méthodes

2.1. Sélection des patients

Nous avons analysé les dossiers cliniques des adultes (≥ 15 ans ; $n=2036$) admis aux Hospices Civils de Lyon (Bron, France) entre 2011 et 2015. Tous les prélèvements inclus étaient des ANP positives pour IAV ou IBV, au moyen du Respiratory Multi Well System MWS r-gene® kit (bioMérieux, Marcy-L'Étoile, France). À noter qu'une estimation semi-quantitative de la charge virale a été obtenue, via la détermination d'un Cycle seuil (« *Cycle threshold* » ou Ct.)

Seuls les patients au début de leur maladie (moins de deux jours de symptomatologie) et sans prise d'antibiothérapie trois semaines avant le prélèvement ont été sélectionnés. Ont été exclus les patients présentant des facteurs de risque de complications (comme définit précédemment) ou une maladie chronique connue pour impacter le microbiome respiratoire ainsi qu'une infection non respiratoire documentée au moment des prélèvements (8). Enfin, nous avons aussi exclus les patients dont les prélèvements initiaux n'ont pas pu être retrouvés ou dont les extraits ne satisfaisaient pas aux critères minimaux de qualité/quantité.

Sur la base de leur dossier clinique après prélèvements, les patients ont été classés en deux groupes bénins (en l'absence de complication) ou sévères, respiratoire [utilisation de ventilation (invasive ou non), altération de la gazométrie artérielle, ou l'hospitalisation en réanimation ou service spécialisé] ou neurologique [reflet de l'altération du système nerveux

central ou périphérique, comme les convulsions, encéphalopathies, encéphalite ou tout autre symptôme neurologique focal; hospitalisé en réanimation ou service spécialisé] (207).

2.2. Préparation des librairies et séquençage

Après extraction sur plateforme automatisée EasyMag (bioMérieux), les régions V1-V3 de l'ADN16S (510 bases) ont été amplifiées (20 cycles) au moyen d'amorces maison (voir **Partie B, Chapitre 1**). Après purification sur billes magnétiques AMPure XP beads (Beckmann Coulter Inc.), les amplicons ont été indexés avant quantification puis séquençage sur une cartouche MiSeq V2 à 2pM (après ajout de 5% de contrôle PhiX).

À noter que le processus de séquençage et de constitution des librairies a été validé par l'ajout d'un contrôle négatif suivant l'entièreté du processus analytique.

2.3. Analyse bio-informatique et statistique

Au jour de publication de cette thèse, certains échantillons ont eu à être reséquencés pour permettre l'obtention de profondeur suffisante. Aucun résultat ni processus informatisé fixé ne peut donc être détaillé ici, mais pour permettre une comparaison avec l'étude de la population pédiatrique, le processus sera superposable. Les résultats préliminaires présentés ci-après considèrent une approche identique à l'étude pédiatrique ;

2.4. Considération éthique

Tous les prélèvements ont été collectés dans le cadre de la prise en charge habituelle des patients sans prélèvement supplémentaire (ANP ou NG). Les prélèvements ont été anonymisés et l'étude a été approuvée par le comité d'éthique des Hospices Civils de Lyon le 17.12.2015.

3. Résultats préliminaires

Un total de 95 échantillons a pu être inclus dans cette étude. Les patients inclus présentaient les caractéristiques suivantes résumées dans le Tableau 9.

À noter que 49 d'entre eux (16 patients bénins, 17 respiratoires et 14 neurologiques) ont été reséquencés pour cause de puissance insuffisante pour assurer une analyse aux performances satisfaisantes.

Tableau 5. Caractéristiques démographiques et cliniques à l'inclusion, évolution clinique et thérapeutique des patients inclus.

Données démographiques et cliniques initiales		Grippe bénigne (n=42)	Grippe sévère		
			Complication neurologique (n=15)	Complication respiratoire (n=38)	
Démographie	Sexe Masculin (% du groupe considéré)	21 (50%)	9 (60%)	21 (55.2%)	
	Age médian [déviat ion standard]	77[19]	78 [15]	76 [19]	
<u>Délai entre les symptômes et le prélèvement</u>					
Caractéristiques à l'inclusion	N=0	10	7	14	
	N=1	16	3	15	
	N=2	16	5	9	
	Délai médian	1	1	1	
	<u>Comorbidités</u>				
	Neurologiques	6	2	4	
	Autres	10	4	16	
Évolution clinique	Jours Hospitalisés (Médiane)	3	7	9	
	Saturation <90% et/ou ventilation	0	6	35	
	Surinfection bactérienne des pneumonies virales	2	2	4	
	Coma	0	5	2	
	Encéphalites	0	7	2	
	Mort	0	3	2	
Thérapeutique	Sans antiviral	34	9	16	
	Tamiflu	8	6	22	
	Sans antibiotiques	24	5	4	
	Antibiotiques	18	10	34	

Sur les 46 échantillons suffisamment séquencés, il n'a pu être mis en évidence une différence significative d'alpha-diversité globale (estimée par les indices de diversité de Chao1, ACE et Shannon). Similairement à l'étude pédiatrique, la bêta diversité était retrouvée

associée aux conséquences de la maladie grippale, de l'âge (après catégorisation 15-65 ans *versus* plus de 65 ans) et délai depuis le début de la symptomatologie ($p < 0.05$).

Concernant la composition précise de ces microbiomes respiratoires, et toujours sur les 46 patients analysables avant reséquençage, nous avons pu retrouver la présence de 8 OTU dominants les respirotypes, dont cinq (indiqué par *) sont partagés chez les enfants (*Staphylococcus aureus**, *Propionibacterium acnes*, *Pseudomonas* sp., *Haemophilus Influenzae**, *Moraxella catarrhalis**, *Moraxella nonliquefaciens**, *Streptococcus* sp.* et *Corynebacterium* sp.).

Quatre OTU étaient retrouvés différemment abondants entre les formes bénignes et sévères (indépendamment du type de complication) dont une était retrouvé chez l'enfant (indiqué par *) à savoir *Turicella* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum* et *Veillonella* sp. * .

4. Conclusion

L'étude des microbiomes respiratoires chez des populations adultes permettra d'apporter des résultats à associer aux résultats obtenus chez les patients pédiatriques. Une vue globale de l'utilisation des caractéristiques du microbiome respiratoire pour pronostiquer l'évolution clinique de la maladie grippale pourra donc ressortir de l'association de ces deux cohortes, aux méthodologies superposables.

Chapitre 3. Les populations minoritaires détectées par Séquençage à haut débit sont-elles détectables par PCR digitale avec des performances satisfaisantes ?

1. Objectif

L'objectif de cette étude était d'optimiser et d'évaluer des performances de la PCR digitale (RT –ddPCR) en comparaison des performances des méthodes classiques de biologie moléculaires (RT-qPCR), en utilisant le séquençage par NGS d'échantillons de patients immunodéprimés comme gold standard d'évaluation.

2. Article publié

PICHON M., Gaymard A., Josset L., Valette M., Millat G., Lina B., Escuret V. Characterization of oseltamivir-resistant influenza virus populations in immunosuppressed patients using digital-droplet PCR: comparison with qPCR and next generation sequencing analysis. Antiviral Res. 2017 Aug 2. S0166-3542(17)30431-X



Contents lists available at ScienceDirect

Antiviral Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/antiviral

Characterization of oseltamivir-resistant influenza virus populations in immunosuppressed patients using digital-droplet PCR: Comparison with qPCR and next generation sequencing analysis



Maxime Pichon ^{a, b, 1}, Alexandre Gaymard ^{a, b, 1}, Laurence Josset ^{a, b}, Martine Valette ^a, Gilles Millat ^c, Bruno Lina ^{a, b}, Vanessa Escuret ^{a, b, *}

^a Hospices Civils de Lyon, Centre National de Référence des virus Influenzae France Sud, Laboratoire de Virologie, Institut des Agents Infectieux, Groupement Hospitalier Nord, F-69317, Lyon Cedex 04, France

^b Univ Lyon, Université Lyon 1, Faculté de Médecine Lyon Est, CIRI, Inserm U1111, CNRS UMR5308, équipe Virpath, F-69372, Lyon Cedex 08, France

^c Hospices Civils de Lyon, Plateforme de séquençage diagnostique, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Groupement Hospitalier Est, F-69677, Bron, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 June 2017

Received in revised form

28 July 2017

Accepted 31 July 2017

Available online 3 August 2017

Keywords:

RT-droplet digital PCR

RT-qPCR

Next generation sequencing

H275Y substitution

Influenza viruses

Oseltamivir resistance

ABSTRACT

Introduction: The H275Y substitution in neuraminidase (NA) confers oseltamivir-resistance in A(H1N1) influenza viruses (IV). Droplet digital PCR (ddPCR) is a new technique to explore single nucleotide polymorphisms. The aim of this study was to compare the performances of reverse transcriptase (RT)-ddPCR, RT-qPCR and next generation sequencing (NGS). We also analyzed the proportions of H275Y-NA substitution for two immunosuppressed patients with sustained shedding of A(H1N1)pdm09 IV.

Methods: RT-qPCR was performed using the ABI7500 platform. RT-ddPCR was carried out using the QX200 ddPCR platform. We strengthened our results by a NGS assay (Ion PGM™ sequencer). Discrimination performance and sensitivity of the RT-ddPCR assay were evaluated using mixes of wild type (WT) and mutated H275Y-NA-coding segments.

Results: The performance of RT-ddPCR was better than RT-qPCR, using NGS assay as a gold standard. RT-ddPCR was able to detect 0.28% oseltamivir-resistant IV in a WT IV population and 0.55% WT IV in an oseltamivir-resistant IV population. For the first patient, the H275Y-NA substitution was selected by oseltamivir treatment and reached about 50% of the IV population before dropping to less than 2% after treatment discontinuation which was under the lower limit of quantification by RT-qPCR and RT-ddPCR (<2%) after treatment stop. Then, five days after oseltamivir was re-introduced, the H275Y-NA substitution rose up to 100%. For the second patient, the H275Y-NA substitution reached about 30% two days after oseltamivir discontinuation.

Conclusion: RT-ddPCR demonstrated better performances than classical RT-qPCR to estimate oseltamivir-resistant IV proportions. This technique could be used to detect earlier emergence of H275Y-NA substitution.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In the droplet digital PCR (ddPCR) technique, samples are emulsified into thousands of nanodroplets. Each one is used as unique bioreactor to enhance PCR quantification with an equal

sensitivity (Hindson et al., 2011, 2013). The absolute quantification without standard curve is one of the biggest advantages of ddPCR compared to other methods of quantitative PCR (qPCR). This quantification allows comparison between results from different samples or studies independently of the reaction efficiency (McDermott et al., 2013; Taylor et al., 2015). Studies using ddPCR techniques have already proved to be beneficial for human genome exploration and for samples with complex background (Račák et al., 2014; Sanmamed et al., 2015).

Neuraminidase inhibitors (NAIs) are the only antiviral agents recommended by the WHO against influenza viruses (IV) and oseltamivir is the most frequently used worldwide. Before 2007,

* Corresponding author. Virpath - Grippe, de l'émergence au contrôle, Inserm U1111, CNRS UMR5308, CIRI, ENS Lyon, UCBL1, Batiment B, 4ème, étage, Faculté de Médecine, RTH Laennec, 7 Rue Guillaume Paradin, 69372, Lyon Cedex 08, France.

E-mail address: vanessa.escuret@univ-lyon1.fr (V. Escuret).

¹ These authors contributed equally to this work.

oseltamivir-resistant IV were very rare and detected mainly in children and immunosuppressed patients treated by oseltamivir (Ison et al., 2006; Sheu et al., 2008). However, in 2007–2008, seasonal A(H1N1) IV bearing a H275Y-substituted N1 emerged in patients who were not under oseltamivir treatment (Meijer et al., 2009; Rameix-Welti et al., 2008). This variant had a good fitness and became dominant worldwide just before the A(H1N1)pdm09 IV appeared (Escuret et al., 2011). Since then, the large majority of human IV was again susceptible to NAIs. Some localized community circulation clusters of oseltamivir-resistant IV were detected among patients without oseltamivir exposure in Australia in 2011 and in Japan in 2013–2014 (Hurt et al., 2012; Takashita et al., 2014). However, oseltamivir treatment in immunosuppressed patients was the main cause for oseltamivir-resistance in the USA in 2013–2014 (Okomo-Adhiambo et al., 2015). Detection of oseltamivir-resistant IV is still a challenge for immunosuppressed patients (Ghedini et al., 2012). In previous studies, we demonstrated that the limit of detection (LoD) for a variant population bearing a H275Y-NA substitution was around 10% using reverse transcriptase (RT)-qPCR (Escuret et al., 2014, 2012), ddPCR detect single nucleotide polymorphisms (SNP) with a higher sensitivity than qPCR (Hindson et al., 2011; Pekin et al., 2011). This performance may improve the detection of H275Y-NA substitution and management of oseltamivir-resistant IV infection.

In the present study, RT-ddPCR was optimized and the performances of RT-ddPCR was compared to that of RT-qPCR using mixes of well-characterized RNA samples from A(H1N1)pdm09 IV isolates bearing WT or H275Y-substituted NA. Specimens from immunosuppressed patients with prolonged A(H1N1)pdm2009 viral shedding were also analyzed using RT-ddPCR, RT-qPCR and NGS to assess performances of each techniques.

2. Material and methods

2.1. A(H1N1)pdm09 IV strain selection

Two A(H1N1)pdm09 IV strains were cultured on MDCK cells: i) the A/California/7/2009 (H1N1) IV with 100% H275-NA (A/WT); ii) the A/Lyon/CHU/48-307/2009 (H1N1) IV, an oseltamivir-resistant strain of A(H1N1)pdm09-like virus composed of 100% 275Y-NA (A/MUT) (GenBank Accession no: KY631546).

To assess performances of RT-ddPCR against RT-qPCR, geometric dilutions were tested as previously described (Taylor et al., 2015). Briefly, the A/WT RNA was diluted in a constant quantity of A/MUT RNA ("WT" scale) and the A/MUT RNA was diluted in a constant quantity of A/WT RNA ("MUT" scale). IV subpopulation at the following proportion was obtained: i) 50%, ii) 25%, iii) 10%, iv) 3.57%, v) 1.82%, vi) 1.22%, vii) 0.55%, viii) 0.28%, and ix) 0.14%. Doing so, 18 different samples were obtained.

2.2. Patient samples

Two immunosuppressed patients who had a prolonged excretion (more than 7 days) of A(H1N1)pdm09 IV were analyzed. Briefly, the first patient was a 2-year-old child with severe combined immunodeficiency syndrome, hospitalized in intensive care unit for severe influenza associated with picornavirus infection. Oseltamivir treatment was used three times (from Day (D)0 to D5, D26 to D31 and D37 to D46). The patient died at D54. Respiratory specimens analyzed were collected at D0, D13, D23, D26, D31 and D45 (Fig. 1). For this patient, samples were all nose-throat swabs except at D0 and D45 which were nasopharyngeal aspirations.

The second patient was a 47-year-old man treated for a B cell lymphoma. A five-day oseltamivir treatment was initiated at D0 after sampling for influenza diagnosis. Analyzed samples were

collected at D0, D7 and D9 (Fig. 1). The patient died at D13. D0 and D7 samples for this patient were nose-throat swabs; the D9 sample was a bronchoalveolar aspiration.

All samples were obtained during usual clinical management of the patients and were analyzed accordingly to the French institution rules at the time of the study and local ethical committee practice.

2.3. DNA purification and sample analysis

Viral RNA was extracted from culture supernatants or respiratory samples using the Easy Mag platform (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) according to the manufacturer's instruction. Extracted RNA was conserved at -80 °C until analysis. All samples were diagnosed using the routine kit Influenza A/B r-gene[®] RT-qPCR (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France).

Samples were then tested by three different methods: NGS method, the in-house RT-qPCR used for H275Y substitution detection and the newly developed RT-ddPCR.

2.4. RT-qPCR

RT-qPCR was performed as previously described (Escuret et al., 2012). Briefly, probes were specific for 275Y (FAM-probe) or H275 (VIC-probe). The assay was performed on the ABI7500 thermocycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) programmed as follows: 50 °C for 15 min (RT), 95 °C for 2 min (polymerase activation) then 45 cycles at 95 °C for 15 s (denaturation) and 60 °C for 40 s (annealing; elongation; reading of fluorescence). When volumes were sufficient, samples were analyzed in triplicate on different days.

2.5. RT-ddPCR

The same primers and probes were used for RT-ddPCR and RT-qPCR assays. We used the One-step RT-ddPCR super mix (BioRad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions, except for the use of dithiothreitol component (see results section 3.1). Droplet generation was done using the QX200™ droplet generator (BioRad) on 20 µL of RT-ddPCR reaction mix composed of sample RNA, primers, probes and RT-ddPCR super mix. The generated droplets were transferred to a 96-well plate. The reaction was performed in a C1000 deep well Thermocycler (BioRad) programmed as follows: 50 °C for 60 min (RT); 95 °C for 15 min (Taq polymerase activation), then 40 cycles at 95 °C for 30 s (denaturation) and 55 °C for 1 min (annealing) followed by a post-cycling step at 98 °C for 10 min (enzyme inactivation) and infinite hold at 4 °C. Annealing temperature was adapted by a thermal gradient experiment. After reaction the plate was immediately transferred to the QX200 reader (BioRad) and results were acquired using the FAM and VIC channel, according to manufacturer's recommendations.

Results interpretation was performed using QuantaSoft software (BioRad) and thresholds were set in manual mode. The false positive results (FPR) were defined as VIC-positive droplets in the 275Y-NA controls or FAM-positive droplets in the H275-NA controls or any positive droplets in the negative controls. As for RT-qPCR, when volumes were sufficient, samples were analyzed in triplicate, on different days.

For both, RT-ddPCR and RT-qPCR, a coefficient of variance (CV) under 20% was defined as a good reproducibility to obtain an accurate viral quantification.

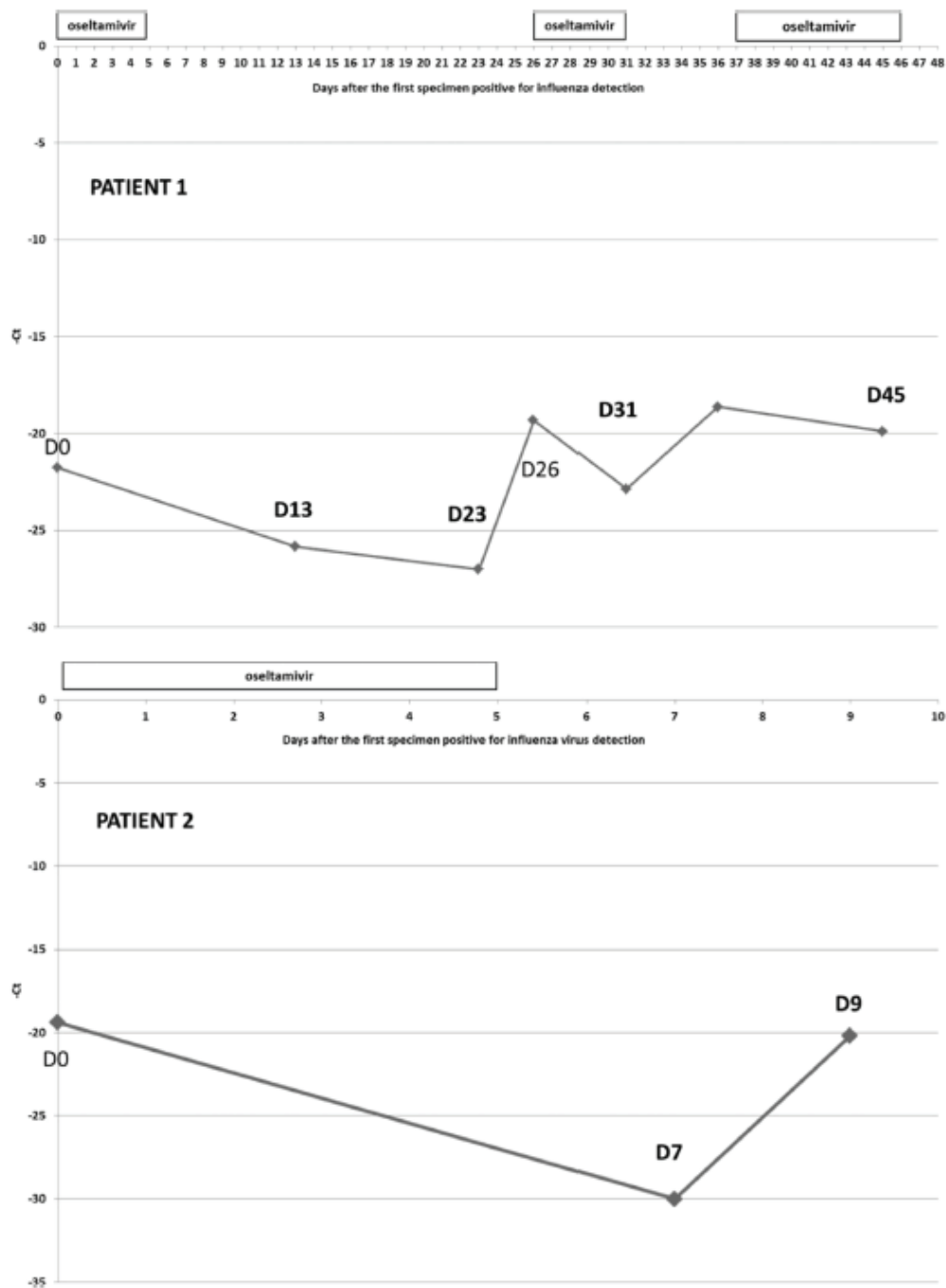


Fig. 1. Influenza viral load kinetics in clinical specimens. Real-time RT-qPCR Cycle thresholds (Ct) were inversely proportional to the influenza virus load. Inverted y-axis allowed an easier comprehension of viral load kinetics. The day (D) of sampling after the first viral detection are indicated. The day of sampling is indicated in bold characters for samples with 275Y-NA substitution detection (at least by one method: RT-qPCR, RT-ddPCR or NGS).

2.6. Sequencing and analysis

Extracted viral RNA was converted to cDNA then amplified using PathAmpFluA PCR kit (Life technologies, Carlsbad, CA, USA).

Libraries preparation was performed using the NEBNext[®] Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set for Ion Torrent (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Sequencing was performed on Ion PGM™ platform using a 316 chip kit V2 (Life technologies).

After reads processing (trimming, demultiplexing, alignment), pileup variants were analyzed using SAM tools (Li et al., 2009). Each nucleotide, coding for Histidine (CAT/CAC) or Tyrosine (TAT/TAC) amino acid at the position 275 of the NA, were quantified. Coverage value described the number of reads that align to a known reference bases. We considered as the LoD of the NGS technologies the hundredth of the observed coverage. This determination justified the depth threshold of at least 100× (minimum for a LoD of 1%). Sequencing results were considered for comparisons as a reference.

2.7. NA activity and inhibition assays

Oseltamivir carboxylate was provided by Hoffmann-La Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, and zanamivir by GlaxoSmithKline (GSK, Brentford, UK). The fluorometric inhibition assays were performed using a MFX fluorometer (Dynex technologies, Chantilly, VA, USA) as described in a previous study, except MES buffer was at pH 6.4 (Ferraris et al., 2005). The NA inhibition assay was performed using a standardized amount of NA activity (10 nmol/h/mL). The NA activity was calculated as the quantity of 2'-(4-methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid (MUNANA) substrate (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) degraded to 4-methylumbelliferone in 1 h per mL of viral suspensions (nmol/h/mL). The inhibitory concentrations (IC₅₀) were calculated using Sigma Plot software (Sigma Plot 8.0, Windows).

2.8. Statistical analysis

For both RT-qPCR and RT-ddPCR, the H275/275Y abundance was

calculated from the mean concentration of the triplicate (WT/(MUT + WT) × 100) or (MUT/(MUT + WT) × 100). Repeatability was verified by the coefficient of variance (CV) (standard deviation/mean × 100). Statistical tests were performed using Graph Prism software. A p-value < 0.05 was considered as significant.

3. Results

3.1. RT-qPCR protocols are not adaptable to RT-ddPCR platform straight away

First, the RT-qPCR protocol used in our laboratory for diagnostic and quantification of the IV subpopulation with H275Y-NA substitution was transposed to the ddPCR platform. The same cycling parameters, primers and probes associated with the platform-specific super mixes were first used in both RT-ddPCR and RT-qPCR assays. After the first ddPCR assay, the fluorescence level for positive and negative droplets did not part enough using the 2D view in Quanta soft software (Fig. 2A). The annealing temperature (using a thermal gradient), primers and probes concentrations were therefore optimized. The dithiothreitol from the ddPCR super mix was also suppressed. Moreover, sample concentration should not be too high to allow good quantification. Samples with Ct < 23 had to be diluted ten-fold to avoid droplet saturation and to obtain some VIC/FAM negative droplets; otherwise the software cannot distinguish positive and negative droplets.

Results obtained after optimization allowed a sufficient fluorescence differentiation between positive and negative droplets to distinguish four types of droplets: VIC-positive/FAM-negative

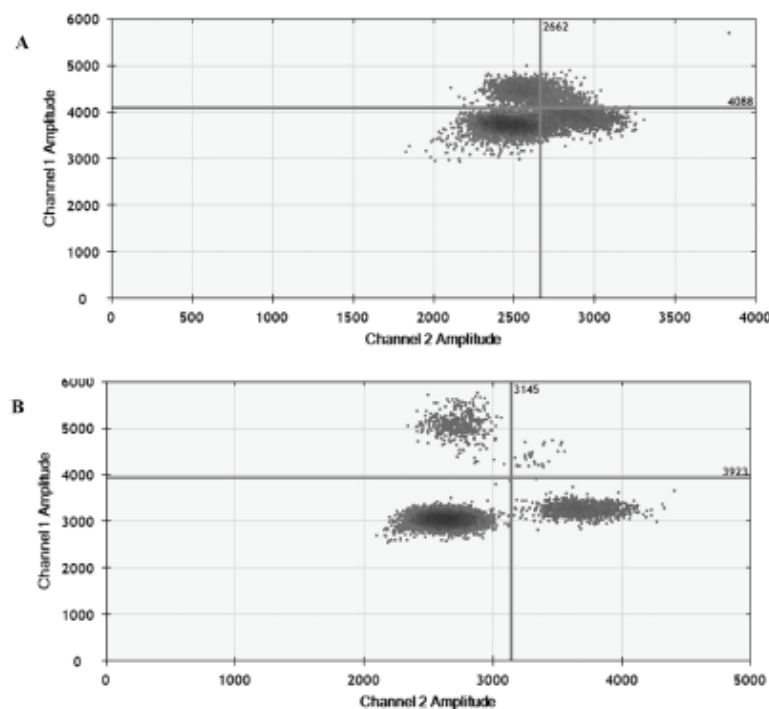


Fig. 2. Cloud representation of results on QX200 ddPCR platform. A) Representation of insufficiently discriminated viral subpopulations. B) Representation of correctly discriminated viral subpopulations. VIC was detected in Channel 1 and FAM was detected in Channel 2. Lower left cloud represents double negative droplet (FAM and VIC negative droplets). Upper right cloud represents double positive droplet (FAM and VIC positive droplet with both H275- and 275Y-NA detected). Lower right cloud represents FAM positive and VIC negative droplets (only 275Y-NA). Upper left cloud represents FAM negative and VIC positive droplets (only H275-NA). The best discrimination condition was observed with a perfect separation of these four clouds associated to most of the droplets detected in the upper left or lower right clouds.

droplets, VIC-negative/FAM-positive droplets, VIC/FAM-positive droplets, VIC/FAM-negative droplets (Fig. 2B).

3.2. Performance of RT-ddPCR on viral supernatant compared to RT-qPCR

The LoD for the RT-ddPCR assay was determined using the FPR quantity of 275Y-NA or H275-NA spotted in the negative controls. Using these controls, the FPR was 0.071 ± 0.077 copies/ μL for the VIC probe (H275-NA) and 0.044 ± 0.069 copies/ μL for the FAM probe (275Y-NA). The LoD was also evaluated by the FPR proportion of 275Y-NA detected in WT IV controls (100% H275-NA) or the FPR proportion of H275-NA identified in substituted IV controls (100% 275Y-NA). The mean FPR proportion was $0.047 \pm 0.071\%$ for the 275Y-NA detection in WT IV controls and $0.070 \pm 0.052\%$ for the H275-NA detection in substituted IV controls. The LoD for each SNP was calculated as the mean FPR proportion or quantity plus three times the standard deviation (SD): thus 0.30 copies/ μL or 0.23% for H275-NA detection and 0.25 copies/ μL or 0.26% for 275Y-NA detection. Using RT-qPCR, the LoD for SNP detection in an IV subpopulation was estimated at 10% in a previous study (Escuret et al., 2014, 2012).

To evaluate and compare the performance of RT-ddPCR against RT-qPCR two geometric dilutions were tested. For ddPCR, strong linearity between the expected and the observed 275Y-NA or H275-NA detection was obtained (slope = 1.009 ± 0.003628 , y-intercept = 0.05340 ± 0.1664 , $R^2 = 0.9995$ and slope = 1.000 ± 0.003698 , y-intercept = -0.4161 ± 0.1812 , $R^2 = 0.9995$, respectively) for all dilutions tested (Fig. 3A). For RT-qPCR, linearity was observed only for dilution above the LoD (10% of the studied SNP) (Fig. 3B). For RT-ddPCR, the smallest H275-NA

abundance that could be measured as significantly different from the FPR proportion observed in the substituted IV controls was 0.55% ($p < 0.01$). The smallest 275Y-NA abundance that could be detected as significantly different from the FPR proportion observed in the WT IV controls was 0.28% ($p < 0.01$).

Using RT-qPCR protocols, the 275Y-NA detection had a CV under 20% only for abundance between 25% and 100%. The H275-NA detection had a CV under 20% only for abundance between 50% and 100%. For RT-ddPCR protocols, the 275Y-NA detection had a CV under 20% for abundance between 1.82% and 100%. The H275-NA detection had a CV under 20% for abundance between 3.57% and 100% (Fig. 3C and D).

In summary, the performance of RT-ddPCR was better with a LoD at 0.28% and 0.55% (275Y-NA and H275-NA detection respectively) against 10% for RT-qPCR and with an accurate quantification beginning between 1.82% (275Y-NA detection) and 3.57% (H275-NA detection) against 25% and 50% respectively for RT-qPCR.

3.3. Performance of RT-ddPCR in clinical samples as compared to RT-qPCR and NGS

Clinical samples were analyzed in triplicate using RT-ddPCR and RT-qPCR (except samples at D0 and D23 for the first patient due to insufficient sample quantity). NGS quantification was obtained for all samples, except at D23 in patient 1, as well as D7 and D9 in patient 2 because of depth below $100\times$ (83, 4 and $82\times$ respectively). These sampling correspond to low viral loads (Ct PCR H275 = 32.7; 36.1 and 26.5 respectively). All other NGS depth were sequenced above $100\times$ threshold (at least $205\times$) and were considered as sufficiently sequenced.

For the first patient, 275Y-NA IV population was detected in the

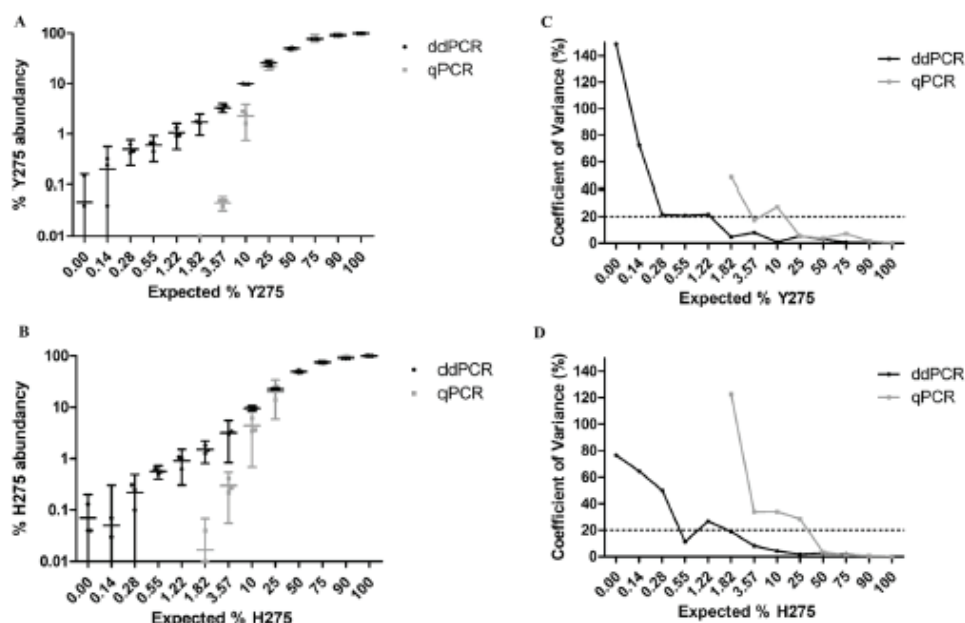


Fig. 3. Analytical performances of ddPCR and qPCR. Observed versus expected proportion of oseltamivir-resistant (A) and wild type-virus (B) using ddPCR (black) and qPCR (grey). Error bars correspond to 95% confidence interval (95CI) of the value. 95CI decreased when reproducibility increased. ddPCR detected both H275-NA and 275Y-NA substitution for the whole dilution scale. qPCR failed to detect both viruses from 1.82% expected proportion. The coefficient of variance (CV) for each dilution point for oseltamivir-resistant (C) and wild-type (D) virus using ddPCR (black) and qPCR (grey) is shown. As expected, quantification CV increased when proportion of the subpopulation decreased. The 20% threshold, illustrated by the dotted line was crossed for a dilution ten-to-twenty-time higher by qPCR than by ddPCR reflecting lack of reproducibility of qPCR in low frequency viral subpopulations.

D13 sample at 40.7% by RT-qPCR, 46.7% by RT-ddPCR and 56.5% by NGS. Then this population dropped to 6.2% at D23 (detected by RT-ddPCR only) and to 0% at D26. After new oseltamivir treatment, 275Y-NA substitution was identified at 100% using RT-qPCR, 97.5% and 100% using RT-ddPCR and 96.1% and 97.8% using NGS for D31 and D45 samples, respectively (Table 1). The RT-ddPCR results were consistent with those of RT-qPCR except the difference at D23 but the results were below the RT-qPCR LoD (Table 1). NGS detected 275Y-NA viral population in whole sufficiently covered samples (D0, 13, 26, 31 and 45). This technology found persistence of 275Y-NA viruses at a very low proportion (0.02%), with a very important depth (12,862×), 22 days after oseltamivir treatment was discontinued. Moreover, H275-NA viral population remained present at the end of the clinical history with a sufficient depth to be confident in the quantification (205 × for the 3.90% quantification result and 601 × for the 2.16% quantification result; Table 1).

For the second patient, NGS found a minor resistant IV subpopulation (0.11%) in the first sample; however NGS could not be performed on other samples due to insufficient depth. For the D7 sample, RT-qPCR and RT-ddPCR were consistent and detected 70.7% and 67.6% of H275-NA viral subpopulation, respectively. A significant difference ($p < 0.05$) was observed in D9 sample between the results obtained with RT-ddPCR and RT-qPCR. The RT-ddPCR could have overestimated the 275Y-NA abundance compared to RT-qPCR (25.3% vs. 3.5%). For this sample the IC_{50} results correlated more with a low 275Y-NA IV subpopulation. For this patient RT-qPCR CV was higher than for the RT-ddPCR, remaining below 20% for all but one sample (on the D7, 275Y-NA with a mean abundance of 29.3%; Table 1).

For all samples from the two patients CV remained below 20% for RT-ddPCR showing good analytical performances. For RT-qPCR, the CV obtained were higher but remained below the 20% limit except for the D7 sample from patient 2 (CV = 37.40%; Table 1).

4. Discussion

To the best of our knowledge, this study is the first using at the same time RT-PCR, RT-ddPCR and NGS assay to evaluate performances and clinical application in Influenza virus field of research. NGS was defined as a gold standard to analyze proportion of

targeted sequences. In the present study, a 316 chip on Ion Torrent PGM™ (Life Technologies) was used and results of NGS could be impacted by the sample viral load. Depth coverage was insufficient in samples with a Ct greater than 27 (determined by influenza diagnosis RT-qPCR), justifying the exclusion of some samples. This limitation may be theoretically overcome by: using more efficient NGS platform, such as the Illumina platforms (NextSeq500, MiSeq, or HiSeq series for example), or reducing the number of sequenced samples per run. These solutions would dramatically increase the cost of sequencing (Liu et al., 2012). In this study, we have shown very precise results (below 1%). It is important to keep in mind that very rare subpopulation quantification could be RT-PCR- or sequencing-introduced artifacts.

Conversely to NGS, RT-ddPCR and RT-qPCR are only able to detect a precise mutation. Therefore the aim of the present study was to compare the performances of the three techniques regarding only the SNP detection responsible for the H275Y-NA substitution.

The RT-ddPCR assays need optimization and a direct transposition of qPCR protocol on this platform remained impossible (Taylor et al., 2015). Using ddPCR assay, an absolute quantification is easy to obtain but ranges from 1 to 100 000 copies per sample (Hindson et al., 2011). Saturation is one of the main inconveniences observed with ddPCR assay when used directly for diagnosis because some negative droplets are required otherwise the system cannot distinguish positive and negative droplets. Herein, samples with high viral load (Ct < 23 determined by influenza diagnosis RT-qPCR) had to be diluted. Thus, a diagnosis qPCR assay estimating viral load remained capital in the analytic process. Moreover, multiplex syndrome PCR is not sufficient to be followed by ddPCR because quantification is usually not available for this technique. Another difficulty during ddPCR assay concerns the analysis of results. Separation between different group of droplets (or clouds) may not be sufficient. The cut-off between positive and negative clouds was difficult to establish, in particular for samples with few copies of the target DNA or using non-optimized ddPCR protocols. Some bioinformatics software, such as "definetherain" might be used to classify the ambiguous droplets between positive and negative droplets, thus limiting the number of false positive droplets (Jones et al., 2014). These bioinformatics tools are fitted for

Table 1

Comparison between RT-qPCR, RT-ddPCR and NGS for the detection of influenza virus subpopulation with H275Y-NA substitution in clinical specimens of two immunocompromised patients.

Date	Ct of routine influenza detection RT-qPCR ^a	Specific H275Y RT-qPCR						Specific H275Y RT-ddPCR				NA sequencing by NGS			Enzymatic assay for $IC_{50} \pm SD$ (nM)		
		H275			275Y			H275		275Y		Coverage value ^b	H275 (%)	275Y (%)	Oseltamivir	Zanamivir	
		Mean (%)	Mean (Cq)	CV (%)	Mean (%)	Mean (Cq)	CV (%)	Mean (%)	CV (%)	Mean (%)	CV (%)						
Patient 1																	
Day 0	21.8	100.0%	25.0 ^d	NA	0.0%	NA	NA	100.0%	0.02%	0.0%	112.2%	769	100.0%	0.0%	0.41 ± 0.16	0.29 ± 0.14	
Day 13 ^c	25.8	59.3%	30.8	2.6%	40.7%	30.5	3.76%	53.3%	2.1%	46.7%	2.3%	2972	43.5%	56.5%	36.66 ± 38.45	0.37 ± 0.05	
Day 23	27.0	100.0%	31.9 ^d	NA	0.0%	NA	NA	93.8%	0.70%	6.2%	10.7%	83	NA	NA	0.39 ± 0.08	1.39 ± 1.55	
Day 26	19.3	100.0%	23.2	NA	0.0%	NA	NA	100.0%	NA	0.0%	NA	12862	100.0%	0.02%	NR	NR	
Day 31 ^c	22.9	0.0%	NA	NA	100.0%	28.8	NA	2.5%	7.6%	97.5%	0.2%	205	3.90%	96.1%	159.75 ± 73.04	0.53 ± 0.14	
Day 45 ^c	19.9	0.0%	NA	NA	100.0%	26.6	NA	0.0%	NA	100.0%	NA	601	2.16%	97.8%	177.65 ± 33.30	0.50 ± 0.65	
Patient 2																	
Day 0	19.4	100.0%	28.2	NA	0.0%	NA	NA	100.0%	NA	0.00%	NA	2776	99.9%	0.1%	NR	NR	
Day 7 ^c	30.0	70.7%	38.2	15.5%	29.3%	38.6	37.40%	67.6%	6.39%	32.4%	13.3%	4	NA	NA	NR	NR	
Day 9 ^c	20.2	96.5%	26.2	0.5%	3.5%	30.4	14.29%	74.7%	1.47%	25.3%	4.4%	82	NA	NA	0.43 ± 0.27	0.29 ± 0.01	

^a The influenza virus detection was performed using Influenza A/B r-gene[®] RTqPCR (bioMérieux, Argente) kit.

^b Coverage value described the number of reads that align to a known reference base (here coding CAT or GAT at the amino acid position 275 of the NA segment).

^c Statistically significant differences between RT-qPCR and RT-ddPCR ($p < 0.05$).

^d All means were determined after having performed the experimentations (for RT-ddPCR and RT-qPCR) in triplicates except for D0 and D23 samples from patient 1 due to insufficient quantity of sample. All means for NGS were determined for a coverage value > 100 ×. Abbreviations: CV: coefficient of variance, IC_{50} : oseltamivir or zanamivir concentration able to inhibit 50% of the NA activity, SD: standard deviation, NA: not applicable.

SyberGreen ddPCR assays but not for Taqman probes. This software should be adapted to all protocols to optimize the analysis of results and to overcome the subjective part of this analysis.

One of the main advantages of the ddPCR techniques over qPCR ones is a better sensitivity and precision (Ghedin et al., 2012). In the present study, the dilution scale of MUT RNA with a constant quantity of WT RNA background and the inverse experiment showed better performances for the ddPCR assays compared to the qPCR assays. The ddPCR had a LoD of approximately 0.5% against 10% for qPCR and an accurate quantification between 1.82% (275Y-NA detection) and 3.57% (H275-NA detection) against 25% (275Y-NA detection) and 50% (H275-NA detection) for qPCR. Regarding detection of 275Y-NA abundance in clinical samples from patients infected by A(H1N1)pdm09 IV and treated with oseltamivir, results were consistent between the three different technologies used. However, NGS was able to detect a low percent of WT IV subpopulation in a treated patient when the other techniques detected only a resistant IV population (patient 1 at D45). Similarly, NGS was able to detect 0.11% of IV with the H275Y-NA substitution at D0 in patient 2. Excluding possible artifacts introduced by the RT-PCR, this could reflect the presence of resistant viral subpopulation even before any antiviral treatment. This observation might have predicted the antiviral response in this immunosuppressed patient and oseltamivir-resistant subpopulation made part of quasispecies viral populations containing both drug-susceptible and -resistant mutations (Ghedin et al., 2012). The oseltamivir-resistant IV with the H275Y-NA substitution may be frequent at very low level in infected hosts because of the decreased viral fitness caused by this substitution. However, the A(H1N1)pdm09 IV with H275Y-NA substitution is frequently selected by oseltamivir treatment in immunosuppressed patients with a prolonged shedding (Ghedin et al., 2011).

The ddPCR technology is a major improvement for pathogen or SNP quantification (Arvia et al., 2017). However, the advantage of an ultrasensitive detection for oseltamivir-resistant viral subpopulation has to be certainly assessed. Usual techniques as pyrosequencing assays or RT-qPCR assays are not reliable to detect less than 10% of the viral population with the H275Y-NA substitution (Taylor et al., 2015). This sensitivity may be sufficient for clinical management, the adaptation of antiviral treatment could be justified by the sole phenotypic modification (Boivin, 2013). In France, intravenous zanamivir is the only alternative for patients infected by an oseltamivir-resistant IV. The European guidelines for management of influenza infections in hematopoietic stem cell transplantation and leukemia patients recommend at least 10 days of oseltamivir treatment in immunosuppressed patients. Intravenous zanamivir is an alternative treatment during severe IV infection when oseltamivir gut absorption is impaired (Engelhard et al., 2013). Oseltamivir-resistance diagnosis is one more argument to obtain special authorization for the intravenous zanamivir treatment. Nonetheless, immunity improvement is one of the key to be more effective during severe IV infections albeit the antiviral treatment. Moreover, a prolonged IV shedding in patients treated by NAIs (>10 days) has to be addressed by switching antiviral therapy without waiting for a precise quantification of H275Y-NA substitution in the IV population (Boivin, 2013). Comparison between zanamivir and oseltamivir treatment as the first treatment option during severe IV infections did not find any benefit of intravenous zanamivir (Marty et al., 2017). Other clinical assays have to be performed in immunosuppressed patients to assess whether intravenous zanamivir as a first line of treatment would have any advantage compared to oseltamivir treatment.

The ddPCR technique is interesting regarding precision for a reliable SNP quantification as it could detect earlier an oseltamivir-resistant IV subpopulation with the H275Y-NA substitution.

However, the beneficial impact of this technology in the management of influenza-infected patients will be significant only if new therapeutic options for influenza infections become available.

Conflict of interest

V.E. received a travel grant from Roche Pharmaceuticals to attend the Fourth European Scientific Working Group on Influenza (ESWI) Influenza Conference and declares potential conflict of interests with Sanofi-Pasteur (intervention in symposia).

B.L. declares potential conflicts of interests with Roche, GSK, BMS, and BioCryst. B.L. is a member of the scientific board of the GEIG and of the ESWI Board of Directors.

M.P., A.G., L.J., M.V. and G.M. do not have any conflicts of interest to declare.

A part of this work was presented as a poster (Abstract ID: 31) during the 19th Annual Meeting of the European Society of Clinical Virology (ESCV2016) in September 2016, Lisbon, Portugal.

Funding information

This study was supported by internal funding and performed in the field of the global surveillance of the susceptibility of influenza viruses to antiviral agents [performed by WHO and by the NIC (National Influenza Centre) for South of France supported by INVS (Institut National de Veille Sanitaire) in France].

Acknowledgements

We are very grateful to Rémi Fanget, Gwendolyn Burfin and all the technicians of the molecular biology and virology laboratories for their advice and help with this study.

We are grateful to BioRad laboratories for freely providing ddPCR QX200 platform. This manufacturer has not been involved in the manuscript writing, reviewing or decision to publish this study.

References

- Arvia, R., Sollai, M., Pierucci, F., Urso, C., Massi, D., Zakrzewska, K., 2017. Droplet digital PCR (ddPCR) vs quantitative real-time PCR (qPCR) approach for detection and quantification of Merkel cell polyoma virus (MCPyV) DNA in formalin fixed paraffin embedded (FFPE) cutaneous biopsies. *J. Virol. Methods* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviro.2017.04.003>.
- Boivin, G., 2013. Detection and management of antiviral resistance for influenza viruses. *Influenza Other Respir. Viruses* 7 (Suppl. 3), 18–23. <http://dx.doi.org/10.1111/irv.12176>.
- Engelhard, D., Mohty, B., de la Camara, R., Cordonnier, C., Ljungman, P., 2013. European guidelines for prevention and management of influenza in hematopoietic stem cell transplantation and leukemia patients: summary of ECIL-4 (2011), on behalf of ECIL, a joint venture of EBMT, EORTC, ICHS, and ELN. *Transpl. Infect. Dis.* 15, 219–232. <http://dx.doi.org/10.1111/tid.12054>.
- Escuret, V., Collins, P.J., Casalegno, J.-S., Vadhieri, S.G., Cattle, N., Ferraris, O., Sabatier, M., Frobert, E., Caro, V., Skehel, J.J., Gamblin, S., Valla, F., Valette, M., Ottmann, M., McCauley, J.W., Daniels, R.S., Lina, B., 2014. A novel I221L substitution in neuraminidase confers high-level resistance to oseltamivir in influenza B viruses. *J. Infect. Dis.* 210, 1260–1269. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiu244>.
- Escuret, V., Cornu, C., Boutitie, F., Enouf, V., Mosnier, A., Bouscambert-Duchamp, M., Gaillard, S., Duval, X., Blanchon, T., Lepout, C., Gueyffier, F., Van Der Werf, S., Lina, B., 2012. Oseltamivir-zanamivir bitherapy compared to oseltamivir monotherapy in the treatment of pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus infections. *Antivir. Res.* 96, 130–137. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.08.002>.
- Escuret, V., Ferraris, O., Lina, B., 2011. The antiviral resistance of influenza virus. *Therapy* 8, 741–762. <http://dx.doi.org/10.2217/thy.11.79>.
- Ferraris, O., Kessler, N., Lina, B., 2005. Sensitivity of influenza viruses to zanamivir and oseltamivir: a study performed on viruses circulating in France prior to the introduction of neuraminidase inhibitors in clinical practice. *Antivir. Res.* 68, 43–48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2005.07.004>.
- Ghedin, E., Holmes, E.C., DePasse, J.V., Pinilla, L.T., Fitch, A., Hamelin, M.-E., Papenburg, J., Boivin, G., 2012. Presence of oseltamivir-resistant pandemic A/H1N1 minor variants before drug therapy with subsequent selection and transmission. *J. Infect. Dis.* 206, 1504–1511. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis>

- jis571.
- Ghedini, E., Laplante, J., DePasse, J., Wentworth, D.E., Santos, R.P., Lepow, M.L., Porter, J., Stellrecht, K., Lin, X., Operario, D., Griesemer, S., Fitch, A., Halpin, R.A., Stockwell, T.B., Spiro, D.J., Holmes, E.C., St George, K., 2011. Deep sequencing reveals mixed infection with 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus strains and the emergence of oseltamivir resistance. *J. Infect. Dis.* 203, 168–174. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiq040>.
- Hindson, B.J., Ness, K.D., Masquelier, D.A., Belgrader, P., Heredia, N.J., Makarewicz, A.J., Bright, I.J., Lucero, M.Y., Hiddessen, A.L., Legler, T.C., Kitano, T.K., Hodel, M.R., Petersen, J.F., Wyatt, P.W., Steenblock, E.R., Shah, P.H., Bousse, L.J., Troup, C.B., Mellen, J.C., Wittmann, D.K., Erndt, N.G., Cauley, T.H., Koehler, R.T., So, A.P., Dube, S., Rose, K., Montesclaros, L., Wang, S., Stumbo, D.P., Hodges, S.P., Romine, S., Milanovich, E.P., White, H.E., Regan, J.F., Karlin-Neumann, G.A., Hindson, C.M., Saxonov, S., Colston, B.W., 2011. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal. Chem.* 83, 8604–8610. <http://dx.doi.org/10.1021/ac202028g>.
- Hindson, C.M., Chevillet, J.R., Briggs, H.A., Gallichotte, E.N., Ruf, L.K., Hindson, B.J., Vessella, R.L., Tewari, M., 2013. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat. Methods* 10, 1003–1005. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth2633>.
- Hurt, A.C., Hardie, K., Wilson, N.J., Deng, Y.M., Osbourn, M., Leang, S.K., Lee, R.T.C., Iannello, P., Gehrig, N., Shaw, R., Wark, P., Caldwell, N., Givney, R.C., Xue, L., Maurer-Stroh, S., Dwyer, D.E., Wang, B., Smith, D.W., Levy, A., Booy, R., Dixit, R., Merritt, T., Kelsa, A., Dalton, C., Durheim, D., Barr, I.G., 2012. Characteristics of a widespread community cluster of H275Y oseltamivir-resistant A(H1N1)pdm09 influenza in Australia. *J. Infect. Dis.* 206, 148–157. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jis337>.
- Ison, M.G., Gubareva, L.V., Atmar, R.L., Treanor, J., Hayden, F.G., 2006. Recovery of drug-resistant influenza virus from immunocompromised patients: a case series. *J. Infect. Dis.* 193, 760–764. <http://dx.doi.org/10.1086/500465>.
- Jones, M., Williams, J., Gärtner, K., Phillips, R., Hurst, J., Frater, J., 2014. Low copy target detection by Droplet Digital PCR through application of a novel open access bioinformatic pipeline, “definetherain”. *J. Virol. Methods* 202, 46–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.02.020>.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., 2009. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinform.* Oxf. Engl. 25, 2078–2079. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>.
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., Law, M., 2012. Comparison of next-generation sequencing systems. *J. Biomed. Biotechnol.* <http://dx.doi.org/10.1155/2012/251364>.
- Marty, F.M., Vidal-Puigserver, J., Clark, C., Gupta, S.K., Merino, E., Garot, D., Chapman, M.J., Jacobs, E., Rodriguez-Noriega, E., Husa, P., Shortino, D., Watson, H.A., Yates, P.J., Peppercorn, A.F., 2017. Intravenous zanamivir or oral oseltamivir for hospitalised patients with influenza: an international, randomised, double-blind, double-dummy, phase 3 trial. *Lancet Respir. Med.* 5, 135–146. [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600\(16\)30435-0](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600(16)30435-0).
- McDermott, G.P., Do, D., Litterst, C.M., Maar, D., Hindson, C.M., Steenblock, E.R., Legler, T.C., Jouvenot, Y., Marrs, S.H., Bemis, A., Shah, P., Wong, J., Wang, S., Sally, D., Javier, L., Dinio, T., Han, C., Brackbill, T.P., Hodges, S.P., Ling, Y., Klitgord, N., Carman, G.J., Berman, J.R., Koehler, R.T., Hiddessen, A.L., Walse, P., Bousse, L., Zonev, S., Hefner, E., Hindson, B.J., Cauly, T.H., Hamby, K., Patel, V.P., Regan, J.F., Wyatt, P.W., Karlin-Neumann, G.A., Stumbo, D.P., Lowe, A.J., 2013. Multiplexed target detection using DNA-binding dye chemistry in droplet digital PCR. *Anal. Chem.* 85, 11619–11627. <http://dx.doi.org/10.1021/ac403061n>.
- Meijer, A., Lackenby, A., Hungnes, O., Lina, B., van-der-Werf, S., Schweiger, B., Opp, M., Paget, J., van-de-Kasstelee, J., Hay, A., Zambon, M., 2009. Oseltamivir-resistant influenza virus A (H1N1), Europe, 2007–08 season. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 552–560. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1504181280>.
- Okomo-Adhiambo, M., Fry, A.M., Su, S., Nguyen, H.T., Elal, A.A., Negron, E., Hand, J., Garten, R.J., Barnes, J., Xijian, X., Villanueva, J.M., Gubareva, L.V., 2013–14 US Influenza Antiviral Working Group, 2015. Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses, United States, 2013–14. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 136–141. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2101141006>.
- Pekin, D., Skhiri, Y., Baret, J.-C., Le Corre, D., Mazutis, L., Salem, C.B., Millot, F., El Harrak, A., Hutchison, J.B., Larson, J.W., Link, D.R., Laurent-Puig, P., Griffiths, A.D., Taly, V., 2011. Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab. Chip* 11, 2156–2166. <http://dx.doi.org/10.1039/c1lc20128j>.
- Rački, N., Dreč, T., Gutierrez-Aguirre, I., Blejec, A., Ravnkar, M., 2014. Reverse transcriptase droplet digital PCR shows high resilience to PCR inhibitors from plant, soil and water samples. *Plant Methods* 10, 42. <http://dx.doi.org/10.1186/s13007-014-0042-6>.
- Rameix-Welti, M.-A., Enouf, V., Cuvelier, F., Jeannin, P., van der Werf, S., 2008. Enzymatic properties of the neuraminidase of seasonal H1N1 influenza viruses provide insights for the emergence of natural resistance to oseltamivir. *PLoS Pathog.* 4, e1000103. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000103>.
- Sanmamed, M.F., Fernández-Landázuri, S., Rodríguez, C., Zárate, R., Lozano, M.D., Zubiri, I., Perez-Graña, J.L., Martín-Algarra, S., González, A., 2015. Quantitative cell-free circulating BRAFV600E mutation analysis by use of droplet digital PCR in the follow-up of patients with melanoma being treated with BRAF inhibitors. *Clin. Chem.* 61, 297–304. <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2014.230235>.
- Sheu, T.G., Deyde, V.M., Okomo-Adhiambo, M., Garten, R.J., Xu, X., Bright, R.A., Butler, E.N., Wallis, T.R., Klimov, A.I., Gubareva, L.V., 2008. Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 3284–3292. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00555-08>.
- Takashita, E., Ejima, M., Itoh, R., Miura, M., Ohnishi, A., Nishimura, H., Odagiri, T., Tashiro, M., 2014. A community cluster of influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013. *Euro Surveill.* 19.
- Taylor, S.C., Carbonneau, J., Shelton, D.N., Boivin, G., 2015. Optimization of Droplet Digital PCR from RNA and DNA extracts with direct comparison to RT-qPCR: clinical implications for quantification of Oseltamivir-resistant subpopulations. *J. Virol. Methods* 224, 58–66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.08.014>.

Chapitre 4. Diversification des populations virales minoritaires au cours de l'évolution de la maladie grippale facteur de gravité ou facteur d'extinction ?

1. Objectif

Cette étude a pour objectif la caractérisation de la diversification virale au cours de la maladie grippale de l'humain, chez le patient immunocompétent.

2. Article soumis

Pichon M., Simon B., Valette M., Bal A., Picard C., Escuret V., Ottman M., Gillet Y., Ader F., Lina B., Josset L. Diversity of influenza virus genome evolve during clinical course in immunocompetent patients. (Soumis à mSphere)

1 Evolution of influenza genome diversity during infection in immunocompetent patients

2 Maxime Pichon^{1,2,3}, Bruno Simon¹, Martine Valette^{1,2,3}, Antonin Bal^{1,2}, Caroline Picard^{1,2,3},

3 Vanessa Escuret^{1,2,3}, Michèle Ottmann¹, Yves Gillet⁴, Florence Ader⁵, Bruno Lina^{1,2,3},

4 Laurence Josset^{1,2,3,#}

5 1 - Virpath, CIRI, Univ Lyon, Inserm U1111 CNRS UMR5308, ENS, UCBL, Faculté de

6 Médecine Lyon Est, Lyon, France

7 2 - Laboratoire de Virologie, IAI, CBN, Groupement Hospitalier Nord, Hospices Civils de

8 Lyon, Lyon, France

9 3 - Centre National des Virus Respiratoires, IAI, CBN, Groupement Hospitalier Nord,

10 Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

11 4 - Service d'Accueil des Urgences Pédiatriques, Hôpital Femme-Mère-Enfant, Groupement

12 Hospitalier Est, Bron, Hospices Civils de Lyon, Bron, France

13 5 - Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Groupement Hospitalier Nord, Hospices

14 Civils de Lyon, Lyon, France

15 # To whom correspondence should be addressed.

16 Dr Laurence Josset

17 103 Grande-rue de la croix rousse

18 69004 Lyon, France

19 Tel: +33 (0)4 72 07 10 22

20 Email: laurence.josset@chu-lyon.fr

- 21 **Keywords:** Quasispecies; viral diversity; influenza; Next-Generation Sequencing
- 22 **Abstract word count:** 561
- 23 **Manuscript word count:** 3,977
- 24 **Running title:** Influenza genome diversification during infection.
- 25 **Sequence accession number:** The Sequence Read Archive (SRA) accession number for the
- 26 raw sequences is SRP140895 (samples) and SRP137044 (quality control).

27 **Abstract**

28 **Introduction.** Minor frequency viruses play many important roles during viral infection that
29 cannot be explained by the consensus sequence alone. In influenza, immunosuppressed
30 individuals appear to generate numerous viral variants, leading to subpopulations with
31 important role in infection. The objective of the present study was to describe viral
32 diversification over time in immunocompetent patients during influenza virus infection.

33 **Methods.** All clinical records of patients admitted to the Lyon university hospital (Lyon,
34 France) during the influenza infection epidemics of the 2010-2015 period and sampled at least
35 twice during their clinical management were retrospectively analyzed. To estimate
36 performance of the sequencing procedures, well-characterized plasmids containing each of the
37 8 segments of influenza viruses were used as quality controls. Diversity, i.e. the number of
38 validated single nucleotide variants, was analyzed to compare characteristics over time and
39 according to clinical severity (mild, severe with neurological complications, severe with
40 respiratory complications). **Results.** After validation on quality controls (n=51), and
41 verification of possible confusion bias, a 5%-threshold of detection was applied to clinical
42 viral sequences (n=29). At this threshold, amino-acid coordinates (n=183/4,246, 4.31%) were
43 identified as having at least one mutation during clinical course, independently of the clinical
44 severity. Considering a threshold of 4 days of symptoms, as a limit for early and late
45 sampling, diversity was significantly higher in late samples for the mild group, compared to
46 both early mild and severe groups ($p < 0.05$). At a single-segment scale, for PB2-coding
47 segment, diversity was significantly higher in early samples of the neurological group than in
48 both early and late samples in the respiratory group and for late samples in the mild group
49 ($p < 0.05$). For the NS1-coding segment, significant differences were observed between initial
50 diversity of mild and severe patients, as for early and late samples in mild patients ($p < 0.01$).

51 **Discussion.** This study is the first describing diversity through time, associating biological

52 and clinical information during viral diversification, during the infection of an
53 immunocompetent human host. This latter opens a large field of investigation in infectious
54 disease management using next-generation sequencing and suggest development of new
55 therapies, focusing on non-antigenic viral properties, in non-vaccine fields of research

56 **Importance**

57 Description of influenza virus genome diversification through time in immunocompetent
58 patients could open a large field of research to validate new antiviral therapies and more
59 secured vaccinations processes.

60 **Introduction**

61 Influenza is a highly contagious respiratory viral infection for humans, mainly caused by
62 influenza A (IAV) and B viruses (IBV), two of the five genera of the *Orthomyxoviridae*
63 family. These viruses are enveloped viruses with a segmented, single-stranded and negative
64 sense RNA genome (1). As for the other RNA viruses, genetic variability and plasticity of
65 genomes are inherent properties of influenza viruses. Because of the lack of exonuclease
66 activity and proof-reading function of viral RNA polymerase, replication of influenza virus
67 genome has been evaluated to have a high mutation rate (more than 2×10^{-5} substitutions per
68 nucleotide site per cell infection cycle) (2,3). Mutations are either rapidly lost in a non-
69 advantageous environments (where they reduce the viral ability to replicate), or expanded
70 (when they provide evolutionary advantage; for example antiviral resistance under selective
71 pressure) (4). Because of the presence of minor frequency viruses, many important
72 characteristics of a viral infection may not be entirely explained by the consensus sequence.
73 Genetically diverse subpopulations co-circulating in the infected host, termed “viral
74 quasispecies”, are generated upon replication of the infecting viruses (5). These viral
75 quasispecies have been associated with rapid replication kinetics, and have many important
76 implications for virus evolution and pathogenesis (6,7). In animal models, authors have
77 demonstrated that a mutant poliovirus diverse population had more replicative and fitness
78 advantages over its individual components, whereas high fidelity associated with lower
79 diversity, generated strains unable to reach the brain of a susceptible infected mice (8). Some
80 authors have proposed taking advantage of this mechanism for enhancement of vaccine
81 security with an higher efficacy (8–10). Indeed, without quasispecies generation, cooperation
82 between quasispecies is limited and vaccine strains could produce an improved immune
83 response, with absence (or limited) adverse event. There is, however, little information for
84 influenza disease. Some data have been obtained since the development of ultra-deep

85 sequencing (UDS) through studies of infected individuals during the last pandemic or
86 focusing on the hemagglutinin (HA) segment, or a broader study in immunosuppressed
87 patients (11). This is of importance, as, similarly to other respiratory viruses (e.g. respiratory
88 syncytial virus), immunosuppressed individuals appear to generate and spread numerous viral
89 variants, and the selective pressure of antiviral therapy could lead to the emergence of
90 antiviral-resistant viral variants (13,14). Although shedding can persist for months in the
91 immunocompromised setting allowing full analysis of the viral diversification, the defective
92 immune function enhances this trend (12). Thus, longitudinal data are required in
93 immunocompetent patients, which was the objective of the present study aimed to describe
94 viral diversification over time in human influenza virus infection.

95 **Methods**

96 *Ethical statement*

97 Respiratory samples (nasopharyngeal aspirate or swab) were collected for regular clinical
98 management during hospital stay. No additional samples were taken for the purpose of this
99 study. Patient confidentiality was strictly protected. This study was approved by the ethics
100 committee of Hospices Civils de Lyon, France, on May 3, 2017.

101 *Patient selection*

102 All clinical records of patients admitted to the Lyon university hospital (Hospices Civils de
103 Lyon, France) during the influenza infection epidemics of the 2010-2015 period and who
104 were sampled twice or more during their clinical management were retrospectively analyzed.

105 In order to standardize post-infection time, only patients who were symptomatic for 2 days or
106 less when the first respiratory sample was collected were included in this study. With the aim
107 to achieve a homogeneous panel of immunocompetent individuals and to limit potential

108 confusion bias, those with at least one of the following were excluded: incomplete clinical
109 file; having received antibiotics (antiviral, antibacterial, or antifungal) treatment; with a risk
110 factor for severe influenza (list of criteria for inclusion in a vaccination plan, including
111 chronic disease with or without treatment) (16). The clinical files of enrolled patients were
112 retrospectively analyzed and patients were then classified according to clinical outcome.
113 Patients were considered to have severe influenza when a respiratory and/or neurological
114 complication(s) were reported (other were considered to have mild influenza). Those with
115 severe influenza were further stratified according to complications. Neurological involvement
116 was based on physician report of objective neurological abnormalities such as
117 encephalopathy, encephalitis, focal symptoms or seizures and/or the necessity of admission in
118 an intensive care unit (ICU) or in a specialized neurology unit (15). Respiratory failure criteria
119 included patients with oxymetry <95% in an arterial sample and/or patients who required
120 invasive or non-invasive ventilation and/or hospitalized in an ICU for respiratory distress.

121 Respiratory samples (NasoPharyngeal Aspiration – NPA, TracheoBronchial Aspiration –
122 TBA, Broncho-Alveolar lavage – BAL, or Nasal Swabs – NS) from included patients were
123 considered. All analyzed samples were tested positive for influenza A or B virus using
124 Respiratory Multi Well System r-gene[®] kit (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) during
125 routine testing conducted at the virology department of the University Hospital of Lyon
126 (allowing semi-quantification by determination of a Cycle threshold –Ct-). After routine
127 screening, each specimen was stored at -20°C in Eagle's Minimal Essential Medium with
128 antibiotics. A limited number of freeze-thawing cycles were performed on ice, in order to
129 conserve viral RNA.

130 Samples were considered as “early” or “late” sampling. Considering that a median time to
131 symptoms alleviation is six days in a meta-analysis of trials focusing on benefit of antiviral

132 treatment, early sampling was a day-1, day-2, day-3, and day-4 sampling and late sampling a
133 day-5 or more sampling (17).

134 *Quality control preparation*

135 To estimate performance of the wet- and dry- lab procedures, well-characterized pHW2000
136 plasmids containing each of the 8 segments of influenza viruses were used to constitute
137 quality controls (18). Two different genetic backbones were used to simulate the two different
138 IAV subtypes: A/Moscow/10/99 was used for H3N2, and A/Lyon/969/2009 was used for
139 H1N1. To mimic viral diversification, mutated and non-mutated segments of one of the eight
140 segments (*i.e.* the neuraminidase (NA) gene) were mixed at pre-defined concentrations. For
141 H1N1, Three types of mutated NA plasmids, used for reverse genetic studies of the NA-
142 resistance, were used (H275-mutated, M15I-mutated and V106I-N248D-N200S – triple
143 mutated NA plasmid); for H3N2, a sole mutated plasmid was used (R292K-mutated NA).
144 Each plasmid was quantified using QuBit fluorometer 2.0 (LifeTechnologies, Carlsbad, CA,
145 USA) then pooled in determined concentration for each mutation to determine performances
146 (0.1% for QC1; 0.5% for QC2; 1% for QC3; 5% for QC4; and 10% for QC5). A mix of non-
147 mutated plasmid for both H1N1 and H3N2 subtypes was also used to verify the absence of
148 false positive detection (QC0).

149 Mixes were then considered similarly to clinical samples for the rest of the study.

150 *Sample preparation*

151 Nucleic acids were extracted from samples using an automatic extraction platform (Nuclisens
152 EasyMag, bioMérieux). To optimize performance of subsequent following reverse
153 transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and sequencing, without introducing to
154 much bias, all samples were treated with DNase. Briefly, 5 μ L of sample extract, 1 μ L of

155 Turbo DNase, 2µL of Turbo DNase buffer (LifeTechnologies) and, to limit a potential
156 residual RNase activity, 0.5µL of RNasin[®] Plus RNase Inhibitor (Promega Corporation,
157 Madison, WI, USA) were incubated for 90 min at 37°C. Enzymatic reaction was then stopped
158 by an immediate purification using a magnetic bead system (NucleoMag[®] NGS Clean-up and
159 Size Select, Macherey-Nagel, Düren, Germany) using a 0.5X ratio to limit potential small
160 RNA presence.

161 Viral nucleic acids were amplified differentially depending on the viral type determined
162 during routine testing. For IAV-positive samples, extracted nucleic acids were amplified using
163 a multi-segment RT-PCR as described by Zhou *et al.* in 2009 (19). For IBV-positive samples,
164 extracted nucleic acids were amplified using a RT-PCR as described by Zhou *et al.* in 2014
165 (20). Both of these protocol efficiencies were optimized using 0.5 µL of RNasin[®] Plus RNase
166 Inhibitor (Promega Corporation) to enhance PCR products quantities.

167 Correct amplification was verified by agarose gel electrophoresis (1%) and samples with no
168 band visible in the gel were excluded from further analyses. Validated samples were purified
169 using NucleoMag[®] NGS Clean-up and Size Select (Macherey-Nagel) quantified first by
170 Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) then by QuBit 2.0 fluorometer
171 with HS DNA quantification kit (LifeTechnologies).

172 *Library preparation and sequencing*

173 The library was constructed using the Nextera[™] XT DNA library kit (Illumina, San Diego,
174 CA, USA) according to manufacturer's recommendations. Briefly, samples were fragmented
175 and tagged during the same process by a Nextera XT transposase (Illumina). Then, these
176 adaptor-ligated DNA fragments were linked to the barcode and adaptors combination by a
177 limited-cycle PCR program (12 cycles). The resulting libraries were purified and size-selected
178 using 0.5X NucleoMag[®] beads (NucleoMag[®] NGS Clean-up and Size Select, Macherey-

179 Nagel). Using Nextera XT kit (Illumina), libraries were then pooled at an equimolar ratio, per
180 96, and then diluted in hybridation buffer. These multiplex samples were then denatured using
181 NaOH and TrisHCl before loading on the NextSeq500 mid-output cartridge. After the 2x150
182 bp NextSeq paired-end sequencing run, data were base called and reads were collected and
183 assigned to a sample when showing the same barcode combination, which generated Illumina
184 FastQ files.

185 *Sequencing data*

186 The reads obtained on the sequencing platform were submitted to NCBI's Sequence Read
187 Archive and can be found under project numbers SRP140895 (samples) and SRP137044
188 (quality control).

189 *Bioinformatic analysis*

190 Briefly, the downstream analysis of the resulting Illumina FastQ files included: quality and
191 read cleaning pre-processing, mapping to a generated reference and diversity analysis through
192 Single Nucleotide Variants (SNV) calling (Figure 1). Adapters, low base-quality ends and
193 read-pairs shorter than 50 bases were removed using cutadapt (v0.4.4) (21). Mapping to
194 references was obtained using BWA-MEM alignment tool (v0.7.15) (22). Strain subtypes
195 were verified on their hemagglutinin homology with subtype references. Consensus sequences
196 were generated to obtain the closest possible mapping reference allowing a new mapping
197 processing.

198 SNV calls were generated using naive variant caller (Biomina Galaxy platform) only filtering
199 low quality bases (score<Q20) (23). End-user workable files, presenting validated SNVs and
200 segment diversity, were generated using a homemade vcf analysis tool written in python
201 (available upon request). Validation of these SNVs relied on stringent criteria determined on

202 quality controls: variant's strand bias < 1; minimal frequency estimated > 1%; frequency
203 higher than a threshold based on the position coverage depth (24,25). Diversities, represented
204 by the number of validated single nucleotide variant (mSNV), reported herein correspond to
205 genomic polymorphism count weighted according to the proportion of the variants with
206 respect to the main nucleotide.

207 FASTA consensus sequences were aligned using MUSCLE v3.8.31 (26). Trees, obtained
208 using Maximum likelihood analyses on hemagglutinin (HA) sequences using IQ-Tree, were
209 visualized and annotated using FigTree (v1.4.2) (27). Bootstrap values were estimated after
210 1,000 bootstrap replicates (28).

211 Statistical analyses and representations were performed using Graphpad Prism software (v7.0)
212 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). Multiples testing were considered after
213 Bonferroni's multiple comparison correction if needed. Results were considered to be
214 significant when p-value (p) <0.05 (very significant when p<0.01)

215 **Results**

216 *Selected patients and specimens*

217 On the 692 clinical files screened for this study, 14 patients hospitalized from 2010 to 2015
218 with two or more respiratory samples (median number of samples per patient: 2; sampling
219 delay between two samples from one to 14 days) tested positive for IAV or IBV were
220 included for a total of 95 patient-days (i.e. a patient followed for a day). Clinical and
221 biological data are summarized in Table 1. Ten patients were considered to have severe
222 influenza (including seven in the respiratory group and three in the neurological group). Sex
223 ratio was 1:1. Median age was 5 years (95%CI [1.7; 74.8]). Among these, ten had respiratory
224 symptoms of variable severity (i.e. tachypnea, cough, rhinorrhea, bronchitis, wheezing)

225 (10/14; 71.4%) and seven non-respiratory symptoms (*i.e.* diarrhea, vomiting, cutaneous
226 eruption, adenopathy) (7/14; 50%). Over the clinical course of their disease, five patients
227 (5/14; 35.7%; two patients in each of the severe groups and one in the mild group) received
228 antivirals (oseltamivir treatment); nine patients received antibiotics, after sampling of the
229 sequenced sample (3/3, 100%, of those in the neurological group; 6/7, 85.7%, in the
230 respiratory group). Three patients died (2/3, 66.6%, in the neurological group; 1/7; 14.3% in
231 the respiratory group). All patients were sampled at least twice and one was sampled three
232 times. Most of the 29 samples were taken from the upper respiratory tract (22 samples; 12 NS
233 and 10 NPA); others were taken from the lower respiratory tract (7 samples; 6 BAL and 1
234 TBA).

235 *Determination of SNV frequency threshold*

236 A total of 51 artificial mixes of plasmids were sequenced to validate the process (27 H1N1-
237 like plasmids and 24 H3N2-like plasmids). For each of sequencing run containing at least one
238 sample sequenced for diversity analysis, at least one of these mixes of plasmids were
239 sequenced. This allowed extensive performance validation of intra-run performance and inter-
240 run reproducibility. Variants were detected in artificial mixes that included 10%, 5%, and 1%
241 mutants (respectively named QC3, QC2, and QC1). The sequencing of a fully-wild type
242 plasmid with a sufficient coverage (average depth 48,000X for H1N1-like plasmids and
243 44,000X for H3N2-like plasmids) found that there was no cross-contamination or
244 bioinformatics bias (Table 2). Sufficient depth to allow statistical analyses was observed in
245 clinical samples (Supplementary figure S1).

246 All expected variants were detected for mixes containing 5% and 10% mutants (as
247 summarized in Table 2). Sensitivity of detection decreased with the expected frequency of the
248 mutation; resulting from inconsistencies in detection for H1N1 (11 absence of detection on 25

249 nucleotide coordinates, 44%) and absence of detection in 80% of the sequenced QC for H3N2
250 at 1%-threshold. Mutants were not detected at 0.1% frequencies (named QC4) for both H1N1
251 and H3N2 plasmids and 0.5% (named QC5) for H1N1. Observed frequencies ranged from
252 150% to 250% of the expected frequency for H1N1; 82.8% to 89.2% for H3N2, without
253 significant difference between mutations or replicates ($p>0.05$).

254 Moreover, to ensure good reproducibility of the sequencing process, and to evaluate possible
255 inter-run bias, the plasmid mix with the lowest detected frequency (0.5% for H1N1-like
256 plasmid) was sequenced in triplicate in two different sequencing runs. As there was no
257 significant difference between the two runs (observed average frequencies 0.98 and 0.95,
258 $p>0.05$), the grouped analysis of different runs was possible, considering sufficient inter-run
259 reproducibility.

260 In light of these results, the detection threshold of 5% was used for the rest of the study.

261 *Influenza genome hotspots and coldspots*

262 In IAV samples and using a 5% filter, 183 amino-acid coordinates (183/4,246, 4.31%) were
263 identified as having at least one mutation during clinical course, independently of the clinical
264 outcome. Prevalence of these residues represented less than 5% of all residue coordinates
265 (from 3.16% for PA-coding segment to 6.61% for NA-coding segment, independently from
266 oseltamivir treatment). There was no significant difference in viral number between segments
267 ($p>0.05$).

268 As schematized in the Supplementary figure S2, hotspots (defined as regions with at least
269 twice the mean mutation rate of the considered segment) were significantly more frequent in
270 two of the eight major proteins (61/469 residues, 13.0% of the NA-coding segment; 21/229
271 residues, 9.17%, of the NS1-coding segment; *versus* 170/4246 residues, 4.00% for the whole

272 influenza genome; $p < 0.05$). Respective proportions or number of variants per segment were
273 summarized in Figure 2. Finally, hotspots were less frequent in PB1- and M1-coding
274 segments (24/757 residues, 3.17% of the total; 10/252 residues, 3.97% of the total segment
275 *versus* 170/4246 residues, 4.00% for the whole influenza genome; $p < 0.05$)

276 *Intra-host diversity develops differentially according to disease outcomes*

277 Even if samples could be clustered in the clade corresponding to their epidemiological season,
278 no clustering could be observed in terms of clinical outcome or day of sampling since
279 symptoms onset ($p > 0.05$). Phylogenic analyses of the HA sequence of the most covered
280 samples per patient is represented in Supplementary figure S3.

281 To overcome possible bias associated with the clinical non-standardized nature of sequenced
282 samples, a statistical analysis between diversity and Ct was performed and did not find any
283 significant association, allowing comparison of all samples ($p > 0.05$).

284 Viral genomic diversity was evaluated in each patient, considering a threshold of 4 days of
285 symptoms as a limit for early and late diversity. Diversity was found to significantly different
286 between early and late samples (mean difference: 4.533, $p < 0.05$; Figure 3a). Similarly, there
287 were differences in frequencies when stratified according to time and clinical groups or
288 subgroups ($p < 0.01$). A significantly lower diversification was found in late samples of the
289 mild group as compared to the severe neurological group (mean frequency difference 0.33,
290 $p < 0.01$) and as compared to the severe respiratory group (mean difference: 0.20, $p < 0.05$;
291 Figure 3b). A significantly lower diversity in late as compared to early samples of the mild
292 group was also found (mean difference: 23.82, $p < 0.05$). No significant correlation was found
293 between diagnosis Ct and diversity observed after sequencing ($p > 0.05$).

294 Analyses were then performed at a single-segment scale (significant results were summarized
295 in Figure 4). Diversity was significantly lower in early than in late samples (mean difference:
296 2.55; $p < 0.05$) for segment 3 (PB2-coding segment; Figure 4a). For this segment, there was
297 significantly greater diversity in the neurological group in early samples than in both early
298 and late samples in the respiratory groups (mean differences: 6.44 and 7.33, respectively;
299 $p < 0.05$) and for late samples in the mild group (mean difference 8.00; $p < 0.05$, Figure 4b). On
300 the NS1-coding segment, diversity was not significantly different in early and in late samples
301 for segment 8 (Figure 4c). On this segment, significant differences were observed between
302 diversity in specimens sampled early in the clinical course of mild-group patients and of
303 severe-group patients (mean difference 5.00 and 6.08; $p < 0.05$ and $p < 0.01$ for comparison with
304 respiratory and neurological groups respectively). Moreover, a very significant difference was
305 observed between early and late diversity for mild-group patients (mean difference 6.33;
306 $p < 0.01$; Figure 4d). Analyses performed using a 1%-threshold for SNV calling found similar
307 results.

308 Discussion

309 This study is the first, to the best of our knowledge, to describe influenza virus diversification
310 over time using clinical specimens sampled in immunocompetent patients and ultra-deep
311 sequencing.

312 Before the emergence of UDS, “classical” Sanger sequencing did not allow deep
313 characterization of these viral populations, due to insufficient depth of sequencing. At
314 contrary, UDS seems to fulfill this requirement (29–31). However, owing to possible
315 experimental errors, introduced both during wet-lab (*i.e.* RT-PCR but also sequencing itself)
316 and dry-lab (*i.e.* bioinformatic analyses) steps, appropriately prepared quality controls are
317 required to valid these processes (32). As UDS enables sequencing of several gigabases of

318 DNA in a single run, and because influenza genome is a limited 13 kb-long genome, a single
319 sequencing could allow its characterization with a high coverage (*i.e.* the proportion of the
320 genome that is sufficiently sequenced) and/or depth (*i.e.* the number of times a considered
321 nucleotide coordinate is sequenced on a reference genome) (33). Nevertheless, the segmented
322 nature of its genome makes it technically difficult to obtain sufficient (and homogenous)
323 coverage of all eight genomic segments in a single reaction to allow diversity analyses. The
324 present study describes the use of adapted quality controls to validate the comparison between
325 runs and between samples in viral variant analysis. Using well-characterized plasmids, all
326 expected mutations were observed using a frequency threshold of 5% for SNV variant calling.
327 Using only two different plasmids, a similar approach defined a frequency threshold of 2%,
328 but as described by the authors the pipeline used does not take strand bias into account,
329 justifying the supplementary precaution taken herein (even if no supplementary difference
330 was observed using a threshold of 1%) (25,34). Furthermore, plasmids are a more accurate
331 method to evaluate performance of NGS than whole viruses isolated in plaque assays as these
332 contain confounding mutations introduced during replication (35). It is important to note that,
333 herein, observed differences remained the same independently from the frequency filter that
334 was applied. Because the frequency threshold chosen has to be inversely related to the depth
335 of sequencing, this observation suggests that data from less deep sequencing remain of
336 interest to compare samples sequenced using the same method, which is of interest for future
337 studies.

338 In the present study, respiratory specimens were limited to those sampled from
339 immunocompetent patients before the introduction of antimicrobial therapy which allowed the
340 description of a baseline state of viral diversity without identifiable confounding factor. This
341 baseline diversity has already been described as resulting from a bottleneck in studies
342 investigating other types of virus (36). First, we observed that the complete genome scale

343 diversity increases during clinical course. Secondly, there were differences in terms of
344 genomic diversification according to clinical outcome; while a significant decrease was found
345 between early and late diversity in patients with mild influenza, no significant difference was
346 found for those with severe disease either in the neurological or respiratory group. This
347 difference suggests that diversification could be considered as a virulence factor for influenza,
348 as has been suggested for Coxsackie virus, and as described in a poliovirus mouse model, and
349 for Foot-and-Mouth Disease virus (8,37,38). Moreover, this result also supports the potential
350 value of an engineered virus with high fidelity polymerase to improve vaccine effectiveness
351 (10). Indeed, responsible for less severe manifestations, less diversified viruses obtained using
352 these polymerases would enhance vaccine effectiveness without a dramatic increase in
353 morbidity rates. Conversely, the dramatic decrease of diversity observed for mild influenza is
354 consistent with the notion of an error catastrophe threshold, as previously suggested in
355 therapeutic interventions (39). The observed results in the present study could suggest that a
356 decrease of diversity, associated with a viral clearance and improvement of symptoms,
357 reflects that the error threshold was exceeded that led to extinction of the viral population.
358 This observation could support the value of ribavirin, an antiviral drug that destabilizes the
359 polymerase, in influenza infection, as has been reported for Haanta virus (40). Furthermore,
360 the attenuated virulence of less diverse influenza virus populations could support the use
361 bioengineered virus bearing high-fidelity polymerase to produce less diverse quasispecies and
362 therefore enhance vaccine effectiveness without risk of secondary effects.

363 At the single segment scale, genomic diversity evolved differentially according to the
364 considered segment. The significant decrease observed at the level of the whole genome
365 between early and late samples was driven by evolutions of PB2-coding and NS1-coding
366 segments. These differences in diversity were associated with the clinical groups, with a
367 higher initial diversity in the severe neurological influenza group compared to both

368 respiratory and mild clinical groups in the PB2-coding segment, at the converse in the NS1-
369 coding segment.

370 It has previously been reported that NS1-coding segment mutations could be associated with
371 clinical outcome, for instance in equine model of infection or in highly pathogenic influenza
372 H5N1 infections (41,42). Non-antigenic segments (all but HA- and NA-coding segments)
373 could also be considered as a fitness-enhancing capacity for viruses, as demonstrated (43). For
374 example, substitutions in the nucleoprotein were considered as to play a major role in
375 adaptation and virulence, enhancing the capacity to escape to T cell mediated immunity (44).
376 The present study analyzed the diversity per nucleotide coordinate as a whole and not only
377 mSNV, and the data presented suggest that segments carrying high diversity could be
378 associated with clinical outcome, bringing potential properties to newly-created viruses.

379 The present study suffers from some limitations, mainly due to its retrospective nature. The
380 most important is the limited size that reduces the precision of observed SNV at a single
381 nucleotide coordinate level, but this did not impact greatly the results obtained. Moreover, the
382 sampling time points were those of routine care, and for research purposes it would be of
383 interest to increase the sampling frequency in order to obtain a finer analysis of daily diversity
384 variations. This analysis could validate the hypothesis of error-catastrophe threshold and
385 determine the level of this, in order to transfer these notions to clinical management.
386 However, without description of the clinical outcome, it has already been reported that
387 variation over less than one day could be considered as negligible, representing few viral
388 replication cycle.

389 Nevertheless, this work remains a preliminary study for influenza virus genomic
390 diversification, associating biological and clinical information during viral diversification,
391 during the infection of a human host. This latter opens a large field of investigation in

392 infectious disease management using next-generation sequencing and suggest development of
393 new therapies, focusing on non-antigenic viral properties, in non-vaccine fields of research.

394 **Funding information**

395 This work was supported by National Reference Center for Respiratory viruses. This work
396 was supported by the LABEX ECOFECT (ANR-11-LABX-0048) of Université de Lyon,
397 within the program "Investissements d'Avenir" (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French
398 National Research Agency (ANR). Funding sources did not play any role in the study or in
399 the preparation of the article or decision to publish.

400 **Acknowledgments**

401 We thank Gwendolyne Burfin (CNR Respiratory virus), for her technical assistance as well as
402 Philip Robinson (DRCI, Hospices Civils de Lyon) for his valuable help in manuscript
403 preparation.

404 **Conflicts of interest**

405 **MP** received research grant from Theradiag and Hologic and is member of the Young
406 microbiologist section of the French Society for Microbiology.

407 **AB** has served as consultant to and received research grant from bioMérieux.

408 **BL** is the co-Chair of the Global Influenza Initiative, a member of the scientific committee of
409 the Global Hospital Influenza Surveillance Network, a member of the Foundation for
410 Influenza. He received a travel grant from Alere to attend the RICAI 2017 Conference, and a
411 travel Grant from Seegene to attend the ECCMID conference in 2017. All personal
412 remuneration stopped in September 2010.

413 **LJ** has served on the French Advisory Board for SANOFI on the 'Quadrivalent Influenza
414 Vaccine' in 2017 and 2018.

415 The other authors (**BS, MV, VE, EJ, YG, MO**) declare that there are no conflicts of interest
416 associated to this study.

417 **Author contributions:**

418 **MP**: performed the sample preparations and sequencing, and performed bioinformatic
419 analysis, writing - original draft; main writer of the manuscript; **BS**: performed bioinformatic
420 analysis, writing - original draft; **MV**: performed the sample preparations, provided the QC
421 system; **AB**: performed the sample preparations; **VE**: guarantor for clinical data; **MO**:
422 provided the QC system; **EJ**: guarantor for clinical data; **YG**: guarantor for clinical data; **BL**:
423 guarantor for clinical data; **LJ**: conceptualization, formal analysis, writing - original draft,
424 guarantor for the NGS data. All authors reviewed and approved the final version of the
425 manuscript.

426 **References**

- 427 1. Wright P, Webster R. Orthomyxoviruses. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields*
428 *Virology*. Philadelphia: Wilkins; 2001.
- 429 2. Nobusawa E, Sato K. Comparison of the mutation rates of human influenza A and B
430 viruses. *J Virol*. 2006;80(7):3675–8.
- 431 3. Sanjuan R, Nebot MR, Chirico N, Mansky LM, Belshaw R. Viral Mutation Rates. *J*
432 *Virol*. 2010 Oct 1;84(19):9733–48.
- 433 4. Llauro AS, Andino R. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS*
434 *Pathog*. 2010;6.
- 435 5. Domingo E, Sheldon J, Perales C. Viral quasispecies evolution. *Microbiol Mol Biol Rev*.
436 2012;76(2):159–216.
- 437 6. Ramakrishnan MA, Tu ZJ, Singh S, Chockalingam AK, Gramer MR, Wang P, et al. The
438 feasibility of using high resolution genome sequencing of influenza A viruses to detect
439 mixed infections and quasispecies. *PloS One*. 2009;4(9):e7105.
- 440 7. Stech J, Xiong X, Scholtissek C, Webster RG. Independence of evolutionary and
441 mutational rates after transmission of avian influenza viruses to swine. *J Virol*. 1999
442 Mar;73(3):1878–84.
- 443 8. Vignuzzi M, Stone JK, Arnold JJ, Cameron CE, Andino R. Quasispecies diversity
444 determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature*.
445 2006;439.
- 446 9. Pfeiffer JK, Kirkegaard K. Increased fidelity reduces poliovirus fitness and virulence
447 under selective pressure in mice. *PLoS Pathog*. 2005 Oct;1(2):e11.
- 448 10. Vignuzzi M, Wendt E, Andino R. Engineering attenuated virus vaccines by controlling
449 replication fidelity. *Nat Med*. 2008 Feb;14(2):154–61.
- 450 11. Pichon M, Picard C, Simon B, Gaymard A, Renard C, Massonavette B, et al. Clinical
451 management and viral genomic diversity analysis of a child's influenza A(H1N1)pdm09
452 infection in the context of a severe combined immunodeficiency. *Antiviral Research*.
453 (Submitted);
- 454 12. Baz M, Abed Y, McDonald J, Boivin G. Characterization of multidrug-resistant
455 influenza A/H3N2 viruses shed during 1 year by an immunocompromised child. *Clin*
456 *Infect Dis*. 2006;43(12):1555–61.
- 457 13. Geis S, Prifert C, Weissbrich B, Lehnert N, Egerer G, Eisenbach C, et al. Molecular
458 characterization of a respiratory syncytial virus outbreak in a hematology unit in
459 Heidelberg, Germany. *J Clin Microbiol*. 2013;51(1):155–62.
- 460 14. van der Vries E, Stittelaar KJ, van Amerongen G, Veldhuis Kroeze E, de Waal L, Fraaij
461 PLA, et al. Prolonged influenza virus shedding and emergence of antiviral resistance in
462 immunocompromised patients and ferrets. *PLoS Pathog*. 2013;9(5):e1003343.

- 463 15. Khandaker G, Zurynski Y, Buttery J, Marshall H, Richmond PC, Dale RC, et al.
464 Neurologic complications of influenza A(H1N1)pdm09: Surveillance in 6 pediatric
465 hospitals. *Neurology*. 2012;79(14):1474–81.
- 466 16. Gill PJ, Ashdown HF, Wang K, Heneghan C, Roberts NW, Harnden A, et al.
467 Identification of children at risk of influenza-related complications in primary and
468 ambulatory care: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Respir Med*.
469 2015;3(2):139–49.
- 470 17. Dobson J, Whitley RJ, Pocock S, Monto AS. Oseltamivir treatment for influenza in
471 adults: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet*. 2015;385(9979):1729–
472 37.
- 473 18. Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG. A DNA transfection
474 system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *PNAS USA*.
475 2000;97(11):6108–13.
- 476 19. Zhou B, Donnelly ME, Scholes DT, St George K, Hatta M, Kawaoka Y. Single-reaction
477 genomic amplification accelerates sequencing and vaccine production for classical and
478 Swine origin human influenza A viruses. *J Virol*. 2009;83.
- 479 20. Zhou B, Lin X, Wang W, Halpin RA, Bera J, Stockwell TB. Universal influenza B virus
480 genomic amplification facilitates sequencing, diagnostics, and reverse genetics. *J Clin*
481 *Microbiol*. 2014;52.
- 482 21. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads.
483 *EMBnet.journal*. 2011;17(1):10.
- 484 22. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence
485 Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinforma Oxf Engl*. 2009;25(16):2078–9.
- 486 23. Blankenberg D, Von Kuster G, Bouvier E, Baker D, Afgan E, Stoler N, et al.
487 Dissemination of scientific software with Galaxy ToolShed. *Genome Biol*.
488 2014;15(2):403.
- 489 24. Guo Y, Cai Q, Samuels DC, Ye F, Long J, Li C-I, et al. The use of next generation
490 sequencing technology to study the effect of radiation therapy on mitochondrial DNA
491 mutation. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 2012;744(2):154–60.
- 492 25. Guo Y, Li J, Li C-I, Long J, Samuels DC, Shyr Y. The effect of strand bias in Illumina
493 short-read sequencing data. *BMC Genomics*. 2012;13(1):666.
- 494 26. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high
495 throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(5):1792–7.
- 496 27. Nguyen L-T, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: a fast and effective
497 stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol*.
498 2015;32(1):268–74.
- 499 28. Minh BQ, Nguyen MAT, von Haeseler A. Ultrafast Approximation for Phylogenetic
500 Bootstrap. *Mol Biol Evol*. 2013 May 1;30(5):1188–95.

- 501 29. Junemann S, Sedlazeck FJ, Prior K, Albersmeier A, John U, Kalinowski J. Updating
502 benchtop sequencing performance comparison. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2013;31.
503 Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2522>
- 504 30. Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, Constantinidou C, Gharbia SE, Wain J. Performance
505 comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol*.
506 2012;30.
- 507 31. Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR. A tale of three next
508 generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent. *Pacific Biosciences and*
509 *Illumina MiSeq sequencers. BMC Genomics*. 2012;13.
- 510 32. Robasky K, Lewis NE, Church GM. The role of replicates for error mitigation in next-
511 generation sequencing. *Nat Rev Genet*. 2014;15.
- 512 33. Glenn TC. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol Ecol Resour* [Internet].
513 2011;11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03024.x>
- 514 34. McCrone JT, Woods RJ, Martin ET, Malosh RE, Monto AS, Lauring AS. Stochastic
515 processes constrain the within and between host evolution of influenza virus. *eLife*.
516 2018;7.
- 517 35. Dulbecco R, Vogt M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis
518 viruses. *J Exp Med*. 1954 Feb;99(2):167–82.
- 519 36. McCrone JT, Lauring AS. Genetic bottlenecks in intraspecies virus transmission. *Curr*
520 *Opin Virol*. 2018;28:20–5.
- 521 37. Moratorio G, Henningsson R, Barbezange C, Carrau L, Borderia AV, Blanc H, et al.
522 Attenuation of RNA viruses by redirecting their evolution in sequence space. *Nat*
523 *Microbiol*. 2017;2:17088.
- 524 38. Rai DK, Diaz-San Segundo F, Campagnola G, Keith A, Schafer EA, Kloc A, et al.
525 Attenuation of Foot-and-Mouth Disease Virus by Engineered Viral Polymerase Fidelity.
526 *J Virol*. 2017;91(15).
- 527 39. Mori K, Murano K, Ohniwa RL, Kawaguchi A, Nagata K. Oseltamivir expands
528 quasispecies of influenza virus through cell-to-cell transmission. *Sci Rep*. 2015;5:9163.
- 529 40. Severson WE, Schmaljohn CS, Javadian A, Jonsson CB. Ribavirin causes error
530 catastrophe during Hantaan virus replication. *J Virol*. 2003;77(1):481–8.
- 531 41. Chambers TM, Quinlivan M, Sturgill T, Cullinane A, Horohov DW, Zamarin D, et al.
532 Influenza A viruses with truncated NS1 as modified live virus vaccines: pilot studies of
533 safety and efficacy in horses. *Equine Vet J*. 2009 Jan;41(1):87–92.
- 534 42. Steel J, Lowen AC, Pena L, Angel M, Solórzano A, Albrecht R, et al. Live attenuated
535 influenza viruses containing NS1 truncations as vaccine candidates against H5N1 highly
536 pathogenic avian influenza. *J Virol*. 2009;83(4):1742–53.

- 537 43. Raghwani J, Thompson RN, Koelle K. Selection on non-antigenic gene segments of
538 seasonal influenza A virus and its impact on adaptive evolution. *Virus Evol.*
539 2017;3(2):vex034.
- 540 44. Gong L., Bloom JD. Epistatically interacting substitutions are enriched during adaptive
541 protein evolution. *PLoS Genet.* 2014;10(5):e1004328.
- 542

543 **Figures legends**

544 *Figure 1. Sequencing data analysis pipeline.* SB: strand-bias; Q20: Phred score of 20, hg19:
545 human genome database 19th version.

546 *Figure 2. Average number (A) and relative proportions (B) of mSNV per segment per virus*
547 *type/subtype.* For each segment, three histograms were successively represented (H1N1 in
548 blue, H3N2 in red and IBV in green). Error bar correspond to the standard error of numbers of
549 mSNV (A) or mSNV frequencies (B). Only mSNV with frequency > 5% were considered
550 (see material and methods).

551 *Figure 3. Comparison of intra-host diversity over time (whole genome).* Diversity values
552 (number or frequencies of Single Nucleotide Variants – mSNV – observed in a sample,
553 summarizing the diversity of all segments) are represented according to the time of sampling
554 (before or after four days of symptoms, as no specimen was sampled at Day 4). * $p < 0.05$. **
555 $p < 0.01$.

556 *Figure 4. Comparison of intra-host diversity over time (per segment).* Diversity values
557 (number or frequencies of Single Nucleotide Variants – SNV – observed in a specific segment
558 of influenza virus) for (a and b) Segment 3 (or PB2) and (c and d) Segment 8 (or NS) are
559 represented in function of the time of sampling (before or after four days of symptoms). * $p <$
560 0.05 . ** $p < 0.01$. Note that to ease understanding, only segment with statistical differences
561 between early and late samples were represented on this figure.

562 **Table legends**

563 *Table 1. Demographic and clinical characteristics at baseline (A) and clinical evolution and*
564 *therapeutic management (B) of all patients included in the study.*

565 *Table 2. Quality Control (QC) performances.*

572 **Table**

573 *Table 1. Demographic and clinical characteristics at baseline (A) and clinical evolution and therapeutic*
 574 *management (B) of all patients included in the study.*

Baseline demographic and clinical characteristics	Mild influenza (n=4; 28.6%)	Severe influenza	
		Neurological (n=3; 21.4%)	Respiratory (n=7; 50.0%)
<i>Baseline demographic characteristics</i>			
Sex, male (% of the group)	4 (100)	1 (33.3)	3 (42.9)
Median age, years	1.0	78.4	74.0
<i>Characteristics at the time of admission (% of the group)</i>			
First Sample Nature : NP aspirate	3 (75)	2 (66.6)	1 (14.3)
First Sample Nature : NP swab	1 (25)	1 (33.3)	6 (85.8)
Influenza B virus	0	0	2 (28.6)
Influenza A virus (H1N1)	1 (25)	1 (33.3%)	1 (14.3)
Influenza A virus (H3N2)	3 (75)	2 (66.7%)	4 (57.2)
Comorbidities	1* (25)	0	0
<i>Clinical characteristics during clinical course (% of the group)</i>			
Ventilation	0	2 (66.6)	6 (85.7)
Signs of respiratory distress **	0	1 (33.3)	6 (85.7)
Bacterial pneumonia complicating influenza	0	2 (66.6)	2 (28.6)
Coma	0	1 (33.3)	0
Encephalitis		2 (66.6)	
Death	0	2 (66.6)	1 (14.3)
<i>Treatment (% of the group)</i>			
No Antiviral use during clinical management (number of patients, % of the clinical group)	0	1 (33.3%)	5 (71.4%)
Antiviral use***	1 (25%)	2 (66.6%)	2 (28.6%)
No Antibiotic	4 (100%)	0	1 (14.3%)
Antibiotics	0	3 (100%)	6 (85.7%)

*Comorbidities: Non-malignant chronic anemia of unknown etiology (never associated with changes in viral diversity)

** Signs of respiratory distress included: modification of breathing rate, increased heart rate, color changes, grunting, nose flaring, retractions, sweating wheezing, stridor, accessory muscle use, or changes in alertness.

***Antiviral use: use of oseltamivir during the clinical course of the disease.

575 Table 2. *QC performance*. Performances were calculated on A/H1N1 plasmids or A/H3N2 plasmids. In each case was represented the observed frequency.

	H1N1							H3N2		
	Expected freq.	Pos. 15	Pos. 106	Pos. 200	Pos. 248	Pos. 275	Total	Expected freq.	Pos. 292	Total
		Mean	Cv	Mean	Cv	Mean			Cv	
QC0	0	-	-	-	-	-	-	0	-	-
	0	-	-	-	-	-	-	0	-	-
	0	-	-	-	-	-	-	0	-	-
QC1	1	2.4	-	-	-	2.0	-	1	-	-
	1	-	-	-	-	1.8	-	1	-	-
	1	-	2.5	2.5	2.4	2.8	2.4	1	-	-
	1	-	-	2.7	2.3	2.5	-	1	-	-
	1	-	1.8	2.4	2.9	3.1	-	1	1.1	-
QC2	5	8.6	7.9	10.0	10.0	11.9	-	5	4.9	-
	5	9.9	4.1	6.2	6.9	5.4	-	5	4.7	-
	5	7.5	7.9	9.9	10.2	11.7	8.4	5	5.4	4.5
	5	2.8	8.4	10.3	11.0	12.3	-	5	2.8	-
	10	12.1	13.6	15.8	18.4	17.3	-	10	8.7	-
QC3	10	17.7	12.2	16.3	17.9	12.6	-	10	9.0	-
	10	7.5	11.7	14.2	15.4	19.6	15.0	10	9.0	8.3
	10	12.5	13.6	16.0	17.2	18.1	-	10	6.4	-
QC4	0.1	-	-	-	-	-	-	0.1	-	-
	0.1	-	-	-	-	-	-	0.1	-	-
	0.1	-	-	-	-	-	-	0.1	-	-
QC5*	0.5	-	0.8	1.2	1.1	1.1	-	0.5	-	-
	0.5	-	0.8	1.0	1.2	-	1.0	0.5	-	0.28
	0.5	-	0.5	1.1	1.6	-	-	0.5	-	-
QC5**	0.5	-	0.7	0.8	1.1	1.4	1.0	0.5	-	0.35
	0.5	-	0.7	0.8	1.0	-	-	0.5	-	-

576 Pos. indicates the amino acid concerned by the mutation (Segment 2 was coding for a wild type or M15I-mutated, V106I-mutated, N2005-mutated, N248D-mutated and/or H275Y-mutated
577 neuraminidase). QC5* and QC5** triplicates were sequenced twice in two different sequencing run to evaluate inter-run reproducibility.

566 **Figures**

567 *Figure 1. Sequencing data analysis pipeline.*

568 *Figure 2. Average number (A) and relative proportions (B) of mSNV per segment per virus*
569 *type/subtype.*

570 *Figure 3. Comparison of intra-host diversity through time (whole genome).*

571 *Figure 4. Comparison of intra-host diversity over time and per segment.*

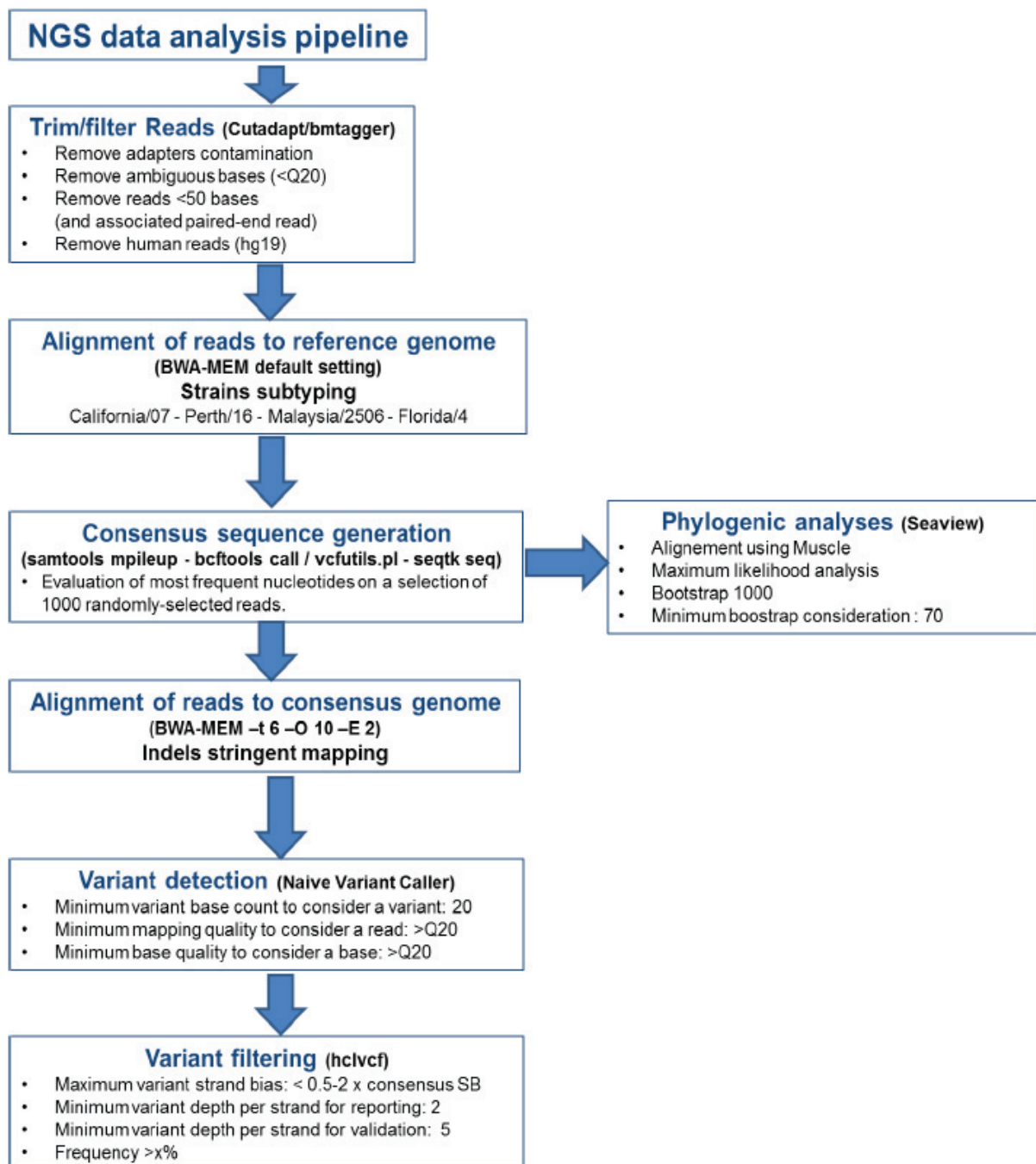


Figure 1

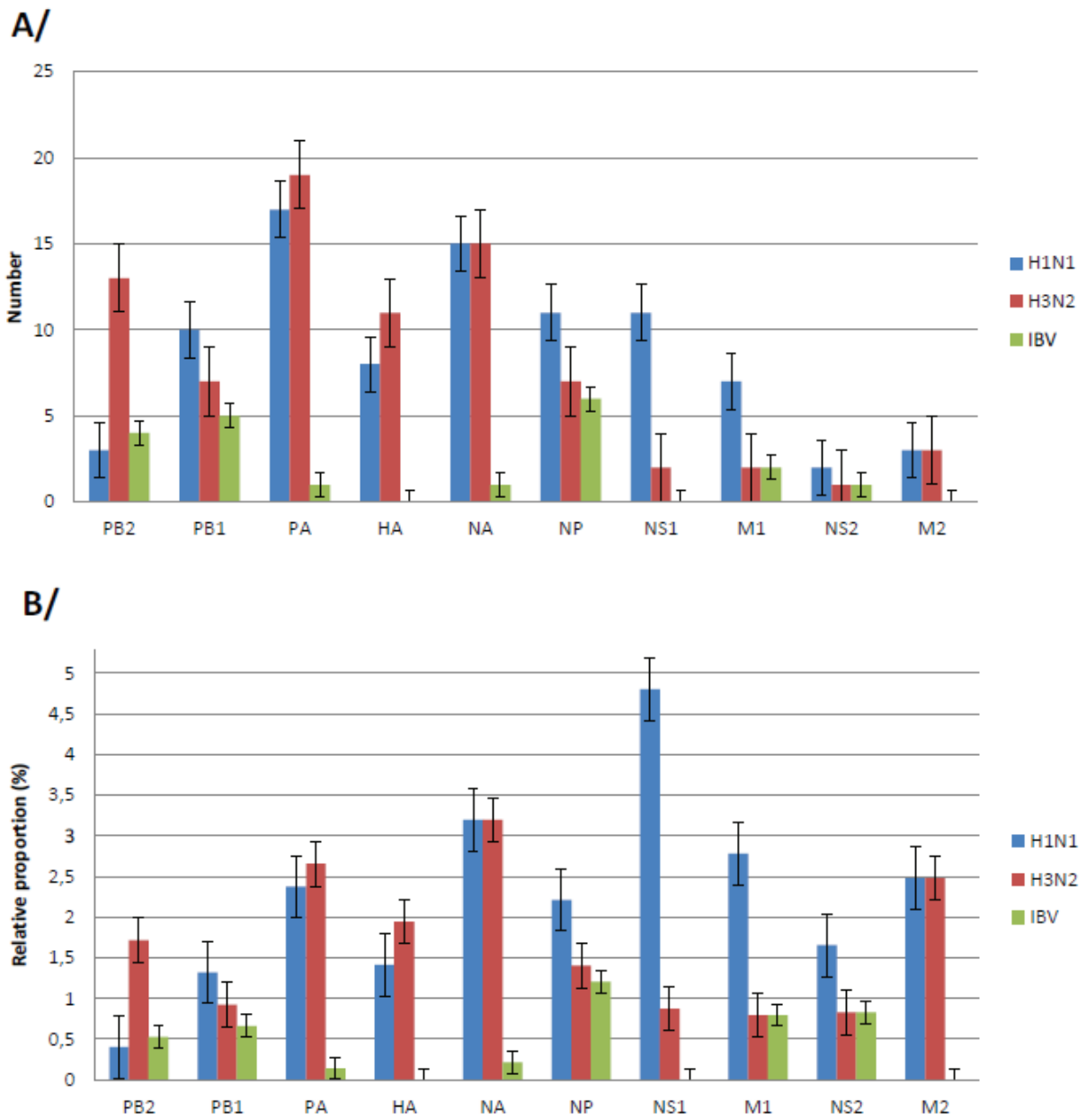


Figure 2

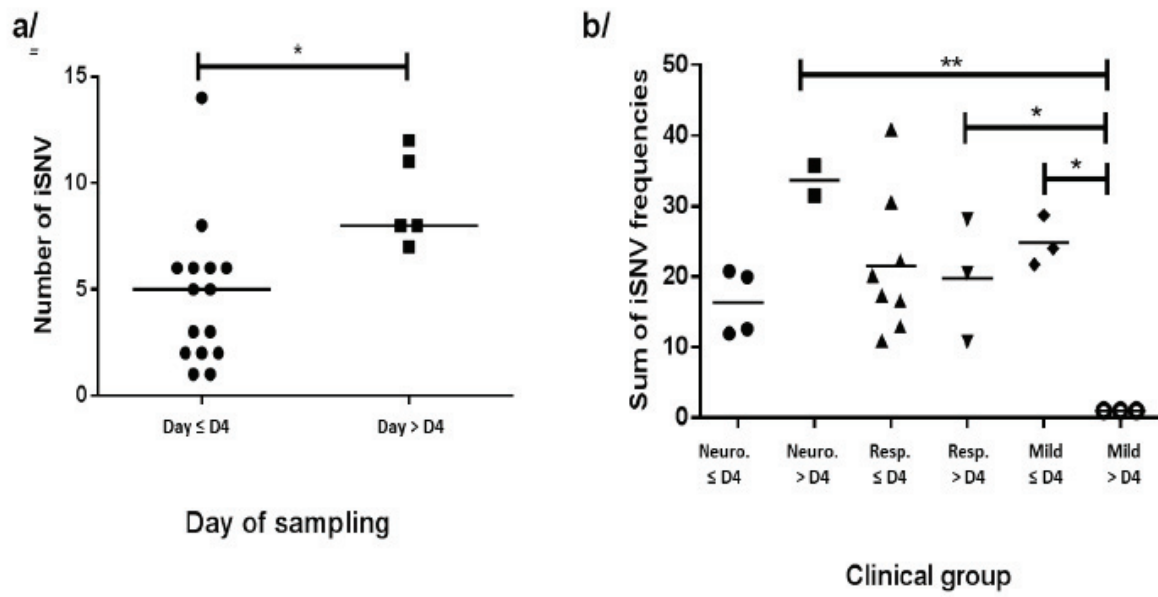


Figure 3

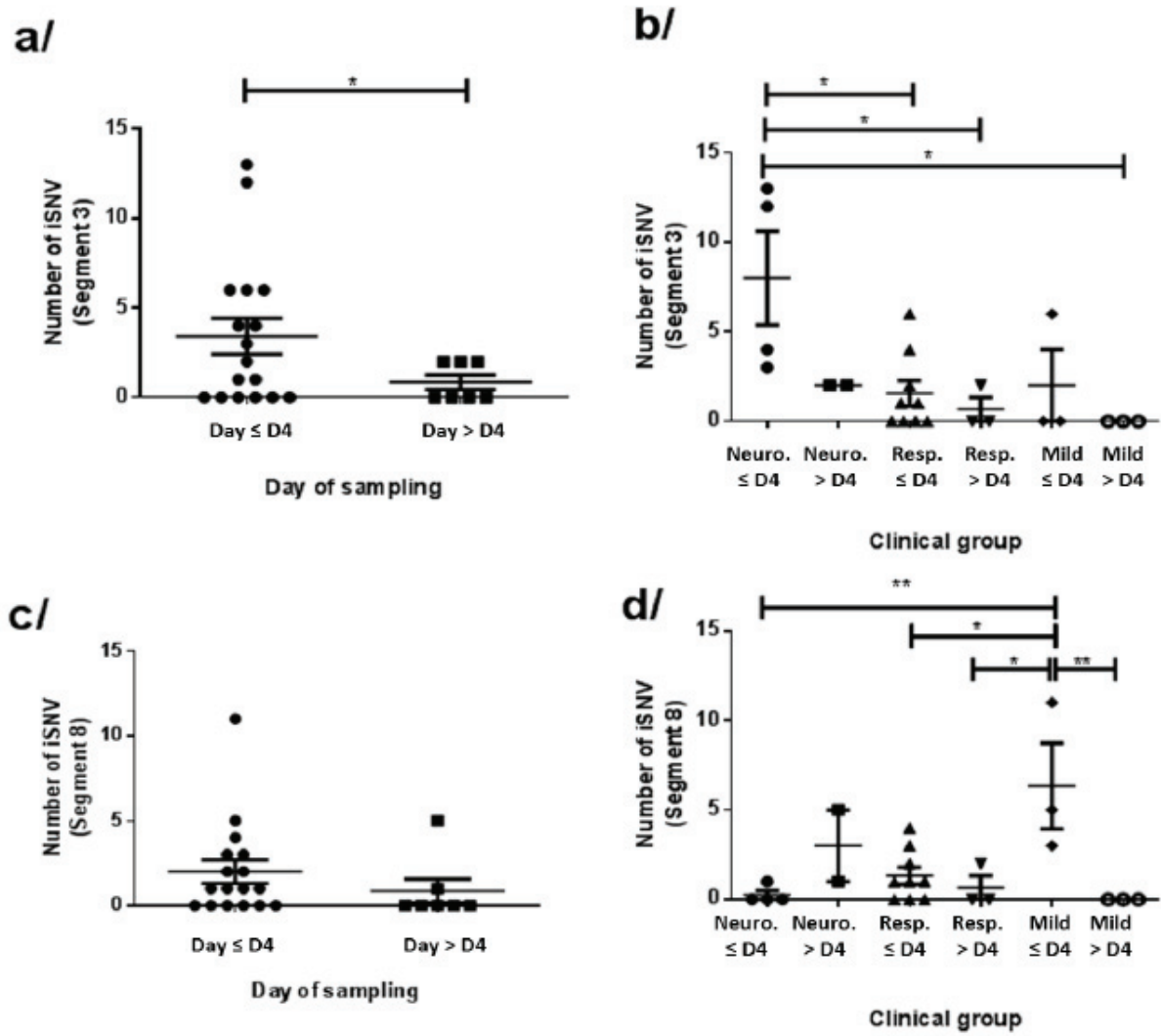
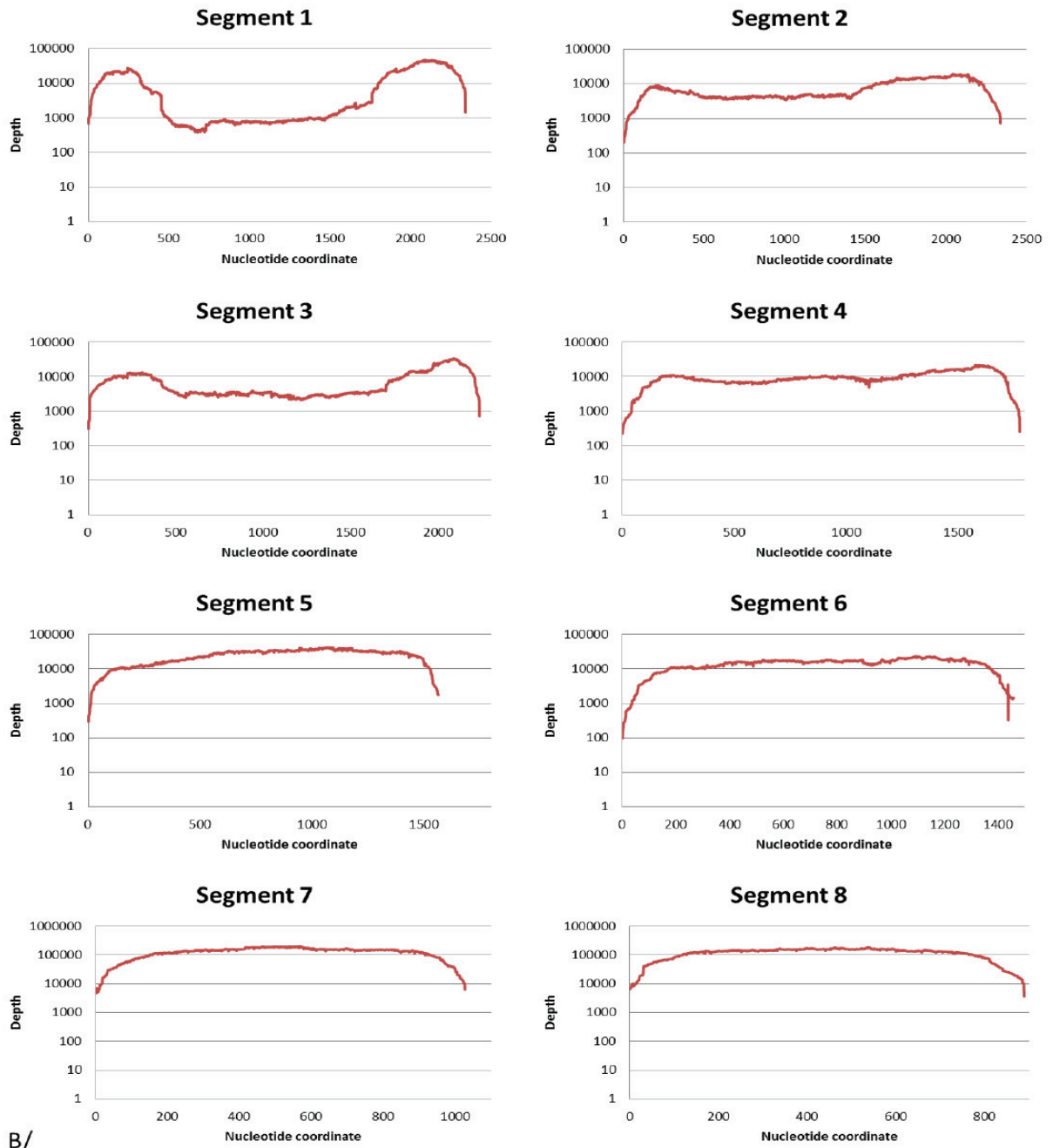


Figure 4

578 **Supplementary material**579 *Supplementary figure S1. Coverage plot for samples.*

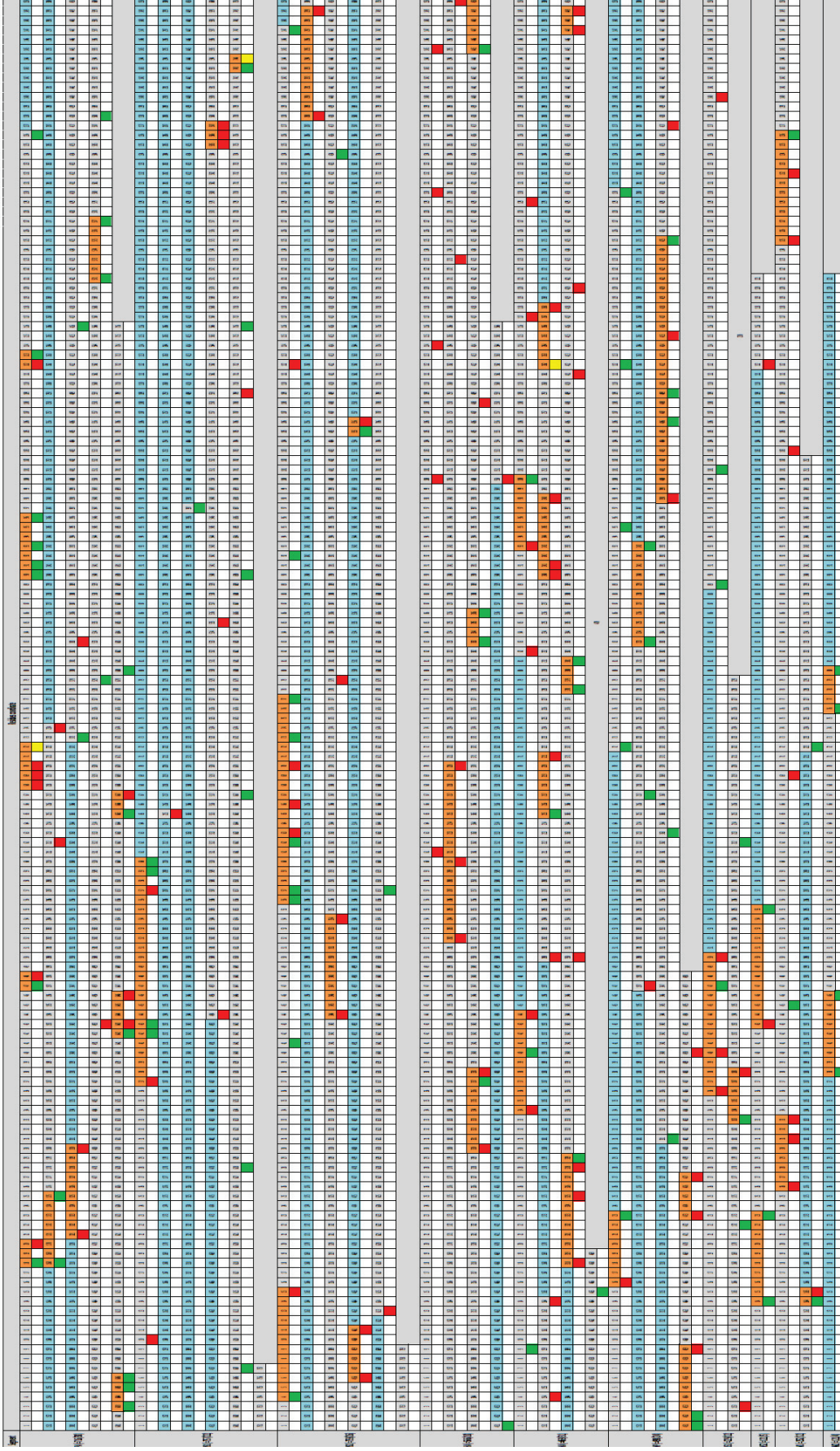
580 *Supplementary figure S2. Consensus minor variants contextualized within influenza genome segments. Each of the ten major proteins encoded by*
581 *each of the influenza genome segments (major proteins: PA, PB1, PB2, HA, NA, NP, NS1, M2, an alternative proteins: NS2, M2 are*
582 *represented). On this representation, substitutions vanishing or emerging between first and second sample for each patient are indicated in red*
583 *and green respectively (in yellow are represented coordinates with both indication, depending of the considered sample). Orange dots correspond*
584 *to residues implicated in a hotspot and light blue dots to those implicated in coldspot regions.*

585 *Supplementary figure S3. Phylogenetic analyses of sequenced samples.*

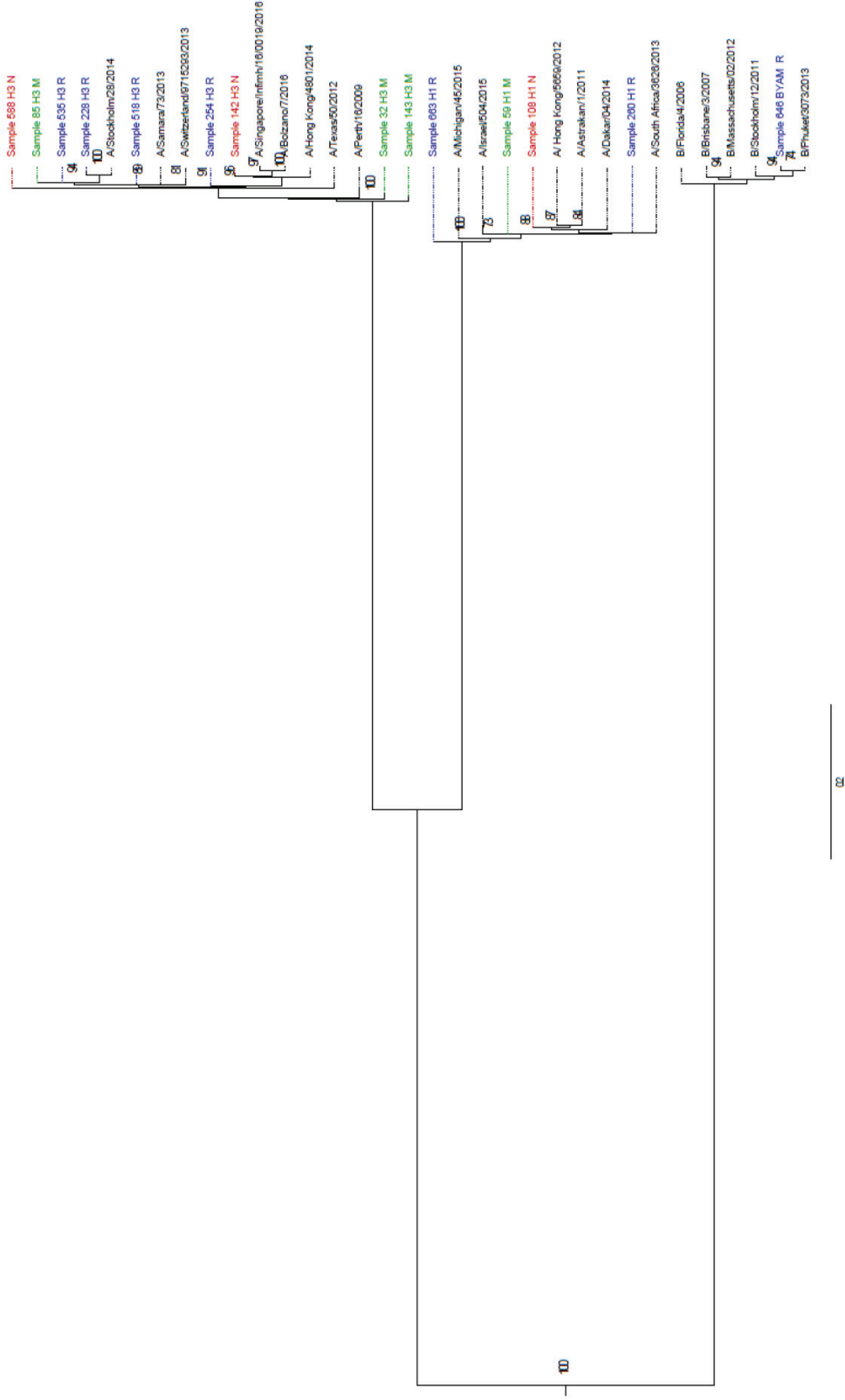


B/

Supplementary Figure S1



Supplementary Figure S2



Supplementary Figure S3

Chapitre 5. La diversité des populations virales minoritaires au temps précoce de la maladie : un facteur prédisposant aux formes graves ou aux échecs vaccinaux chez l'hôte sans facteur de risque prédisposant ?

1. Objectifs

Du fait de l'absence de données étudiant l'impact de la diversité des virus influenza chez les patients immunocompétents, au temps précoce de la maladie, ces travaux étudient l'association de cette diversité initiale en lien avec les conséquences cliniques de la maladie grippale.

2. Article en préparation

Pichon M., Simon B., Valette M., Bal A., Escuret V., Ottman M., Gillet Y., Ader F., Lina B., Josset L. Diversity of influenza virus genome is associated with clinical outcome in immunocompetent patients. (En préparation)

1 Introduction

2 Influenza is a highly contagious respiratory viral infection in humans, that is mainly caused by
3 influenza A (IAV) and B viruses (IBV), two viruses with segmented, single-stranded and
4 negative sense RNA genomes (1). Genetic variability and plasticity of genomes are inherent
5 properties of influenza viruses. In absence of exonuclease activity and proof-reading function,
6 replication of this viral genome has been found to have a high mutation rate (i.e. 10^{-5}
7 substitutions per nucleotide site per cell infection cycle) (2). Low fidelity of viral polymerases
8 could be considered as an evolution driving force. In Darwinian evolution, as in quasispecies
9 theory, selection acts on existing genetic variation to optimize fitness; influenzavirus
10 mutations are tolerated because they are rapidly lost in a non-advantageous environment (as
11 they are not cost-effective to reproduce), maintained (if they have an epistatic effect), or
12 rapidly expand (in one or two rounds of replication) when advantageous (3).

13 Annually, influenza viruses cause epidemics that have an important impact on public health.
14 Worldwide, seasonal influenza is responsible for two to five million severe cases and for
15 290,000 to 650,000 deaths. Some studies have focused on the association between viral
16 genomic diversity and virulence in different viral models. For example, two studies have
17 shown in animal models that a diverse poliovirus population was more replicative, and
18 demonstrated more fitness and scalable advantages than its individual components (4).
19 However, in IAV infections, diversity and its association with clinical outcome have been
20 mainly studied during prolonged excretion in immunosuppressed patients (severe combined
21 immunocompromised) and authors have demonstrated that intra-host evolution could impact
22 deeply influenza infection and spreading (5,6). Studies also focused on antiviral-resistant
23 virus development, searching for genome mutations supporting fitness sustainability during
24 resistance development (7).

25 Because no study focused on the influenza viruses' genomic diversity in immunocompetent
26 patients at an early stage of an acute disease, this study aimed to analyze the association
27 between viral diversification (at baseline) and clinical outcome during influenza diseases.

28 **Methods**

29 *Patient selection and classification*

30 All clinical records from patients who were admitted to a university hospital (Hospices Civils
31 de Lyon, France) during 5 successive influenza seasons (2010-2011; 2011-2012; 2012-2013;
32 2013-2014; 2014-2015) were screened for this study. Patients were excluded when clinical
33 files remained incomplete or when sample was not available, if they received antimicrobial
34 drugs (antiviral, antibacterial, or antifungal treatment), if they had (or were suspected of
35 having) at least one risk factor for severe influenza (defined as factors chosen for inclusion in
36 the French vaccination plan and other treated chronic diseases), or if the time since symptom
37 onset was superior than 2 days (8).

38 Clinical files of included patients were analyzed to obtain standardized data, and according to
39 these patients were classified according to clinical outcome. Patients who had at least one of
40 the following criteria were considered as having severe influenza and were classified
41 according to the nature of complication. Patients were included in respiratory group if they
42 presented blood gas alteration (hypoxemia <95% in an arterial sample or hypercapnia, with or
43 without oxygenotherapy, required ventilation (invasive or not), and/or were hospitalized in an
44 Intensive Care Unit (ICU) for respiratory distress. Patients were included in the neurological
45 group if they presented symptoms suggesting severe damage of the nervous system
46 (peripheral or central nervous system), seizures, encephalopathy, encephalitis or focal
47 symptoms, and/or if they were hospitalization in an ICU or specialized neurology unit for

48 neurological symptoms (9). Patients who did not present any severe complication were
49 considered as having a mild form of influenza disease.

50 Respiratory samples (NasoPharyngeal Aspirates, NPA; TracheoBronchial Aspirates, TBA);
51 Broncho-Alveolar Lavage, BAL; or Nasal Swabs, NS) from included patients were analyzed.
52 First positive samples for IAV or IBV using a respiratory multi-well system MWS r-gene[®] kit
53 (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) for each patient were included in this study.

54 *Quality control preparation*

55 To estimate the performance of the wet and dry lab procedures, mutants and wild-type (WT)
56 influenza segments cloned into pHW2000 plasmids were used to constitute quality controls as
57 described previously (10). According to these preparations, variants were considered when
58 frequency >1% and validated when frequency >5%.

59 *Sample preparation*

60 Sample preparation was performed according to a previously described process (6).
61 According to MWS r-gene[®] kit results, samples were amplified differentially depending on
62 the viral type (IAV or IBV). IAV were amplified using RT-PCR as described by Zhou *et al.*
63 (2009) (11). IBV, were amplified using RT-PCR described by Zhou *et al.* (2014) (12). These
64 two protocols were optimized by adding 0.5µl of RNasin plus RNase Inhibitor (Promega
65 Corporation, Madison, WI, USA) to enhance PCR product quantity.

66 *Library preparation and sequencing*

67 Libraries were constituted using Nextera™ XT DNA library kit (Illumina, CA, USA)
68 according to manufacturer's recommendation. Libraries were then pooled at equimolar ratio
69 (multiplexed per 96 libraries) and sequenced with a NextSeq500 mid-output cartridge (2x150
70 bp).

71 *Sequencing data*

72 The reads obtained on the sequencing platform were submitted to NCBI's Sequence Read
73 Archive. These reads can be found under project number SRP141117 (clinical samples).

74 *Bioinformatic analysis*

75 Briefly, fastQ files were analyzed to obtain consensus sequences and minor variant SNV
76 (mSNV) (10). When sufficiently sequenced, these mSNVs were validated relying on
77 stringent criteria determined on quality controls: variant's strand bias <1 , minimal frequency
78 estimated $>5\%$, and frequency higher than a threshold based on the position coverage depth
79 (13,14). Diversities reported in the results correspond to genomic polymorphisms count
80 unweighted or weighted according to variant proportion.

81 Hotspot regions were defined, on residue sequences, as regions presenting twice more
82 substitutions than the mean of the whole segment; coldspot regions were defined as regions
83 presenting less than 50% of the mean substitution rate of the whole segment. For these two
84 regions, substitution coordinates were pooled from all samples and substitution-free windows,
85 for coldspots, or windows with two or more substitutions, for hotspots, of significantly large
86 size were detected. All coordinates present in these windows were quantified then compared
87 between segments.

88 Statistical analyses and representations were performed using GraphPad Prism software
89 (V5.0; GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Results were considered to be significant
90 when p-value (p) < 0.05 (very significant when $p < 0.01$).

91 *Ethical statement*

92 Respiratory samples were collected for routine clinical management during hospital stay and
93 no additional samples were taken for the purpose of this study. Patient confidentiality was

94 strictly protected. This study was approved by the local ethical committee of Hospices Civils
95 de Lyon, France, on May 3, 2017.

96 **Results**

97 *Patients and samples*

98 As summarized in Figure 1, on 2,627 patients consulting or hospitalized in HCL for influenza
99 in 2010-2015, 454 patients could be included, and 125 influenza genomes were successfully
100 sequenced (with a depth allowing analyses of validated SNP at 5%, coverage is described in
101 supplementary Figure S1). Sex-ratio was 6/4 (73 males; 60%) and the median age was 73
102 years (range: 0 to 98 years). More than half of the patients (67/125; 54%) were severe; 82% of
103 whom (55/67) had respiratory complications at admission. Among the total population, 101
104 patients (101/125; 80.8 %) had respiratory symptoms of variable gravity, and 96 both
105 respiratory and non-respiratory symptoms (96/125; 76.8%). During the clinical course of their
106 disease, most of the patients (60/125; 64%) received antibiotics, and just under half (53/125;
107 42.4%) received antiviral treatment. Mean hospital length of stay was 15 days (range: 0 to 110
108 days), and that of ICU was five days (range: 0 to 81 days). Eight patients died (8/125; 6.4%).
109 Most of the 125 samples were from the upper respiratory tract (URT; 113 samples: 99 NS and
110 14 NPA); others were sampled in the lower respiratory tract (LRT; 12 samples: 10 BAL and 2
111 TBA). All clinical and biological data are summarized in Table 1. The median interval
112 between symptom onset and sampling were not significantly different between mild (1 day)
113 and severe influenza patients of both clinical groups (1 day for both groups; $p>0.05$).
114 Similarly, no statistical difference between repartition of influenza types and subtypes could
115 be observed between mild and severe influenza patients ($p>0.05$).

116 *Phylogenic analyses*

117 Maximum likelihood trees were produced by Neighbor Joining Methods using consensus
118 sequences, for sufficiently sequenced samples (Supplementary Figure S1), to compare viral
119 clustering and clinical data (Supplementary Figure S2). According to the Metadata-driven
120 Comparative Analysis Tool, no significantly different mutations and clustering could be
121 considered between samples of both severe groups and mild influenza samples ($p > 0.05$).

122 For H1N1 viruses, all but two belonged to the 6B clade ($n=29/31$; 93.5%). For H3N2, twelve
123 samples belonged to 3C2a (14.6%) and 15 to 3C3a (18.9%) cluster. For Influenza B viruses,
124 six of the analyzed sequences belong to the clade 1A of Victoria lineage (50%) and 6 to clade
125 2 of Yamagata lineage (50%).

126 *Hotspot and coldspots on the influenza genome*

127 Because no significant difference could be observed in terms of clinical presentation between
128 each of the tested viral types (Table1), an analysis of hotspots and coldspots (respectively
129 highly and poorly diversified genomic regions) was performed. At a 5% filter, 675 amino-acid
130 coordinates (675/4,246, 15.9%) presented at least one mSNV, independently of the clinical
131 outcome (summarized in Figure 2 and presented in Supplementary Figure S5). Independently
132 of the viral type/subtype, prevalence of these mSNV represent less than one third of the
133 residue coordinates (from 28.8% for NS1-coding segment to 7.9% for M1-coding segment).
134 Moreover, independently from the clinical group, the NS1-coding segment presented
135 significantly more variants (66/229; 28.8% of residues presented mSNV) than each of the
136 other segments ($p < 0.05$). Similarly, respiratory samples presented significantly more minor
137 variants (mean 43.5 mSNV per genome) than neurological (11.7 mSNV per genome) or mild
138 influenza (24.7) ($p < 0.01$).

139 Because specific mSNV shared between two or three of the clinical groups (or between
140 different patients of the same clinical group) were rare (69/4,246, 1.6%), it was not possible to

141 investigate the distribution of substitutions according to clinical outcome. Hotspots of mSNV
142 were significantly more frequent (66/252 residues; 26.2% of the total segment *versus* a mean
143 of 12.9% for the whole influenza genome; $p < 0.05$) and longer (mean 33 residues per hotspot,
144 13.1% of the total segment *versus* a mean 0.6% for the whole virus; $p < 0.01$) in the M1-
145 coding segment. Coldspots were less frequent (43/229 substitutions of minor frequencies,
146 18.8% of the total segment *versus* a mean 37.5% for the whole influenza genome; $p < 0.01$)
147 and shorter (mean 14.3 residues per coldspot, 6.3% of the total segment *versus* a mean of
148 37.5% for the whole virus; $p < 0.01$) on the NS1-coding segment. On the alternative coding
149 reading frame NS2, a single coldspot could be observed, highlighting that this open-reading
150 frame presented fewer substitution than the mean of the whole genome (12 substitutions of
151 minor frequencies on 121 residues, 9.92% of the total segment *versus* a mean of 37.5% for the
152 whole genome of influenza; $p < 0.01$). Note that this alternative protein presented shorter
153 coldspots than the mean coldspot length in the whole viral genome ($p < 0.01$). Number and
154 frequencies of residues implicated in cold- or hot-spots were summarized in Figure 3.

155 No significant difference was observed between segment in terms of residues implicated in
156 coldspot regions ($p > 0.05$). These coldspots regions were significantly shorter for the
157 alternative protein M2 (mean 12.7 residues per coldspot, 10.5% of the total segment *versus* a
158 mean of 37.5% for the whole virus; $p < 0.01$). Conversely, for both NP- and M1- coding
159 segments, coldspots were longer (35.3 residues; 7.5% and 32.0 residues; 12.7% for NP and
160 M1-coding segment respectively *versus* a mean of 21.5; 37.5% for the whole virus; $p < 0.01$)

161 *Diversity comparison between clinical groups*

162 Confounding factors potentially influencing viral genome diversity, namely viral load, sample
163 type, and patient age were considered first. No significant association between diversity and
164 viral Ct could be found ($p > 0.05$). In addition, LRT and URT samples for patients with severe

165 influenza (for whom both types of samples were available) were compared and no significant
166 difference in viral genomic diversity was found ($p>0.05$), as was the case between pediatric
167 and adult patients ($p>0.05$). All analyses on genomic diversities were subsequently performed
168 pooling all samples and analyzed using a 5% threshold.

169 Considering respiratory and neurological complications together as severe influenza, at 5%
170 filtering, H3N2 diversity in such patients was significantly higher than IBV diversity sampled
171 from patients with mild influenza for segment 2 (PB1-coding segment; $p<0.05$), and lower
172 than all IBV diversity for segment 5 (NA-coding segment; $p<0.01$; Figure 4). An additional
173 difference was observed using a 1% filter, and this was between the diversities of H1N1 and
174 H3N2 that were both sampled in severe patients ($p<0.05$)

175 No significant difference was found at the whole genome scale ($p>0.05$). At the segment
176 scale, a significant difference in mSNV frequencies between neurological and respiratory
177 complications was observed on the segment 6 (NA-coding segment) for H3N2 samples (56.4
178 *versus* 68.9 for neurological and respiratory groups respectively; $p<0.05$, Figure 5)

179 Note that results were similar using a 1% threshold and are summarized in Supplementary
180 Figures S4 and S5.

181 **Funding information**

182 This work was supported by National Reference Center for Respiratory viruses. Funding
183 sources did not play any role in the study or in the preparation of the article or decision to
184 publish.

185 **Acknowledgments**

186 We thank Gwendolyne Burfin (CNR Respiratory virus), for her technical assistance as well as
187 Philip Robinson (DRCI, Hospices Civils de Lyon) for his valuable help in manuscript
188 preparation and ECOFECT structures for their support.

189 **Conflicts of interest**

190 **MP** received research grant from Theradiag and is member of the Young microbiologist
191 section of the French Society for Microbiology.

192 **AB** has served as consultant to and received research grant from bioMérieux.

193 **BL** is the co-Chair of the Global Influenza Initiative, a member of the scientific committee of
194 the Global Hospital Influenza Surveillance Network, a member of the Foundation for
195 Influenza. He received a travel grant from Alere to attend the RICAI 2017 Conference, and a
196 travel Grant from Seegene to attend the ECCMID conference in 2017. All personal
197 remuneration stopped in September 2010.

198 **LJ** has served on the French Advisory Board for SANOFI on the 'Quadrivalent Influenza
199 Vaccine' in 2017 and 2018.

200 The other authors (**BS, MV, VE, EJ, YG, MO**) declare that there are no conflicts of interest
201 associated to this study.

202 The other authors declare that there are no conflicts of interest.

203 **Author contributions:**

204 **MP**: performed the sample preparations and sequencing, and performed bioinformatic
205 analysis, writing - original draft; main writer of the manuscript; **BS**: performed bioinformatic
206 analysis, writing - original draft; **MV**: performed the sample preparations, provided the QC
207 system; **AB**: performed the sample preparations; **VE**: guarantor for clinical data; **MO**:

208 provided the QC system; EJ: guarantor for clinical data; YG: guarantor for clinical data; BL:
209 guarantor for clinical data; LJ: conceptualization, formal analysis, writing - original draft,
210 guarantor for the NGS data. All authors reviewed and approved the final version of the
211 manuscript.

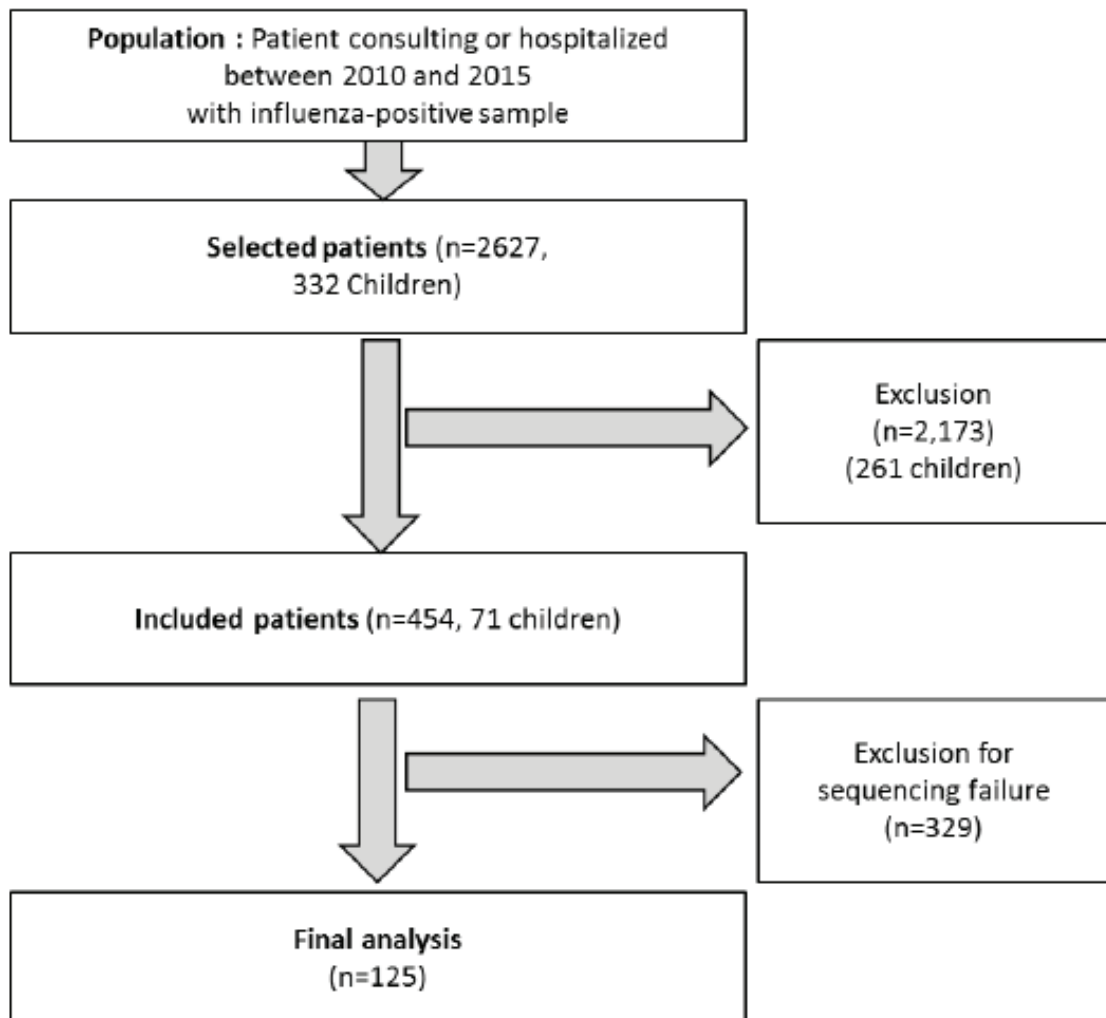
212 References

- 213 1. Wright P, Webster R. Orthomyxoviruses. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields*
214 *Virology*. Philadelphia: Wilkins; 2001.
- 215 2. Nobusawa E, Sato K. Comparison of the mutation rates of human influenza A and B
216 viruses. *J Virol*. 2006;80(7):3675–8.
- 217 3. Lauring AS, Andino R. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS*
218 *Pathog*. 2010;6.
- 219 4. Vignuzzi M, Stone JK, Arnold JJ, Cameron CE, Andino R. Quasispecies diversity
220 determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature*.
221 2006;439.
- 222 5. Rogers MB, Song T, Sebra R, Greenbaum BD, Hamelin M-E, Fitch A, et al. Intra-host
223 dynamics of antiviral resistance in influenza A virus reflect complex patterns of segment
224 linkage, reassortment, and natural selection. *mBio*. 2015;6(2).
- 225 6. Pichon M, Picard C, Valette M, Bal A, Escuret V, Ottman M, et al. Influenza virus
226 genome diversity during acute infection in children is associated with severe influenza.
227 En preparation;
- 228 7. Renzette N, Caffrey DR, Zeldovich KB, Liu P, Gallagher GR, Aiello D, et al. Evolution
229 of the influenza A virus genome during development of oseltamivir resistance in vitro. *J*
230 *Virol*. 2014;88(1):272–81.
- 231 8. Gill PJ, Ashdown HF, Wang K, Heneghan C, Roberts NW, Harnden A, et al.
232 Identification of children at risk of influenza-related complications in primary and
233 ambulatory care: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Respir Med*.
234 2015;3(2):139–49.
- 235 9. Khandaker G, Zurynski Y, Buttery J, Marshall H, Richmond PC, Dale RC, et al.
236 Neurologic complications of influenza A(H1N1)pdm09: Surveillance in 6 pediatric
237 hospitals. *Neurology*. 2012;79(14):1474–81.
- 238 10. Pichon M, Simon B, Valette M, Bal A, Picard C, Escuret V, et al. Evolution of influenza
239 virus genome during clinical course in immunocompetent patients. Submitted;
- 240 11. Zhou B, Donnelly ME, Scholes DT, St George K, Hatta M, Kawaoka Y. Single-reaction
241 genomic amplification accelerates sequencing and vaccine production for classical and
242 Swine origin human influenza A viruses. *J Virol*. 2009;83.

-
- 243 12. Zhou B, Lin X, Wang W, Halpin RA, Bera J, Stockwell TB. Universal influenza B virus
244 genomic amplification facilitates sequencing, diagnostics, and reverse genetics. *J Clin*
245 *Microbiol.* 2014;52.
- 246 13. Guo Y, Cai Q, Samuels DC, Ye F, Long J, Li C-I, et al. The use of next generation
247 sequencing technology to study the effect of radiation therapy on mitochondrial DNA
248 mutation. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen.* 2012;744(2):154–60.
- 249 14. Guo Y, Li J, Li C-I, Long J, Samuels DC, Shyr Y. The effect of strand bias in Illumina
250 short-read sequencing data. *BMC Genomics.* 2012;13(1):666.

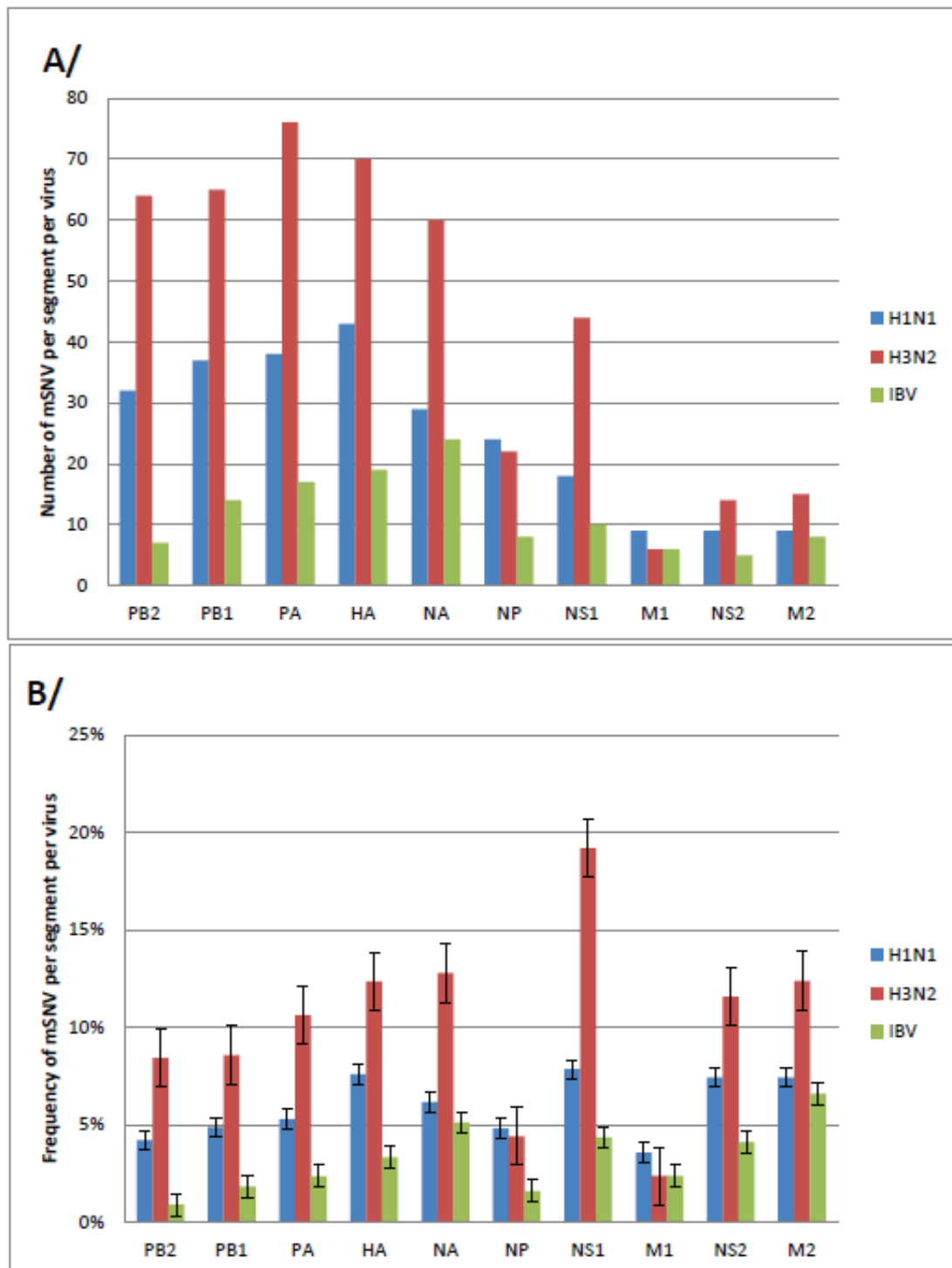
251 **Figures legends**

252 *Figure 1. Selection and inclusion of analyzed samples. Pediatric clinical files correspond to*
253 *patients consulting/hospitalized in pediatric hospital (≤ 15 years old).*



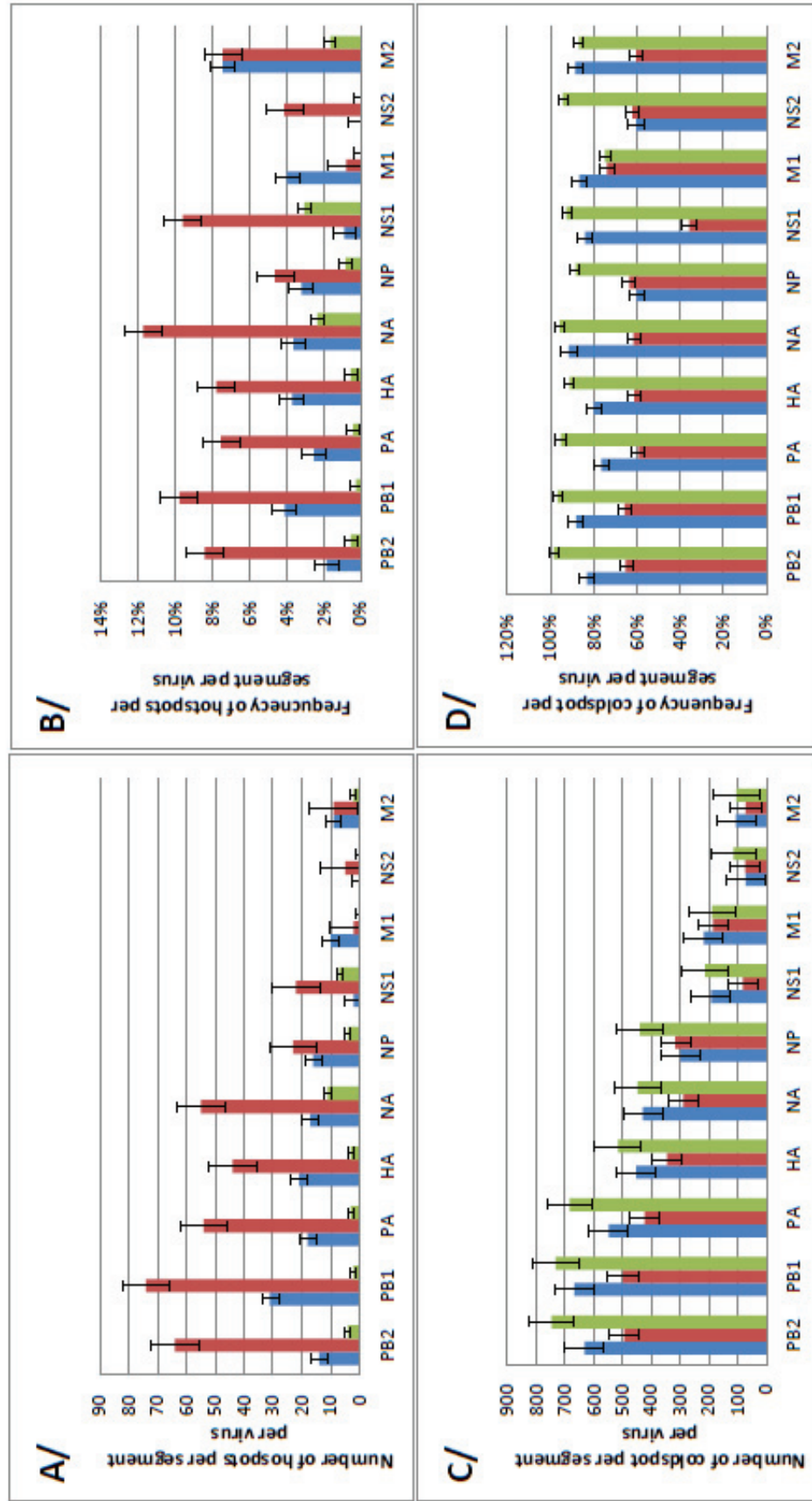
254

255 *Figure 2. Number (A) and frequency (B) of mSNV per segment per viral type/subtype. Blue:*
 256 *H1N1 viruses; red: H3N2 viruses; green: IBV; standard deviation is presented (error bars).*



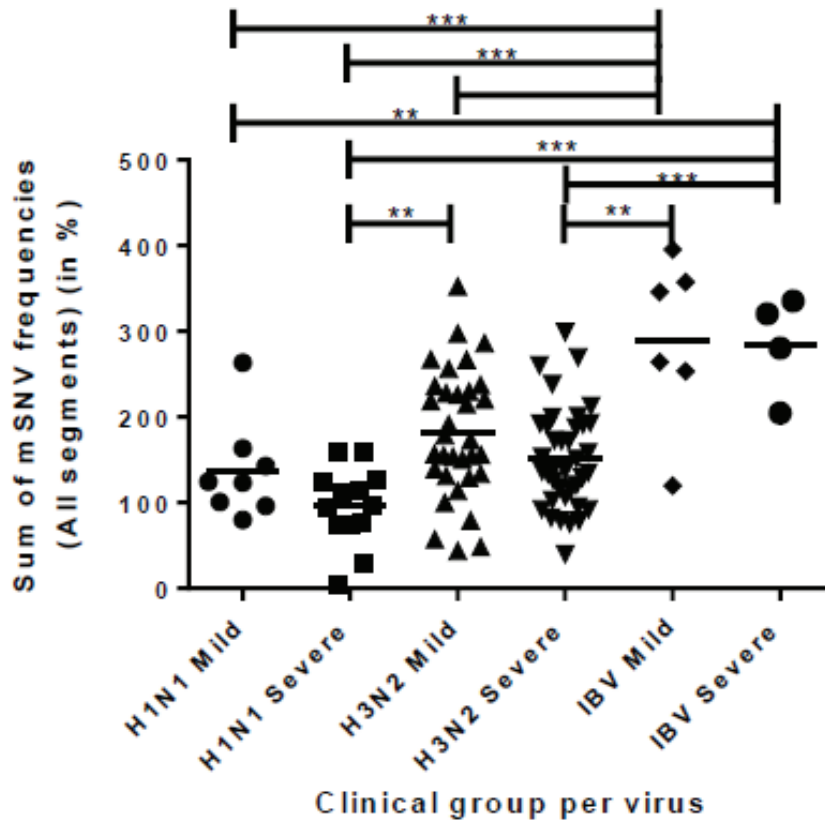
257

258 *Figure 3. Number and frequency of hotspots (A and B) and coldspots (C and D) per segment per viral type/subtype. Standard error was*
 259 *represented on each histogram. From left to right per segment were represented H1N1 viruses, H3N2 viruses and IBV.*



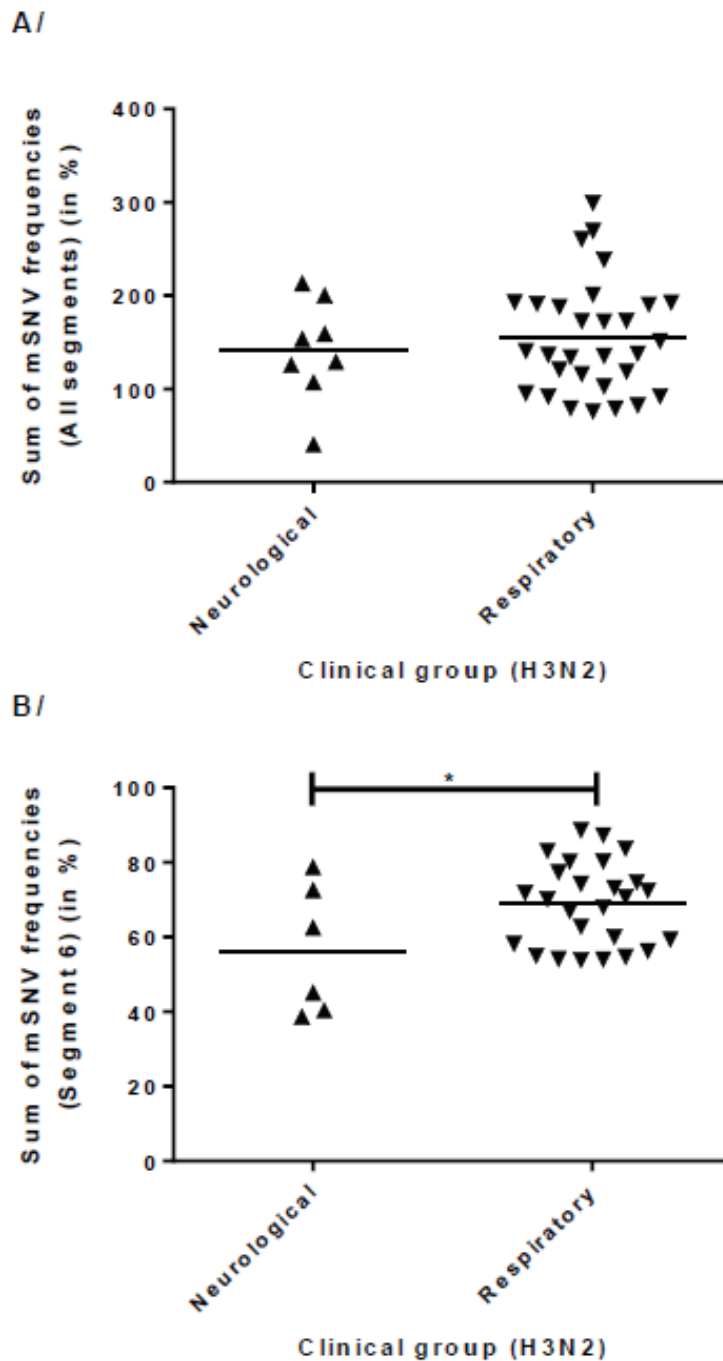
260

261 *Figure 4. Viral genomic diversity in mild and severe influenza clinical groups (mSNV*
 262 *frequency threshold 5%).** and *** correspond to significant differences ($p < 0.01$ and*
 263 *$p < 0.001$ respectively).*



264

265 *Figure 5. Viral genomic diversity in neurological and respiratory clinical groups (mSNV*
 266 *frequency threshold 5%). A/ mSNV frequencies on the whole genome scale; B/ mSNV*
 267 *frequencies on the Segment 6. * correspond to a statistically significant difference ($p < 0.05$).*



268

16

144

269 Tables

270 Table 1. Baseline demographic and clinical characteristics, clinical course and therapeutic
 271 management.

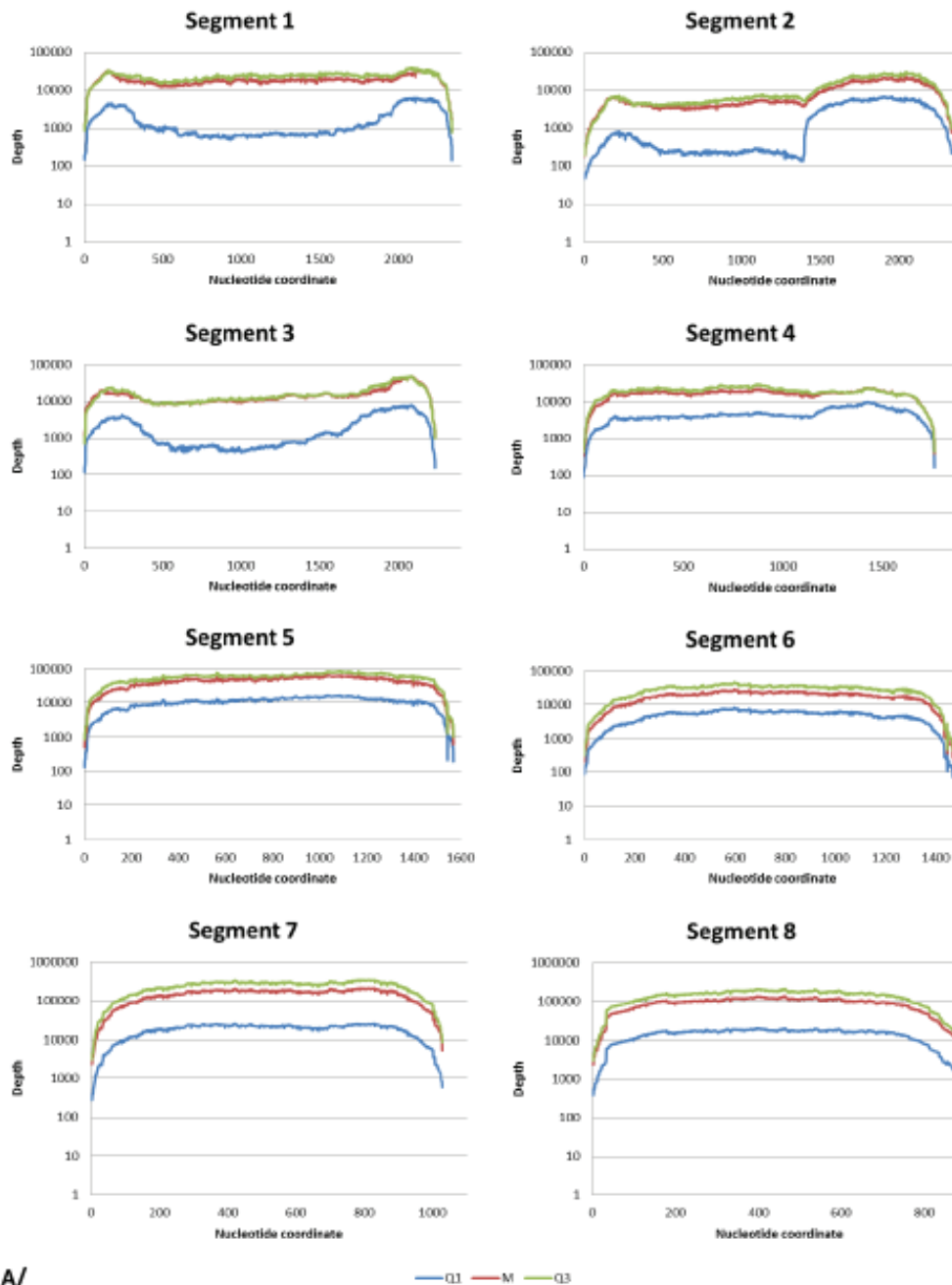
Baseline demographic and Clinical characteristics		Severe influenza		
		Mild influenza (n=58 ; 46.4%)	Neurological (n=12 ; 9.6%)	Respiratory (n=55 ; 44%)
Baseline demographics	Sex: Male (% of the group)	37 (63.8%)	29 (52.7%)	7 (58.3%)
	Median Age in years [IQR]	11 [<1-77]	59.6 [6.3-77]	74 [60.8-83.5]
Characteristics at the time of admission (% of the group)	<u>Sample type:</u>			
	NPA	7 (12.1%)	3 (25%)	4 (7.2%)
	NS	51 (87.9%)	7 (58.3%)	41 (74.5%)
	BAL	0	2 (16.7%)	8 (14.5%)
	TBA	0	0	2 (3.6%)
	<u>Viral type (% of the clinical group):</u>			
	Influenza A virus (H1N1)	10 (17.2%)	3 (25%)	18 (32.7%)
	Influenza A virus (H3N2)	42 (72.4%)	7 (58.3%)	33 (56.4%)
	Influenza B virus	6 (10.3%)	2 (16.7%)	4 (7.3%)
	<u>Clinical presentation:</u>			
respiratory symptoms*	47 (81.0%)	5 (41.7%)	49 (89.1%)	

	non-respiratory symptoms**	57 (98.3%)	12 (100%)	27 (49.1%)
	Median interval between sampling and symptom onset (days) [IQR]	1 [0-2]	1 [1-1]	2 [1-2]
	Co morbidities	0	0	1 [#]
	Hospitalized in ICU (y/n)	0	6 (50%)	33 (60%)
	Median hospital length of stay, days [IQR]			
Outcome (% of the group)	Hospital	4 [212]	4 [3.5-21]	18 [6 -33]
	ICU	-	1 [0 -19.3]	2 [0-11]
	Complication of the influenza pneumonia			
	Viral superinfection [‡]	2 (3.4%)	0	3 (5.5%)
	Bacterial superinfection ^{‡‡}	2 (3.4%)	3 (25%)	13 (23.6%)
	Death	0	3 (25%)	5 (9.1%)
Treatment (% of the group)	Antiviral	16 (27.6%)	7 (58.3%)	30 (54.5%)
	Antibiotherapy	28 (48.3%)	6 (50%)	46 (83.6%)

* respiratory symptoms: mild dyspnea, cough, rhinorrhea, pneumonia, bronchitis; ** non-respiratory symptoms: faint, asthenia, adenopathy, algia, odynophagia, diarrhea, anorexia, vomiting, cutaneous eruption, seizure; # Co morbidities: untreated schizophrenia (this morbidity never was previously associated with changes in viral diversity); [‡] Viral co-infection were coronaviruses and respiratory syncytial virus (mild group); and adenoviruses or cytomegaloviruses (respiratory group); ^{‡‡} Bacterial co-infection was *Staphylococcus aureus* (both group); *Enterococcus*, *Pseudomonas aeruginosa* (neurological and respiratory group); *Streptococcus pneumoniae* and *Stenotrophomonas maltophilia* (respiratory group).

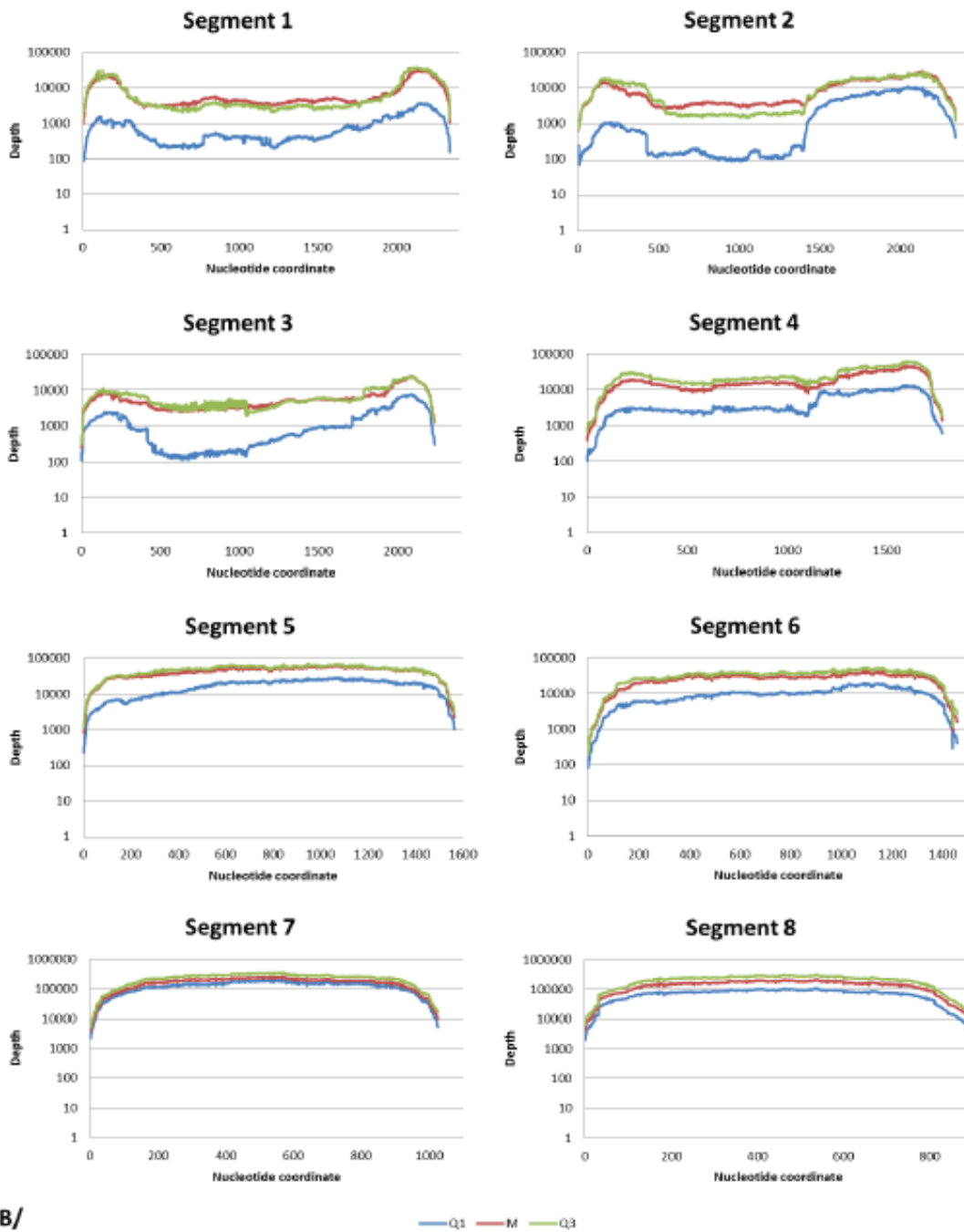
272 **Supplementary material legends**

273 *Supplementary figure S1. Coverage plot A/ for H3N2 samples. B/ for H1N1 samples. C/ for*
 274 *IBV samples. On this figure, coverage plots represent depth of coverage per nucleotide coordinate*
 275 *(after exclusion of un-sequenced coordinates (<20X) for H3N2 samples).*



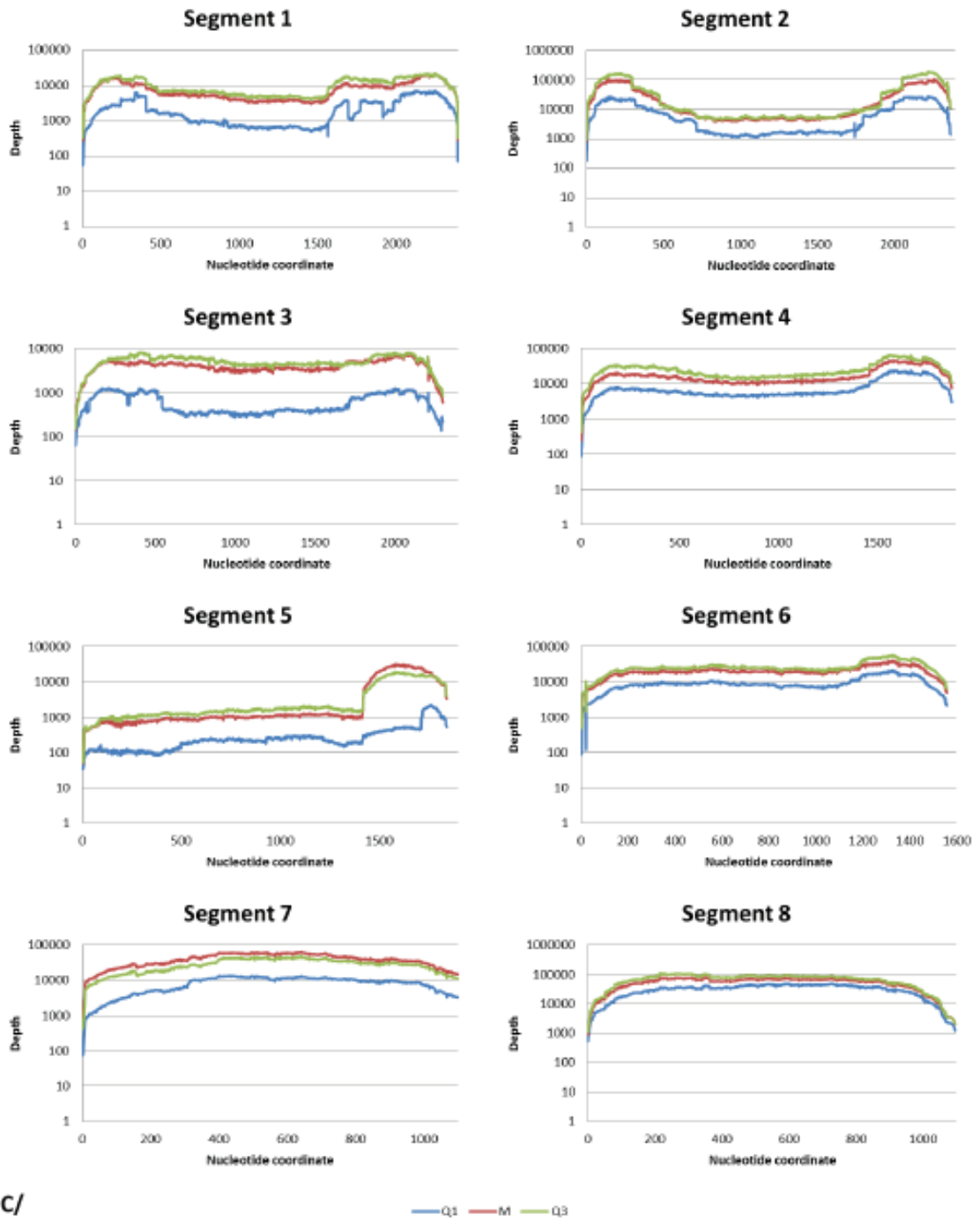
276

A/



277

B/

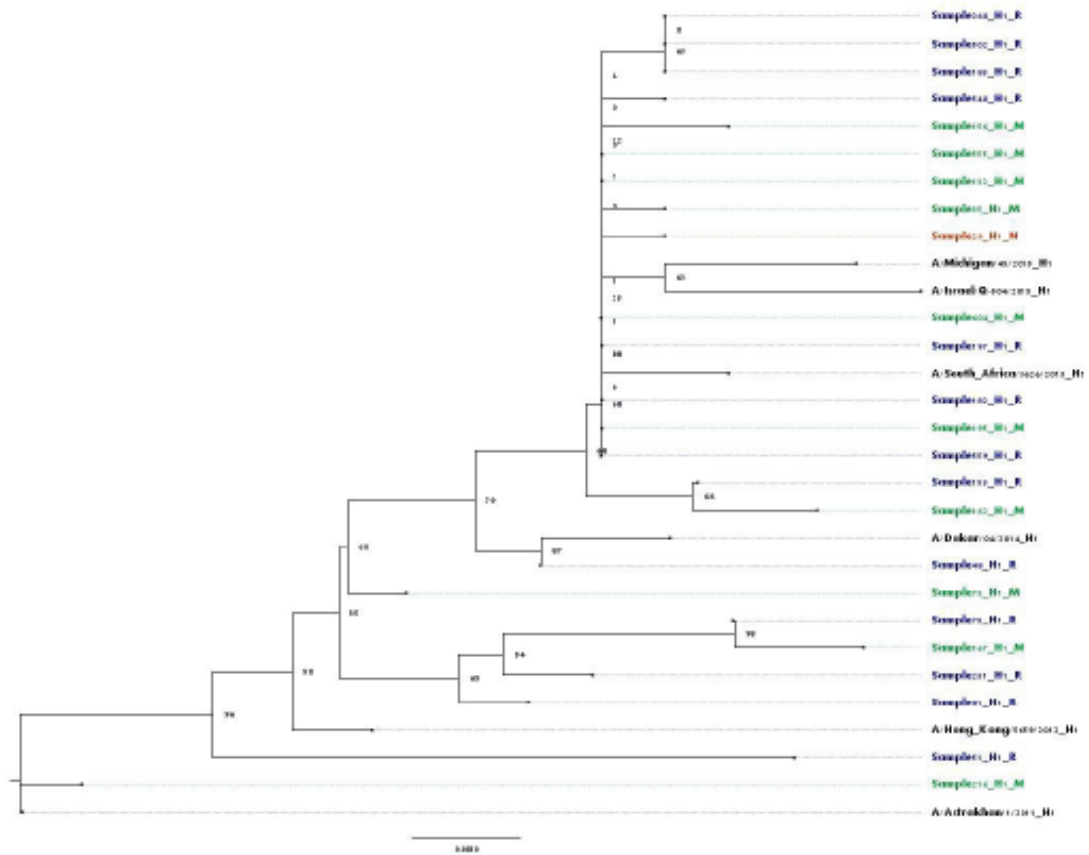


278

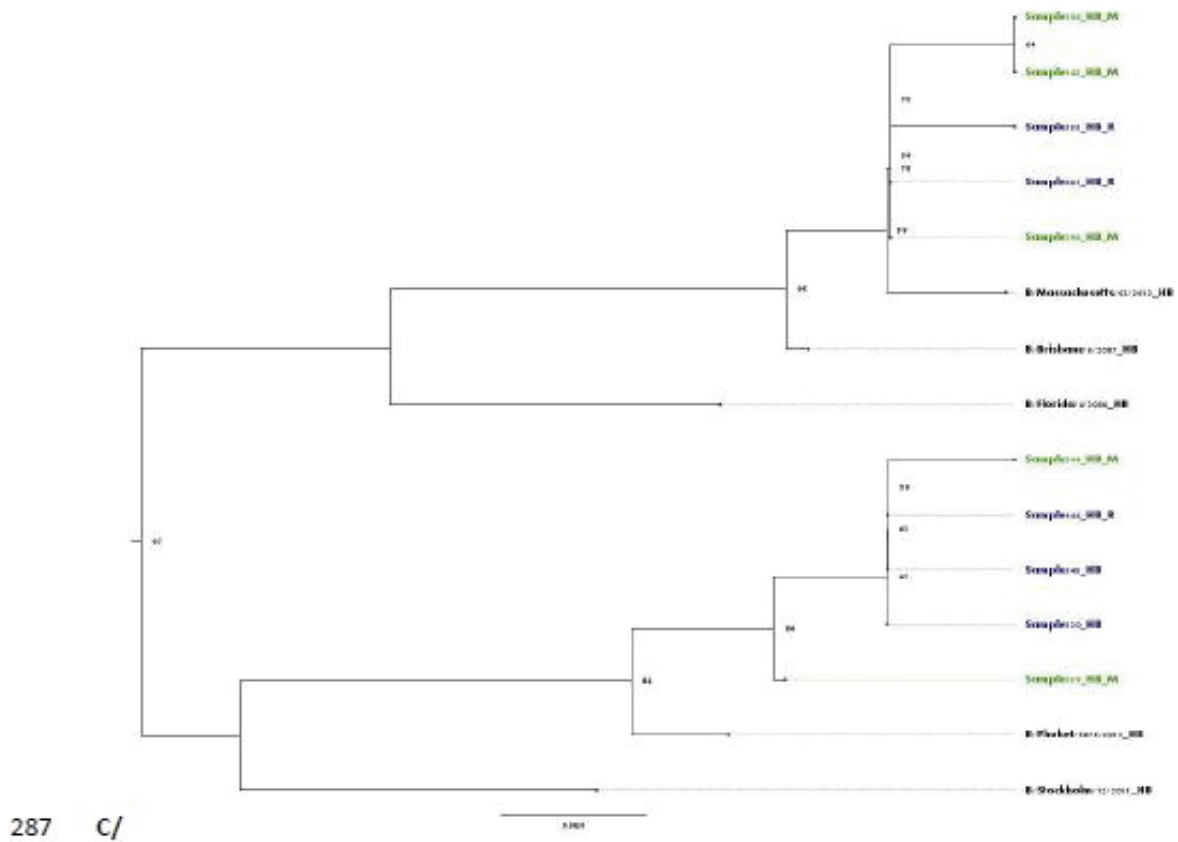
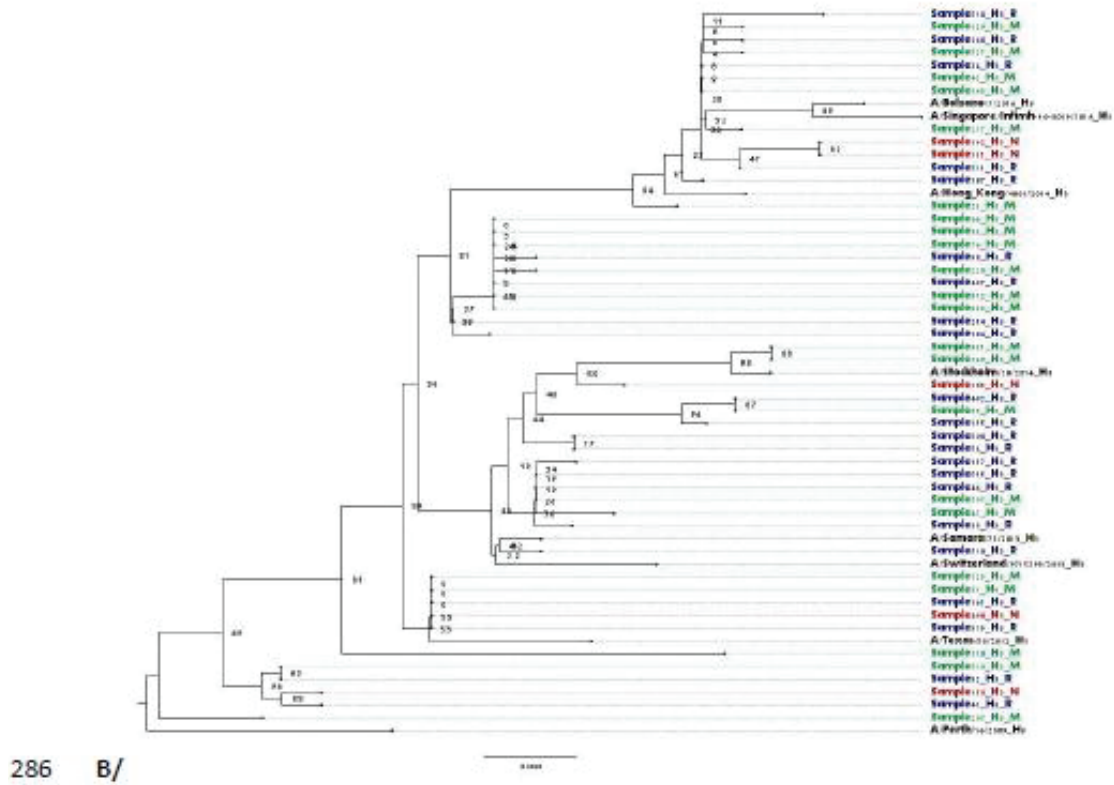
C/

279 *Supplementary figure S2. Phylogenetic analyses of sequenced samples (adult IAV samples*
 280 *H1N1 (A) or H3N2 (B); IBV samples (C) and pediatric samples (D)) based on HA consensus*
 281 *sequence. Clinical group of each sample were indicated at the end of the sequence name (M:*
 282 *Mild in green; R: Respiratory in blue and N: Neurological in orange). Pediatric sample were*
 283 *represented to assess the correct representation of each epidemics.*

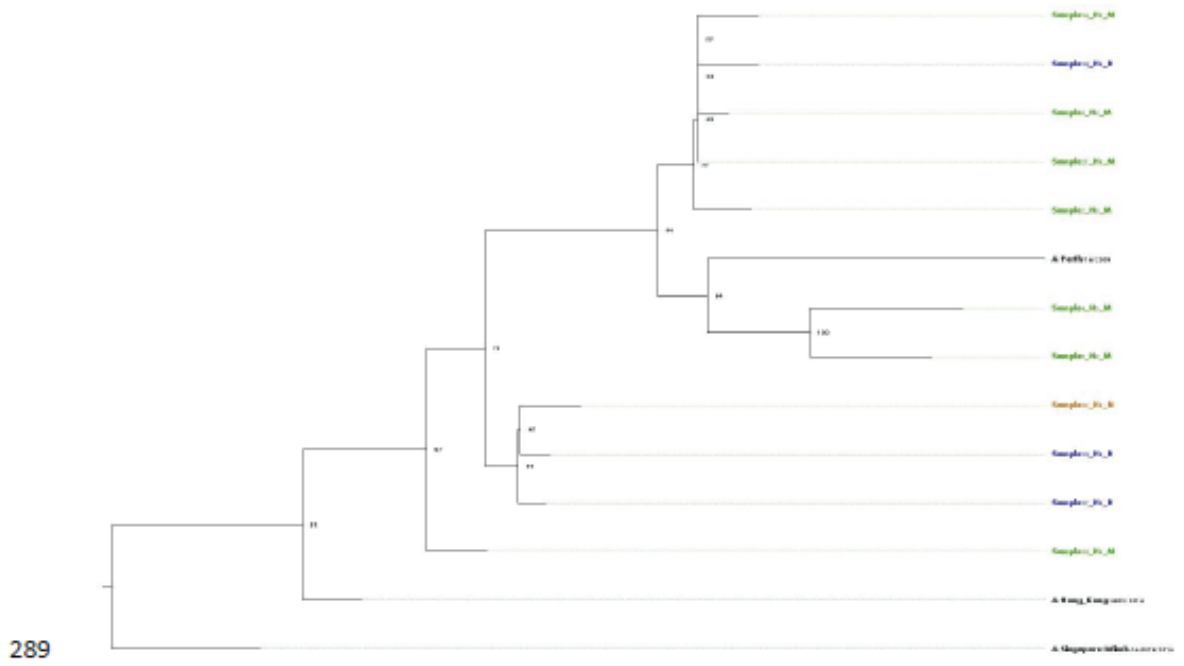
284 A/



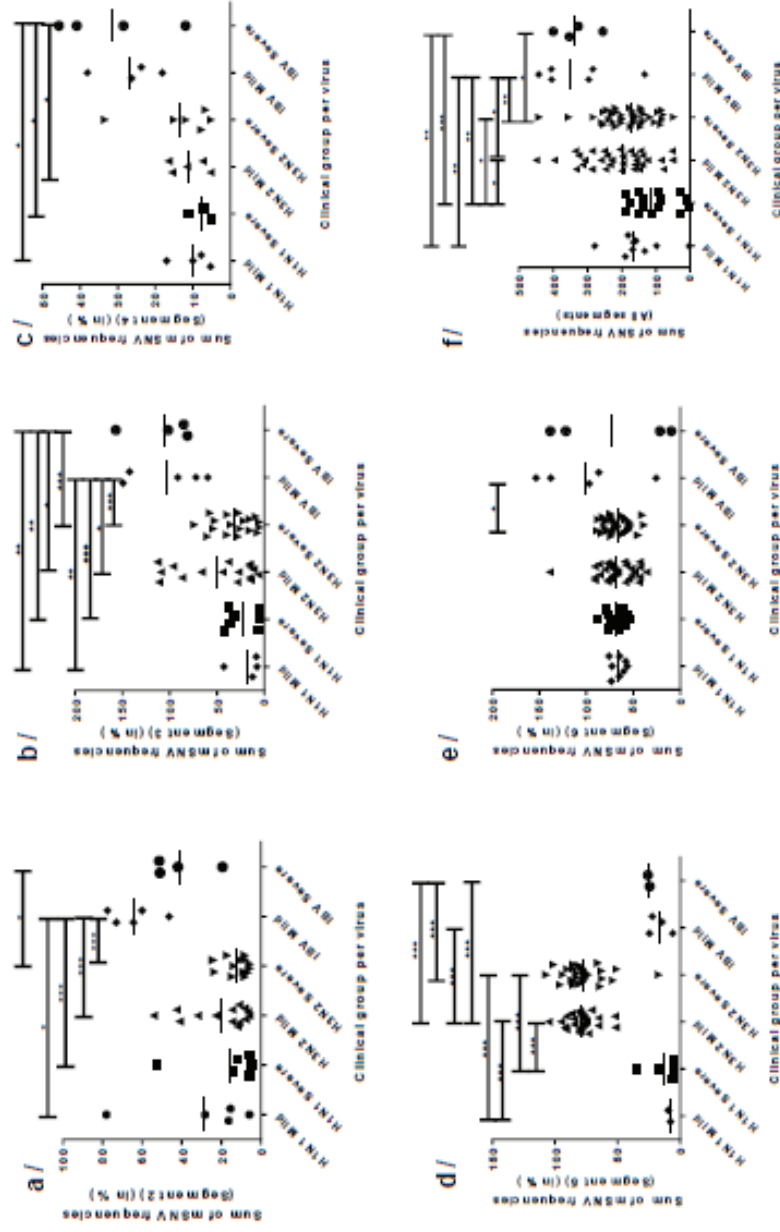
285



288 D/

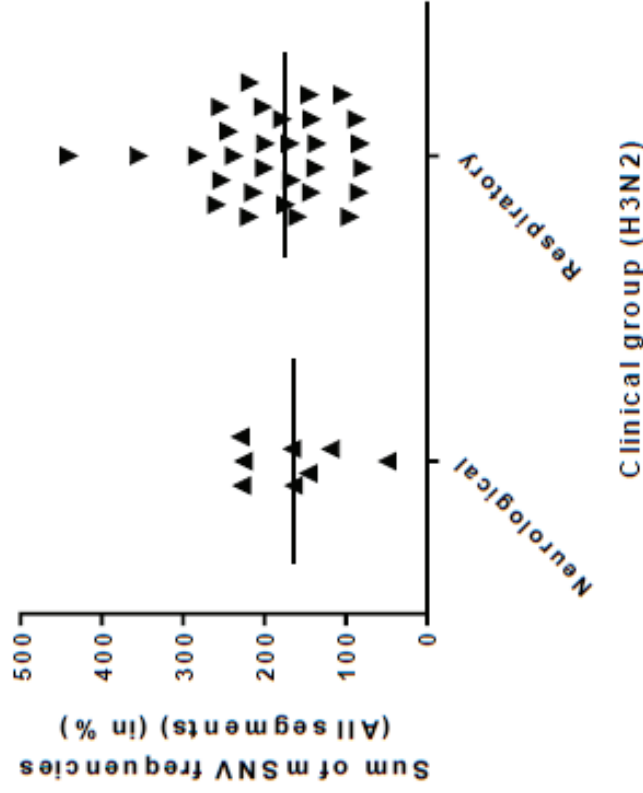
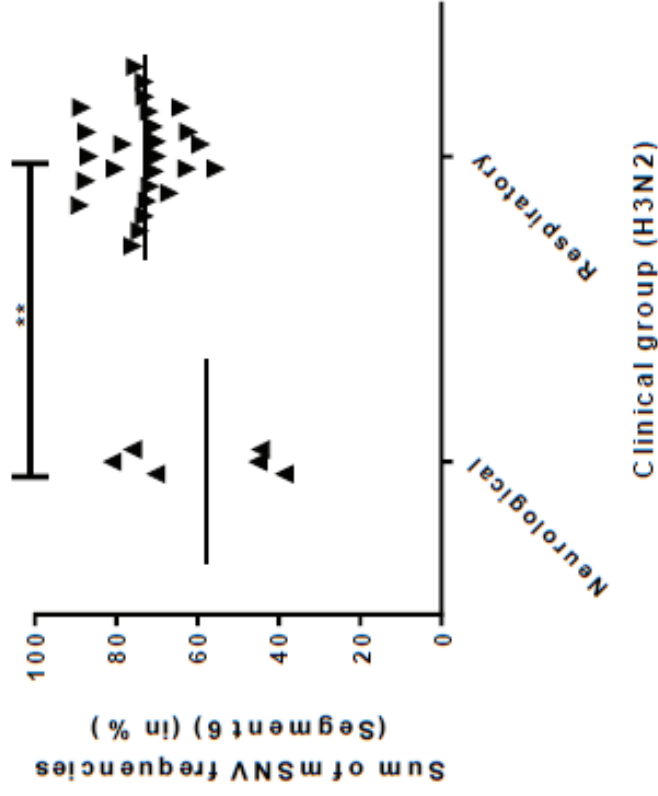


290 Supplementary figure S3. *Viral genomic diversity in mild and severe influenza clinical groups per segment. A/ Segment 2 (SNV frequency threshold*
 291 *5%), B/ Segment 3 (SNV frequency threshold 5%), C/ Segment 4 (SNV frequency threshold 5%), D/ Segment 5 (SNV frequency threshold 5%), E/*
 292 *Segment 6 (SNV frequency threshold 5%), E/ Global analyses (SNV frequency threshold 1%),*



293

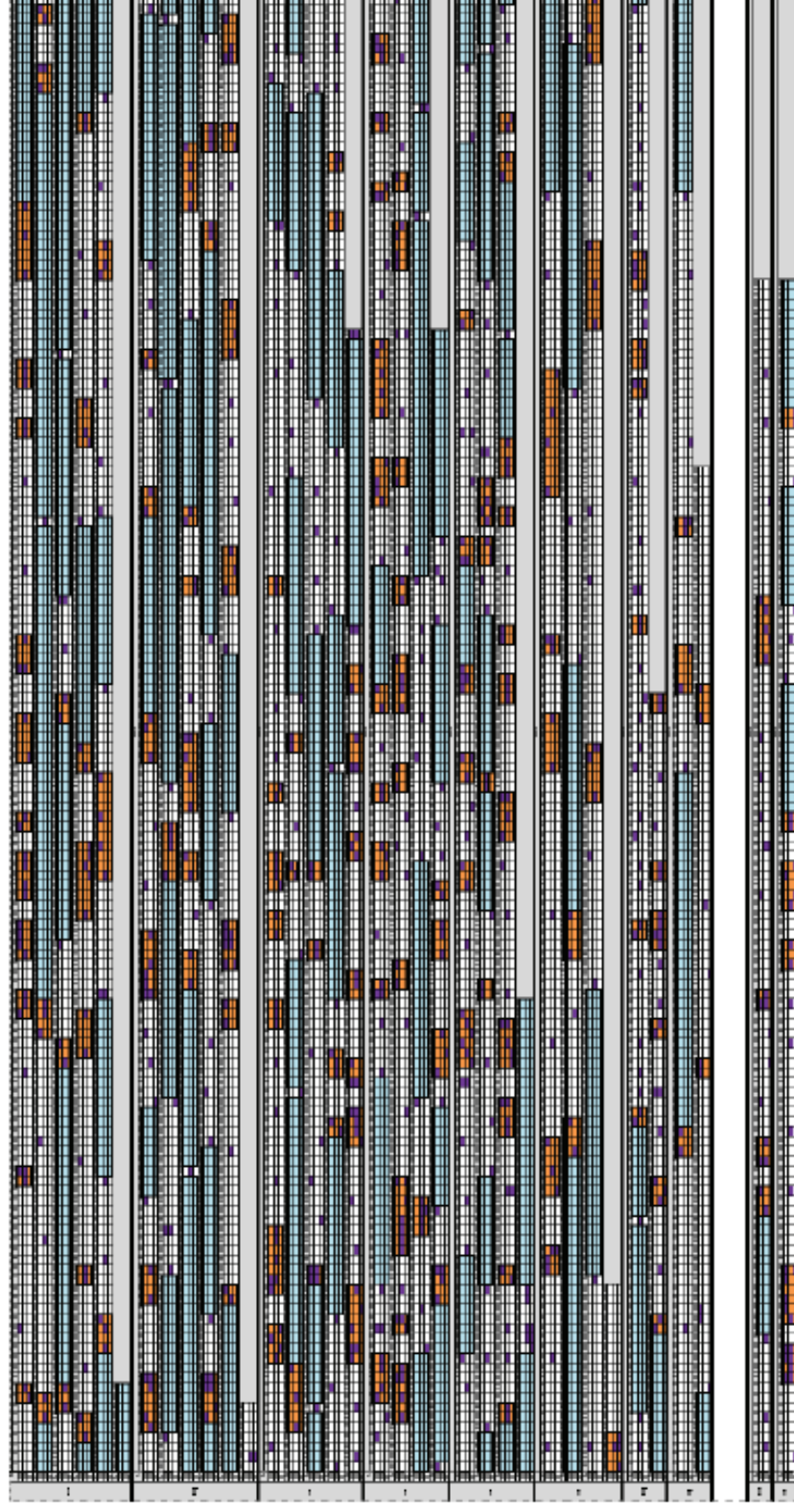
294 Supplementary figure S4. *Viral genomic diversity in severe influenza clinical groups using a less severe frequency threshold (1%-filter)*



295

296

- 297 Supplementary figure S5. *Hotspot and cold spot on influenza genome*. Purple coordinates represent residues coordinates presenting at least one
298 minor variant in the considered clinical group. Coldspots and hotspots regions were represented in light blue and orange respectively. For each
299 segment, coordinates ranged from 1 to 150; 151 to 300; 301 to 450; 451 to 600; 601 to 750 and 751 to the last coordinate. Below amino-acid
300 coordinate, H1N1, H3N2 and IBV viruses were represented.



301

3. Article soumis

Simon B., PICHON M., Valette M., Burfin G, Lina B., Josset L. Whole genome sequencing of circulating H3N2 influenza viruses reveals variants associated with severity and ineffective vaccination (Soumis à JID)



1 Article

2 Whole Genome Sequencing of A(H3N2) Influenza 3 Viruses Reveals Variants Associated with Severity 4 during the 2016-2017 Season

5 Bruno Simon ¹, Maxime Pichon ^{1,2,3}, Martine Valette ^{1,2,3}, Gwendolynne Burfin ³, Mathilde Richard ⁴,
6 Bruno Lina ^{1,2,3} and Laurence Josset ^{1,2,3*}

7 ¹ Virpath, CIRI, Univ Lyon, Inserm U1111 CNRS UMR5308, ENS, UCBL, Faculté de Médecine Lyon Est,
8 Lyon, France ; contact@virpath.com

9 ² Laboratoire de Virologie, IAI, CBN, Groupement Hospitalier Nord, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France ;
10 bruno.lina@chu-lyon.fr

11 ³ Centre National des Virus Respiratoires, IAI, CBN, Groupement Hospitalier Nord, Hospices Civils de Lyon,
12 Lyon, France ; ghe.grippe-france-sud@chu-lyon.fr

13 ⁴ Department of Viroscience, Erasmus MC, Rotterdam, The Netherlands

14 * Correspondence: laurence.josset@chu-lyon.fr; Tel.: +33-(0)4-72-07-10-22

15 Received: date; Accepted: date; Published: date

16 **Abstract:** Background—Influenza viruses cause a remarkable disease burden and significant
17 morbidity and mortality worldwide, and this varies between seasons. To understand the
18 mechanisms associated with these differences, a comprehensive approach is needed to characterize
19 the impact of influenza genomic traits on the burden of disease. **Methods**—During 2016-2017, a year
20 with severe A(H3N2), we sequenced 176 A(H3N2) influenza genomes using NGS for routine
21 surveillance of circulating influenza viruses collected via the French national influenza
22 community-based surveillance network or from patients hospitalized in intensive care units of the
23 University Hospitals of Lyon, France. Taking into account confounding factors, sequencing and
24 clinical data were used to identify genomic variants and quasi-species associated with influenza
25 severity or vaccine failure. **Results**—Several amino-acid substitutions significantly associated with
26 clinical traits were found, including NA V263I and NS1 K196E which were associated with severity
27 and co-occurred only in viruses from the 3c.2a1 clade. Additionally, we observed that intra-host
28 diversity as a whole and on a specific set of gene segments increased with severity.
29 **Conclusions**—These results support the use of whole-genome sequencing as a tool for the
30 identification of genetic traits associated to severe influenza in the context of influenza surveillance.

31 **Keywords:** influenza; NGS; severity; vaccination; epidemiology; quasispecies

32

33 1. Introduction

34 Seasonal influenza infections remain a considerable health and socioeconomic challenge, as
35 vaccines uptake and effectiveness are still limited. The resulting morbidity and mortality have only
36 marginally decreased in recent years, with annual epidemics still causing around 290,000 to 650,000
37 respiratory deaths worldwide [1]. This continuing burden leads to constantly adapt public health
38 measures including vaccination policies, which remain the most potentially effective method to limit
39 the impact of influenza [2]. However, current vaccines have moderate effectiveness, in part because
40 of major and minor mismatches between vaccine and circulating influenza viruses, and weak
41 immune responses elicited in the elderly. Severe influenza occurs most frequently in certain
42 demographic groups, including the very young and the very old, but also those suffering from
43 chronic respiratory, cardiac and metabolic diseases, as well as pregnant women and obese patients,
44 as shown for A(H1N1) pdm09 virus [3,4]. Antivirals that permit to control the infection in some

45 patients at risk of complications are available and usually recommended, yet resistant strains often
46 appear in cases of prolonged treatments. In this context, influenza surveillance is mostly focused on
47 studying antigenic variants to select vaccine strains [5] or resistance mutations to monitor antiviral
48 effectiveness [6,7]. Many mutations in the influenza genome have been linked to virulence but
49 clinical studies are scarce and have had, apparently, a minimal impact on clinical management,
50 unlike what is routinely done in case of bacterial infections [8]. This may be in relation to influenza
51 pathogenesis that is dependent on complex and still unpredictable mechanisms including
52 multigenic equilibrium and interactions within the viral population and with the host immunity, in
53 the context of a fast-evolving virus with a high error-prone replication. Moreover, influenza
54 substitutions can only be considered within a specific viral background, as it was shown that their
55 impact differed even among strains of the same subtype [6]. Therefore, global approaches
56 considering virological and immunological parameters associated with clinical severity, as a whole,
57 are better suited to investigate influenza pathogenesis [9,10].

58 Recently, the improved accessibility to next generation sequencing technologies has allowed
59 their use in contexts closer to routine clinical practice such as in University hospital centers and
60 national surveillance networks. This has led to now consider each infection as being caused by a
61 swarm of nearly identical viruses (or quasispecies) rather than by an individual strain. For influenza,
62 quasispecies were found to have an important role in the pathophysiology of infections and to be
63 involved in virulence, intra-host and inter-host spread [11–15]. Several beneficial characteristics of
64 quasispecies at the host scale have been reported [11]. For example, it was shown that minor
65 resistance variants pre-exist any treatment despite lower fitness and that, at least *in vitro*, a
66 cooperation between variants for an improved global fitness exists [16,17]. A(H3N2) viruses are
67 considered to evolve faster than other subtypes [18,19]; in recent years these have been found to
68 have high clades diversity and increased morbidity and mortality [20,21]. During the 2016-2017
69 influenza epidemic, the majority of influenza viruses circulating in the northern hemisphere was
70 A(H3N2) virus from clade 3c.2a. In France, the dominance of A(H3N2) viruses was associated with
71 an early season of moderate intensity, but with a high severity particularly among the elderly in a
72 context of low vaccine coverage and sub-optimal vaccine effectiveness [22]. Low vaccine
73 effectiveness was related to a hemagglutinin mutation in the 2016–2017 egg-adapted H3N2 (clade
74 3c.2a) vaccine strain A/HongKong/4801/2014 that altered its antigenicity [23]. As a consequence,
75 there is a growing interest in performing in-depth genomic analysis of these H3N2 viruses,
76 including at the quasispecies level.

77 We describe herein the genomic characteristics of Influenza A (H3N2) clinical strains recovered
78 via the French national influenza surveillance network or from patients hospitalized in intensive
79 care units of the University Hospitals of Lyon, France. Several substitutions were significantly
80 associated with severe cases and/or ineffective vaccination, and only in specific backgrounds for
81 some of them. Individually, minor variants did not appear to be associated to any clinical traits,
82 whereas the intra-host diversity as a whole and on a specific limited set of gene segments increased
83 with severity.

84 2. Materials and Methods

85 2.1. Ethics Statement

86 This is a retrospective study, requiring no additional samples from patients as they were
87 performed during routine diagnosis. This study is considered as non-interventional, as clinical and
88 therapeutic data collection was performed retrospectively from a clinical files database respecting
89 patient confidentiality. This study was approved by the ethics committee of the Lyon University
90 Hospitals (Hospices Civils de Lyon, France), on May 3, 2017.

91 2.2. Clinical Samples

92 Samples included in this study were recovered between May 2016 and April 2017 via the
93 French national influenza surveillance network or from patients hospitalized in Lyon University

94 Hospitals. This cohort was designed to investigate molecular evolution of influenza virus and
 95 studied herein in a secondary analysis. The French national influenza surveillance network recruits
 96 patients with influenza-like illness in ambulatory care and in University hospitals. Only data from
 97 the southern half of France were included. In the Lyon University hospitals systematic surveillance
 98 was set up for influenza cases hospitalized in intensive care units, and for influenza in vaccinated
 99 patients. When several samples were retrieved and/or sequenced for a patient, only the earliest
 100 sampled after the onset of symptoms was included. For the present study, only treatment-naïve
 101 patients infected by A(H3N2) strains for which we obtained at least partial sequences for each
 102 genomic segment were included. Clinical data were retrieved from questionnaires filled out by the
 103 healthcare professionals who took the sample and from computerized clinical files, for the
 104 surveillance network and Lyon University Hospitals respectively. All patients had sufficient clinical
 105 data reported to classify them as having either mild or severe influenza. Clinical criteria leading to
 106 classify patients as severe included admission to intensive care for respiratory complications, need
 107 for continuous supplemental oxygen or hypoxemia, neurological signs (seizures, fainting with loss
 108 of consciousness, evocative imagery or lumbar puncture) or any type of shock. Severe cases
 109 without any major respiratory sign were subclassified depending on their main symptomatology
 110 (Table 1).

111 **Table 1.** Included patients baseline demographics, clinical and sequenced samples characteristics.

Patient Characteristics		Mild Outcome	Severe Outcome	
Baseline	Number of patients (% of total)	97 (55%)	79 (45%)	
Demographics	Age in median years (range)	34 (0–91)	73 (1–97)	
	Sex	Male	48	36
		Female	48	43
	Origin	Lyon University Hospitals	6	65
Surveillance network		91	14	
Sample Characteristics	Sample type	NPA	2	6
		NS	95	49
		TBA	0	13
		BAL	0	11
	Median time since onset of symptoms, days (range)	1 (0-5)	3 (0-8)	
	Viral load – median cycle threshold (range)	19.7 (14.9-30)	23.3 (17-35.3)	
Clinical Characteristics	Vaccinated against Influenza for the current season	21	7	
	Main severity component	Severe outcome risk factor*	17	65
		Respiratory	-	70
		Neurological	-	5
	Multiple organ failure	-	4	

*Risk factors included age > 65 years, immunodeficiency, ongoing cancer, chronic pulmonary, cardio-vascular or neuro-muscular disease, BMI > 35, diabetes and ongoing pregnancy.
 NPA: Nasopharyngeal Aspirate; NS: Nasal Swab; TBA: Tracheobronchial Aspirate; BAL: Bronchoalveolar Lavage.

112 2.3. RNA Extraction, Viral Load Determination, and Full-Genome Amplification

113 The following protocol was followed for all included samples, irrespective of source,
114 sequencing date, or patient origin (Lyon University Hospital, or French national influenza
115 surveillance network). RNA was extracted from clinical respiratory samples conserved at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
116 using Nuclisens EasyMag automated extraction platform (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). In
117 order to lower human and bacterial DNA content of the extract, nucleic acids were then incubated
118 with $1\text{ }\mu\text{L}$ of Turbo DNase, $2\text{ }\mu\text{L}$ of Turbo DNase buffer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)
119 and RNase $0.5\text{ }\mu\text{L}$ of RNasin plus RNase Inhibitor (Promega Corporation, Madison, WI, USA) for 90
120 min at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ before stopping enzymatic reaction through immediate purification by magnetic beads
121 (0.5X; NucleoMag[®] NGS Clean-up and Size Select, Macherey-Nagel, Düren, Germany). Each
122 segment was retro-transcribed and amplified using a published multi-segment reverse transcription
123 protocol, optimized by adding $0.5\mu\text{L}$ of RNasin plus RNase Inhibitor [24].

124 2.4. Illumina Sequencing

125 The DNA library was prepared using the commercial Nextera[™] XT DNA library kit (Illumina,
126 San Diego, CA, USA) consisting of an enzymatic tagmentation, barcoding by PCR (12 cycles), and
127 size-selection using magnetic beads. Then, the sequencing run was performed on a NextSeq500
128 using a mid-output cartridge resulting in 2×150 nucleotides paired-end reads. Fluorescent images
129 were analyzed using the Illumina RTA1.8/SCS2.8 base-calling pipeline to obtain demultiplexed
130 FASTQ-formatted sequence data.

131 2.5. Bioinformatic Analysis

132 As described previously, the sequencing files were cleaned from human reads using bmtagger
133 (v1.1.0) with human genome database hg19 [25,26]. Adapters and low quality end of reads (Phred
134 score <20) were removed by cutadapt (v0.4.4), also removing reads smaller than 50 bases and the
135 paired reads they were associated with [27]. BWA-MEM alignment tool (v0.7.15) was used to verify
136 sequenced strain subtypes by hemagglutinin (HA) homology, and then to map the reads on the
137 circulating A(H3N2) strains' common ancestor A/Perth/16/2009 [28]. This step generated consensus
138 sequences that were used as the patients' own mapping reference in further steps. All reads
139 mapping by BWA-MEM were performed using default settings except for gap opening and
140 extension penalties set to 10 and 2, respectively, to increase indel stringency. Sorted mapped reads
141 were manually inspected using FastQC (v0.11.5) to verify read quality. Variant calling files were
142 generated with naive variant caller (Biomina Galaxy platform) reporting all necessary base metrics
143 for each position on the A(H3N2) genome ignoring low-quality bases [29]. A homemade vcf analysis
144 python script applied filters to validate possible SNPs and generate end-user workable files. These
145 filters comprised a quantitative strand bias (SB) score estimating an uncertainty for variant
146 frequencies when compared to the consensus bases disequilibrium and a depth-adapted threshold.
147 This depth-adapted threshold was calculated following a t-test distribution derived from the
148 commonly approved 100X threshold necessary to exclude heterozygote mutations, and was verified
149 empirically [25]. We determined minimal depth thresholds for variant calling as 2000 and 10000
150 reads for variants above 5% and 1% frequencies, respectively, and a relative strand disequilibrium
151 lower than the variant estimated frequency.

152 2.6. Statistical Analysis

153 Statistical differences between experimental groups were analyzed using chi-square tests for
154 amino-acid substitutions. The diversity analyses were performed using Wilcoxon rank sum test
155 comparing the count of minor variants on nucleotide level for each segment. In each case, p-values $<$
156 0.05 were considered significant. Phylogenetic trees were generated using Mega7 Neighbor-Joining
157 method, as performed by the European center for disease prevention and control, Poisson correction
158 method and considering deletions pairwise [30]. Reassortment events were identified using

159 Graph-incompatibility-based Reassortment Finder (GiRaF) (v1.02) considering an event as validated
 160 if three pairwise segment comparisons supported the hypothesis with a confidence >0.95 [31].

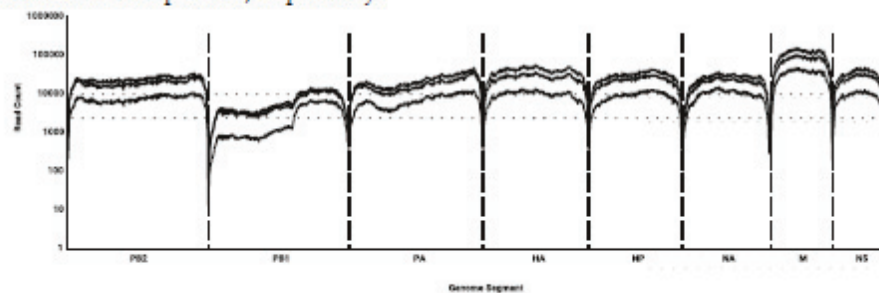
161 2.7. Accession Numbers

162 The Sequence Read Archive (SRA) accession number for the raw sequences is SRPXXXXX and
 163 all genomic sequences used in this study are available on GISAID databank.

164 3. Results

165 3.1. Sequencing Efficacy

166 Among the 176 samples, 155 whole A(H3N2) consensus genomes were successfully sequenced
 167 when considering only those with more than 95% coverage. Overall, sequencing efficacy varied in
 168 function of segment size; shorter segments were sequenced to a greater depth. However, sequencing
 169 depth was constantly low on two thirds of segment 2 (coding for PB1) and, for some patients, lower
 170 on the central part of viral polymerase coding segments (segments 1-3; Figure 1). After excluding
 171 segment 2, a mean depth on all segments above 10000× was obtained for 78 A(H3N2) genomes, and
 172 a mean depth of 2000× for 142 A(H3N2) genomes. These depths of coverage allow calling variants
 173 above 1% and 5% frequencies, respectively.

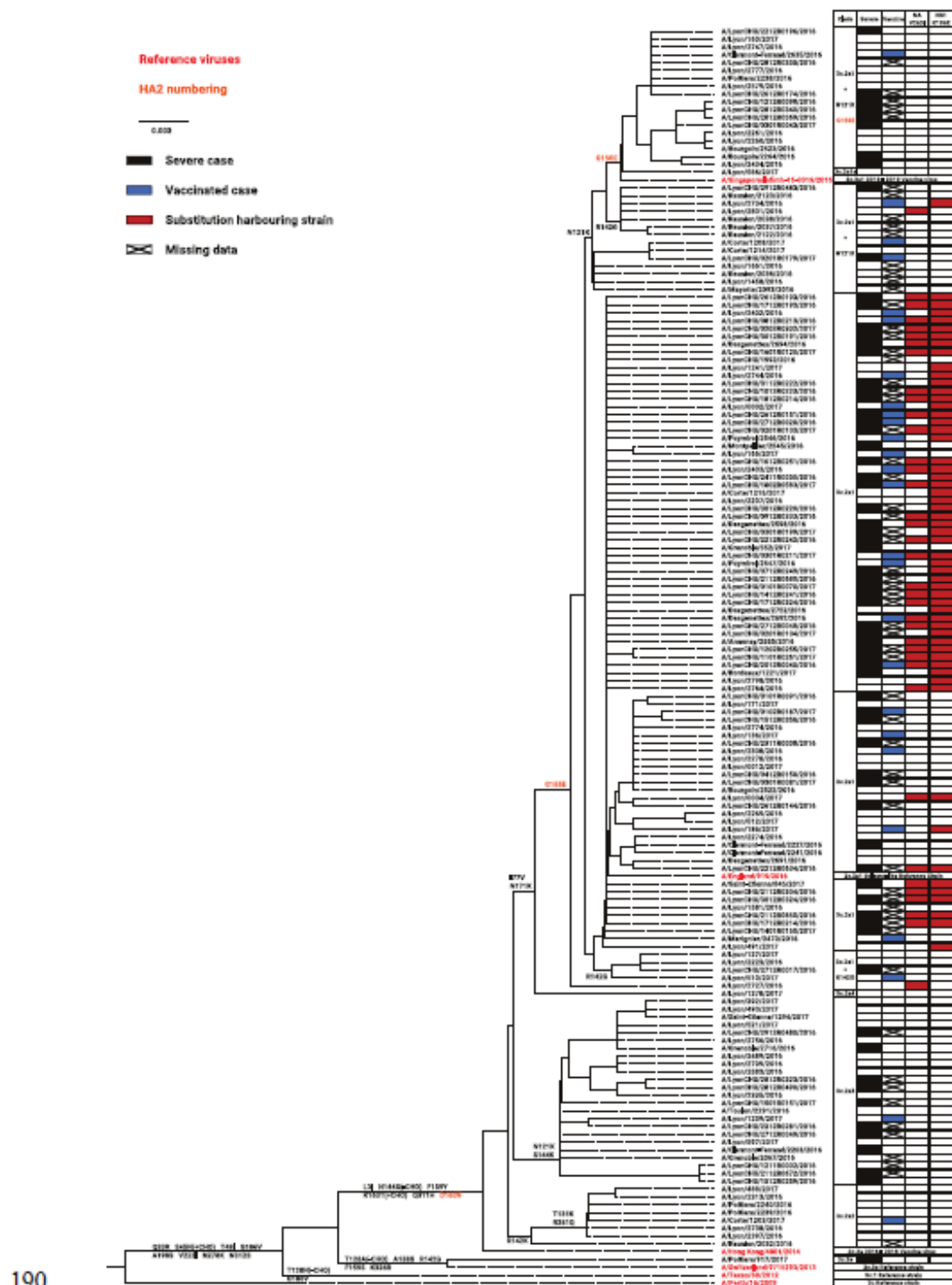


174

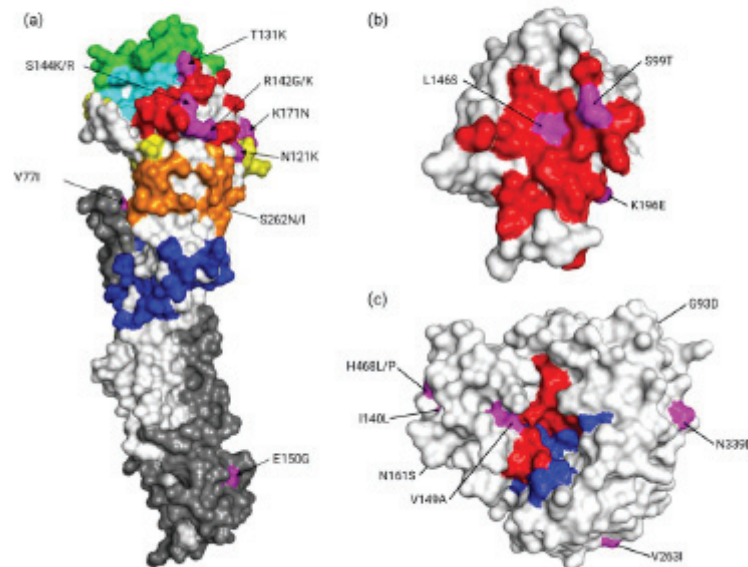
175 **Figure 1.** Segment coverage of A(H3N2) influenza virus genomes. Mean depth line for each segment
 176 is framed by thinner lines corresponding to first and third quartiles of depth of coverage. Minimal
 177 depth threshold for 5% (2000X) and 1% (10000X) variant calling are represented by dot lines.

178 3.2. Distribution of Consensus Variants According to Clades, Severity or Vaccination

179 Substitution associations with severity or vaccine failure were sought. All 155 A(H3N2) whole
 180 genome sufficiently covered for the generation of consensus sequences were used in phylogenetic
 181 and consensus variant analysis. Among them, 121 viruses belonged to genetic clade 3c.2a1, 8
 182 belonged to 3c.2a2, 24 belonged 3c.2a3, 1 belonged to 3c.2a4, and 1 belonged to genetic clade 3c.3a
 183 (the only virus not part of the 3c.2a clade; Figure 2). Within clade 3c.2a1, different subgroups could
 184 be further defined based on additional HA substitutions. 1 virus belonged to the recently defined
 185 subclade 3c.2a1a (T135K, HA2 G150E); 32 viruses belonged to a clade 3c.2a1 subgroup, close to
 186 vaccine strain A/Singapore/Infimh-16-0019/2016, defined by N121K and, for 14 of them, by G150E
 187 (HA2 numbering); 88 viruses belonged to another clade 3c.2a1 subgroup, close to
 188 A/England/919/2016 (a Bolzano-like strain), whether defined by R142G or other various
 189 substitutions (A/England/919/2016 cluster; Figure 2).



196 Overall, severe, vaccinated, and Lyon University Hospitals cases were broadly distributed,
 197 period- and clade-wise. None of the well-described treatment resistance substitutions
 198 (neuraminidase, NA: E119V, D151E, I222V, R224K, E276D, R292K, and R371K) [32] were present in
 199 any consensus genome, except for the conserved amantadine resistance substitution S31N.
 200 However, several substitutions across the whole genome could significantly distinguish mild from
 201 severe cases and vaccinated from non-vaccinated cases. These substitutions were distributed on the
 202 whole influenza proteome, however most were on HA ($n = 8$), NA ($n = 7$) and non-structural protein
 203 1 (NS1; $n = 4$). Substitutions associated with vaccination status exclusively ($n = 19$) were more varied
 204 but had a weaker statistical significance than those exclusively associated to severity. For the latter, 2
 205 substitutions, V263I on NA and K196E on NS1, were particularly significant ($p < 0.0001$; Table 2a). As
 206 represented in Figure 2, NA V263I and NS1 K196E were mostly found in a specific 3c.2a1 clade
 207 background (as defined by HA phylogeny). The NA substitution was only present alone in 2 strains
 208 associated with mild disease outside this background, whereas the NS1 substitution was not
 209 necessarily in NA-substituted strains. However, when co-occurrent these mutations distinguished
 210 mild from severe cases more precisely (Table 2b). Based on 3D structures, it could be noted that
 211 some of these substitutions were found: On HA positions 131 and 144 which are close to its receptor
 212 binding site (Figure 3a), on NS1 p85 β binding site positions 99 and 146 (Figure 3b), and on NA
 213 position 149 which is close to its sialidase active site (Figure 3c). Additionally, reported substitutions
 214 were verified not being linked to depth-specific features of the respiratory tract sites. When
 215 comparing Lyon University Hospital cases, comprising both lower and higher respiratory tract
 216 samples (50 and 21 samples included in the analysis, respectively), none of the reported
 217 substitutions were associated to sample type.



218

219

220 **Figure 3.** Contextualized locations of substitutions described in our study (in magenta). (a) On HA
 221 (PDB accession no. 4O5N) with antigenic sites A (red), B (green), C (blue), D (yellow), E (orange)
 222 highlighted and the receptor binding site in cyan. (b) On NS1 (PDB accession no. 3EE8) with the
 223 p85 β -binding site colored red. (c) On NA (PDB accession no. 6BR6) with sialidase catalytic residues
 224 in red and framework residues in blue. The image was generated with PyMOL software (Delano
 Scientific).

225 Table 2. Substitutions significantly distinguishing mild from severe cases, and vaccinated from non-vaccinated cases. (a) The amino-acid of each significant position is
 226 indicated for the seasonal consensus, observed variants and, when significant, variants associated with a group. Cases where, for a given position, no amino-acid was
 227 significantly associated with a group are designated by dashes (b) NA V263I and NS1 K196E occurrences in mild and severe groups.

	PB2			PB1			PA			HA1			HA2			NP	
	255	480	52	614	565	121	131	142	144	171	262	77	150	450	472		
Significant	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.01	0.05	0.05	0.05	0.01	0.01	0.05	0.05		
<i>p</i> <						0.05											
Consensus	V	V	R	E	V	N	T	R	S	K	S	V	E	G	A		
Variants	I	I	W/K	D	M	K	K	G/K	K/R	N	N/I	I	G	S/N	T		
Severe cases	-	-	-	-	-	N	I	R	-	-	-	-	-	-	-		
Vaccinated cases	V	V	W/K	D	M	N	-	S	K	S	S	V	E	G	A		
				NA				M1	M2			NS1			NS2		
	93	140	149	161	263	339	468	147	23	99	146	196	224	67			
Significant	0.05	0.01	0.001	0.05	1E-4	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	1E-4	0.05	0.05			
<i>P</i> <		0.005	0.001									0.001					
Consensus	G	I	V	N	V	N	H	V	S	S	L	K	R	E			
Variants	D	L	A	S	V	D	L/P	M	N	T	S	E	S/K	A/K			
Severe cases	-	I	A	-	I	-	-	-	S	-	-	E	R	E			
Vaccinated cases	G	I	A	N	-	N	H	M	-	S	L	E	-	-			

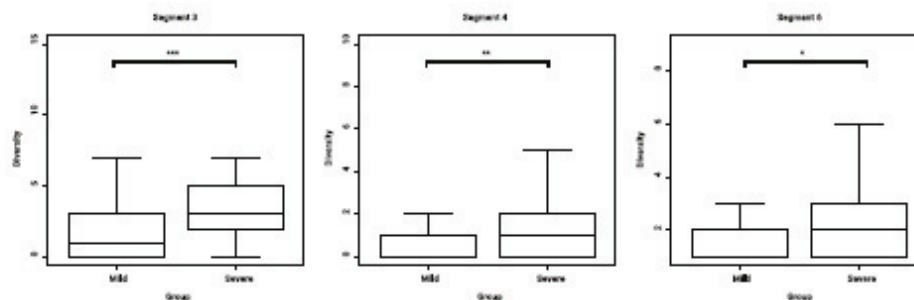
	NS1			Total
	K196	196E	Total	
Mild	64	13	77	
NA				
	V263	263I		
	2	8	10	
Total	66	21	87	

	NS1			Total
	K196	196E	Total	
Severe	32	9	41	
NA				
	V263	263I		
	0	27	27	
Total	32	36	68	

229 HA clustering of the strains did not seem to originate from within-subtype reassortments,
 230 possibly implying the substitutions could have hitchhiked another event rather than being
 231 implicated directly in observed correlations. Phylogenetic trees generated from proteins other than
 232 HA found that the same strains clustered consistently, however without being similar to such an
 233 extent as to indicating a possible common index case. When verified by GiRaF, only one strain was
 234 detected as possibly resulting from a reassortment event. This strain, A/Poitiers/917/2017, presented
 235 genomic segments closely related to A/Switzerland/9715293/2013, the 3c.3a reference strain, except
 236 for its NS1 coding segment corresponding to a 3c.2a1 genotype.

237 3.3. Diversity and Quasispecies Analysis

238 When analyzed individually, no significant role of minor variants was observed in
 239 distinguishing the clinical groups. These minor variants were rarely at the same positions as
 240 the consensus substitutions. An exception to this was found on the HA: the HA 160K substitution,
 241 resulting in the loss of a glycosylation site for these quasispecies, was found in 14 cases (with
 242 frequencies ranging from 1.2% to 98%, median 7.1%) and was significantly associated with severity
 243 ($n = 11$; $p < 0.05$). Otherwise, the same minor variant was rarely found in several patients and at most
 244 in three patients ($n < 4$) and a major part of polymerase-coding segment diversity corresponded to
 245 deletions. In order to discern potential associations between viral particle diversity and clinical
 246 features, we had to perform the analysis on global diversity by segment in each case. Considering
 247 that sequencing depth was variable, groups were defined according to segment and targeted depth
 248 threshold. The mean diversities of segments 3, 4, and 6 (coding for polymerase acidic (PA), HA and
 249 NA proteins, respectively) were significantly higher for severe cases than in mild cases (Figure 4).



250

251 **Figure 4.** Box-plots comparing viral diversity, when considering variants above 1%, for segments
 252 with a significant p-value. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$.

253 Note that a considerable number of mutants had frequencies comprised between 1 and 5%, thus
 254 lowering the depth threshold to 1% was necessary to notice the diversity difference for segment 6. In
 255 comparison, diversity did not vary significantly with vaccination status (Table 3). Once more, as a
 256 control, diversity was verified not being significantly associated with respiratory tract sampling
 257 depth in the cases from the Lyon University Hospitals.

258

259

Table 3. Estimated mean quasispecies diversity comparison according to segment. Number of samples (n), mean diversity and Mann Whitney Wilcoxon test p-value resulting from their comparison, when considering whether variants above 1% or 5%, are reported in each case.

		Segment							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Mild	n	62/47	6/9	58/46	74/56	61/45	64/49	82/68	60/46
	Mean	1.88/2.38	2.33/2.55	2.03/3.46	0.99/1.54	2.75/2.73	1.64/2.24	0.41/0.65	0.42/0.59
Severe	P	0.17	0.81	<0.001	<0.005	0.88	0.03	0.53	0.17
	n	80/69	53/38	80/67	85/69	81/65	83/68	91/73	83/68
Not Vaccinated	Mean	1.68/1.95	0.83/1.05	1.71/2.84	0.93/1.43	2.40/2.23	1.64/2.07	0.41/0.60	0.42/0.54
	P	0.40	0.26	<0.001	<0.005	0.73	0.27	0.75	0.25
Vaccinated	n	45/23	5/3	44/22	56/26	46/22	51/23	65/26	45/19
	Mean	2.22/1.78	3.4/1.3	2.84/2.13	1.20/0.77	3.22/2.27	1.84/1.47	0.51/0.35	0.44/0.47
Threshold	P	0.57	0.36	0.49	0.33	0.05	0.49	0.76	0.58
	n	62/26	37/17	62/26	67/27	63/26	65/27	69/27	65/25
P	Mean	1.85/1.69	1.14/0.53	2.23/2.00	1.18/0.74	2.68/2.15	1.75/1.63	0.51/0.33	0.45/0.52
	P	0.76	0.26	0.89	0.28	0.30	0.77	0.62	0.47

260 4. Discussion

261 In the present study we conducted a comprehensive genomic characterization of H3N2 viruses
262 from either the French national influenza surveillance network or hospitalized in the Lyon
263 University Hospitals intensive care wards using a combination of several approaches. This allowed
264 the impact of antigenic proximity, genomic substitutions, quasispecies diversity, and reassortment
265 events could be studied concomitantly, and the results therefore provide a comprehensive view of
266 mechanisms involved in the severity of the 2016-2017 seasonal influenza in France.

267 These data were generated from a secondary analysis of a cohort designed to investigate
268 molecular evolution of influenza virus. The size of the study did not permit to perform multivariate
269 analysis correcting for sample nature, comorbidities, geographic, or temporal confounding factors
270 that could influence influenza severity, a limitation that is shared with previous studies [8].
271 Furthermore, most severe cases were, by design, from the same region albeit with several hospital
272 centers. However, sequencing was performed directly on clinical samples, avoiding any cell culture
273 or experimental infection bias [33,34]. Clinical samples from this study were collected exclusively
274 from treatment-naïve patients. They were fairly equally distributed between mild and severe cases,
275 and can be considered to be representative of the spectrum of influenza diseases in 2016-2017 season.
276 It should be noted that the specimens of surveillance network patients were mostly collected in
277 upper respiratory tract and earlier after the onset of symptoms than those from hospitalized cases.
278 However, there was no significant difference according to site of respiratory tract sampling within
279 the Lyon University Hospital cases, as this group comprised both upper and lower respiratory tract
280 sample types which could be a source of diversity by itself or by being correlated to viral copy
281 number. In addition, we did not find any substitutions in the HA receptor binding site contrary to
282 what could be expected if influenza viruses' mutations were driven by location on the respiratory
283 tract. Nonetheless, these results should be interpreted as hypothesis generating and future studies
284 validating the impact of mutations described here are warranted.

285 Several substitutions were associated with severity or vaccination status in the study
286 population. Among these, most had not been extensively studied *in vitro* or *in vivo*, hence
287 determining their actual involvement would need further investigations. The two most significant
288 ones, NA V263I and NS1 K196E ($p < 0.001$) have previously been described in other contexts and
289 were strongly associated in the severe group. Note that these substitutions were mostly found in
290 strains belonging to a subgroup of the 3c.2a1 clade. This subgroup differed from the others in 3c.2a1
291 clade by not harboring commonly found substitutions HA1 N121K and HA2 G150E. Interestingly,
292 both substitutions were reported co-varying along substitutions altering p85 β binding by NS1 in
293 H1N1 strains [35]. Additionally, the substitution NS1 K196E was reported to increase virulence in
294 mice when induced in an H5N1 backbone [36]. To the best of our knowledge, NA V263I has not been
295 studied in an H3N2 background yet. However, a comprehensive study of NA V263I involvement at
296 the structural level suggested the isoleucine, which is two methyl groups higher than a valine, could
297 allow important changes by altering hindrance effects [37]. It was also suggested that this site was
298 part of an epitope that was suitable for therapeutic monoclonal antibodies, and that an amino-acid
299 change at this position modified the immune response [38]. We also reported substitution on V149A
300 on NA which is close to the active site, may have some impact on the sialidase activity. Substitutions
301 significantly associated with vaccination status comprised many clade-defining HA substitutions
302 (HA1 N121K, S144K, N171K; HA2 I77V, G150E), reflecting strains antigenically less related to
303 A/Hong Kong/4801/2014, the 2016-2017 H3N2 vaccine strain. Notably, substitutions were found on
304 position 131 and 144 close to positions 155 and 145 which have been shown to be crucial for the
305 evolution of H3N2 viruses [5]. As vaccination efficacy relies on the antigenic proximity with vaccinal
306 strains, these associations with putative antigenic changes, albeit statistically weaker, make sense
307 and tend to support the validity of the results presented herein.

308 NGS has brought to light new areas of research in microbiology, in particular on genetic
309 diversity and on the implication of quasispecies in physiopathology [39–44]. For instance, certain
310 influenza virus quasispecies have been reported fostering cell-to-cell mechanisms under treatment

311 pressure [13], but also to change viral tropism [8]. When analyzed on a global genomic diversity
 312 scale, we found an association between severity and high diversity whereas vaccination status had
 313 no impact, as previously described [45,46]. Herein, we also found that this association concerned
 314 segments 3, 4, and 6 (coding for PA, HA, and NA respectively) only. This is likely to be in relation to
 315 specific selective pressure experienced by each segment that is dependent on the “swarm” needs,
 316 viral particles constitution and coded proteins, mainly [11]. For now, hypothesizing why these
 317 segments show a significant difference would not be supported by any experimental evidence. Thus,
 318 we believe genetic diversity should be considered for each segment independently. As explained in
 319 the sequencing efficacy description of the samples herein, an inconsistent read depth was observed
 320 on polymerase-coding segments, which could suggest the existence of defective particles in certain
 321 cases [15]. We could not conclude as to the reliability of these observations as the study was not
 322 designed to explore this complex problem. An approach focused on anticipating the difficulties
 323 related to molecular biology and bioinformatic analysis in this case is required.

324 In conclusion, the global approach of influenza sequencing results reported herein indicate that
 325 multiple factors needed to be considered to understand the causes of the 2016-2017 season epidemic
 326 severity, and support the potential added value of whole-genome sequencing for influenza
 327 surveillance.

328 **Author Contributions:** conceptualization, M.P. and L.J.; methodology, M.P., B.S.; software, B.S.; validation,
 329 B.S., and L.J.; formal analysis, B.S., M.R.; investigation, M.P., G.B.; resources, M.V., L.J.; data curation, B.S., M.V.;
 330 writing—original draft preparation, B.S., M.P., L.J.; writing—review and editing, B.S., L.J., M.P., B.L., M.V.,
 331 M.R., G.B.; visualization, B.S.; supervision, B.L., L.J.; project administration, L.J.; funding acquisition, L.J., B.L.

332 **Funding:** This study was performed in the field of the global surveillance of influenza viruses performed by
 333 WHO and by the “Centre National de Référence des virus des infections respiratoires” supported by “Santé
 334 Publique France” (SPF) in France.

335 The DRIVE Project has received funding from the Innovative Medicines Initiative 2 Joint Undertaking under
 336 grant agreement No 777363. This Joint Undertaking receives support from the European Union’s Horizon 2020
 337 research and innovation and EFPIA.

338 **Acknowledgments:** The authors are very grateful to all clinicians, virologists and laboratory technicians for
 339 their active participation and help in this study. We want to thank Philip Robinson (DRCI, Hospices Civils de
 340 Lyon) for his valuable help in the preparation of this manuscript.

341 **Conflicts of Interest:** M.P. received research grant from Theradiag and Hologic and is member of the Young
 342 microbiologist section of the French Society for Microbiology.

343 B.L. is the co-Chair of the Global Influenza Initiative, a member of the scientific committee of the Global
 344 Hospital Influenza Surveillance Network, a member of the Foundation for Influenza. He received a travel grant
 345 from Alere to attend the RICAI 2017 Conference, and a travel Grant from Seegene to attend the ECCMID
 346 conference in 2017. All personal remuneration stopped in September 2010.

347 L.J. has served on the French Advisory Board for SANOFI on the ‘Quadrivalent Influenza Vaccine’ in 2017 and
 348 2018.

349 The other authors (B.S., M.V., G.B.) declare that there are no conflicts of interest associated to this study.

350 References

- 351 1. WHO | Influenza (Seasonal) Fact Sheet. Prevention and control of influenza pandemics and annual
 352 epidemics. Reviewed January 2018. WHO. [Internet]. Available from:
 353 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>
- 354 2. Uhart M, Bricout H, Clay E, Largeron N. Public health and economic impact of seasonal influenza
 355 vaccination with quadrivalent influenza vaccines compared to trivalent influenza vaccines in Europe.
 356 Hum Vaccin Immunother. 2016; 12(9):2259–2268.
- 357 3. Chowell G, Bertozzi SM, Colchero MA, et al. Severe Respiratory Disease Concurrent with the Circulation
 358 of H1N1 Influenza. New England Journal of Medicine. 2009; 361(7):674–679.

- 359 4. Jamieson DJ, Honein MA, Rasmussen SA, et al. H1N1 2009 influenza virus infection during pregnancy in
360 the USA. *The Lancet*. 2009; 374(9688):451–458.
- 361 5. Koel BF, Burke DF, Bestebroer TM, et al. Substitutions Near the Receptor Binding Site Determine Major
362 Antigenic Change During Influenza Virus Evolution. *Science*. 2013; 342(6161):976–979.
- 363 6. Abed Y, Baz M, Boivin G. Impact of neuraminidase mutations conferring influenza resistance to
364 neuraminidase inhibitors in the N1 and N2 genetic backgrounds. *Antivir Ther (Lond)*. 2006; 11(8):971–976.
- 365 7. Boivin Guy. Detection and management of antiviral resistance for influenza viruses. *Influenza and Other
366 Respiratory Viruses*. 2013; 7(s3):18–23.
- 367 8. Wedde M, Wählisch S, Wolff T, Schweiger B. Predominance of HA-222D/G Polymorphism in Influenza
368 A(H1N1)pdm09 Viruses Associated with Fatal and Severe Outcomes Recently Circulating in Germany.
369 *PLOS ONE*. 2013; 8(2):e57059.
- 370 9. Hung IFN, To KKW, Lee C-K, et al. Effect of Clinical and Virological Parameters on the Level of
371 Neutralizing Antibody against Pandemic Influenza A Virus H1N1 2009. *Clin Infect Dis*. 2010;
372 51(3):274–279.
- 373 10. Lai S, Qin Y, Cowling BJ, et al. Global epidemiology of avian influenza A(H5N1) virus infection in
374 humans, 1997 – 2015: a systematic review. *Lancet Infect Dis*. 2016; 16(7):e108–e118.
- 375 11. Domingo E, Sheldon J, Perales C. Viral Quasispecies Evolution. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2012;
376 76(2):159–216.
- 377 12. Pappas C, Yang H, Carney PJ, et al. Assessment of transmission, pathogenesis and adaptation of H2
378 subtype influenza viruses in ferrets. *Virology*. 2015; 477:61–71.
- 379 13. Mori K, Murano K, Ohniwa RL, Kawaguchi A, Nagata K. Oseltamivir Expands Quasispecies of Influenza
380 Virus through Cell-to-cell Transmission. *Scientific Reports*. 2015; 5:9163.
- 381 14. Dinis JM, Florek NW, Fatola OO, et al. Deep Sequencing Reveals Potential Antigenic Variants at Low
382 Frequencies in Influenza A Virus-Infected Humans. *J Virol*. 2016; 90(7):3355–3365.
- 383 15. Vasilijevic J, Zamarreño N, Oliveros JC, et al. Reduced accumulation of defective viral genomes
384 contributes to severe outcome in influenza virus infected patients. *PLOS Pathogens*. 2017; 13(10):e1006650.
- 385 16. Ghedin E, Holmes EC, DePasse JV, et al. Presence of Oseltamivir-Resistant Pandemic A/H1N1 Minor
386 Variants Before Drug Therapy With Subsequent Selection and Transmission. *J Infect Dis*. 2012;
387 206(10):1504–1511.
- 388 17. Xue KS, Hooper KA, Ollodart AR, Dingens AS, Bloom JD. Cooperation between distinct viral variants
389 promotes growth of H3N2 influenza in cell culture. *eLife*. 2016; 5:e13974.
- 390 18. Ferguson NM, Galvani AP, Bush RM. Ecological and immunological determinants of influenza evolution.
391 *Nature*. 2003; 422(6930):428–433.
- 392 19. Rambaut A, Pybus OG, Nelson MI, Viboud C, Taubenberger JK, Holmes EC. The genomic and
393 epidemiological dynamics of human influenza A virus. *Nature*. 2008; 453(7195):615–619.
- 394 20. Muscatello DJ, Newall AT, Dwyer DE, MacIntyre CR. Mortality Attributable to Seasonal and Pandemic
395 Influenza, Australia, 2003 to 2009, Using a Novel Time Series Smoothing Approach. *PLoS One* [Internet].
396 2013 [cited 2019 Jan 14]; 8(6). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3670851/>
- 397 21. Simonsen L. The global impact of influenza on morbidity and mortality. *Vaccine*. 1999; 17 Suppl 1:S3-10.
- 398 22. Équipes de surveillance de la grippe. Surveillance de la grippe en France, saison 2016-2017. *Bull Épidémiol
399 Hebd*. 2017;(22):466-75. http://invs.santepubliquefrance.fr/beh/2017/22/2017_22_1.html.

- 400 23. Zost SJ, Parkhouse K, Gumina ME, et al. Contemporary H3N2 influenza viruses have a glycosylation site
401 that alters binding of antibodies elicited by egg-adapted vaccine strains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;
402 114(47):12578–12583.
- 403 24. Zhou B, Donnelly ME, Scholes DT, et al. Single-Reaction Genomic Amplification Accelerates Sequencing
404 and Vaccine Production for Classical and Swine Origin Human Influenza A Viruses. *J Virol*. 2009;
405 83(19):10309–10313.
- 406 25. Pichon M, Simon B, Valette M, et al. Evolution of influenza genome diversity during infection in
407 immunocompetent patients. *bioRxiv*. 2018; :435263.
- 408 26. Rotmistrovsky K, Agarwala R. BMTagger: Best Match Tagger for removing human reads from
409 metagenomics datasets. <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/agarwala/bmtagger/>. Accessed 26 April 2018. 2011;
410 .
- 411 27. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads.
412 *EMBnetjournal*. 2011; 17(1):10–12.
- 413 28. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*.
414 2009; 25(14):1754–1760.
- 415 29. Blankenberg D, Von Kuster G, Bouvier E, et al. Dissemination of scientific software with Galaxy ToolShed.
416 *Genome Biol*. 2014; 15(2):403.
- 417 30. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger
418 Datasets. *Mol Biol Evol*. 2016; 33(7):1870–1874.
- 419 31. Nagarajan N, Kingsford C. GiRaF: robust, computational identification of influenza reassortments via
420 graph mining. *Nucleic Acids Res*. 2011; 39(6):e34.
- 421 32. Summary table of neuraminidase amino acid substitutions associated with reduced inhibition by
422 neuraminidase inhibitors (NAI). [Internet]. Available from:
423 http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/antiviral_susceptibility/nai_overview/en/
- 424 33. Murcia PR, Hughes J, Battista P, et al. Evolution of an Eurasian Avian-like Influenza Virus in Naïve and
425 Vaccinated Pigs. *PLOS Pathogens*. 2012; 8(5):e1002730.
- 426 34. Lee HK, Tang JW-T, Kong DH-L, et al. Comparison of Mutation Patterns in Full-Genome A/H3N2
427 Influenza Sequences Obtained Directly from Clinical Samples and the Same Samples after a Single MDCK
428 Passage. *PLOS ONE*. 2013; 8(11):e79252.
- 429 35. Lopes AM, Domingues P, Zell R, Hale BG. Structure-Guided Functional Annotation of the Influenza A
430 Virus NS1 Protein Reveals Dynamic Evolution of the p85 β -Binding Site During Circulation in Humans.
431 *Journal of Virology*. 2017; :JVI.01081-17.
- 432 36. Min J-Y, Santos C, Krug R, Subbarao K. Glutamic acid at position 196 of the NS1 protein is associated with
433 both a block in IRF3 activation and the virulence of a HPAI H5N1 virus in mice. Fourth ESWI Influenza
434 Conference Poster [Internet]. 2011 [cited 2018 Apr 24]; . Available from:
435 <https://core.ac.uk/download/pdf/37965740.pdf>
- 436 37. Ramírez-Salinas GL, García-Machorro J, Quiliano M, et al. Molecular modeling studies demonstrate key
437 mutations that could affect the ligand recognition by influenza AH1N1 neuraminidase. *J Mol Model*. 2015;
438 21(11):292.
- 439 38. Wan H, Yang H, Shore DA, et al. Structural characterization of a protective epitope spanning
440 A(H1N1)pdm09 influenza virus neuraminidase monomers. *Nature Communications*. 2015; 6:6114.
- 441 39. Solmone M, Vincenti D, Prosperi MCF, Bruselles A, Ippolito G, Capobianchi MR. Use of Massively Parallel
442 Ultradeep Pyrosequencing To Characterize the Genetic Diversity of Hepatitis B Virus in Drug-Resistant

- 443 and Drug-Naive Patients and To Detect Minor Variants in Reverse Transcriptase and Hepatitis B S
444 Antigen. *J Virol.* 2009; 83(4):1718–1726.
- 445 40. Kuroda M, Katano H, Nakajima N, et al. Characterization of Quasispecies of Pandemic 2009 Influenza A
446 Virus (A/H1N1/2009) by De Novo Sequencing Using a Next-Generation DNA Sequencer. *PLOS ONE.*
447 2010; 5(4):e10256.
- 448 41. Bartolini B, Chillemi G, Abbate I, et al. Assembly and characterization of pandemic influenza A H1N1
449 genome in nasopharyngeal swabs using high-throughput pyrosequencing. *New Microbiol.* 2011;
450 34(4):391–397.
- 451 42. Nishijima N, Marusawa H, Ueda Y, et al. Dynamics of Hepatitis B Virus Quasispecies in Association with
452 Nucleos(t)ide Analogue Treatment Determined by Ultra-Deep Sequencing. *PLOS ONE.* 2012; 7(4):e35052.
- 453 43. Kukimoto I, Maehama T, Sekizuka T, et al. Genetic Variation of Human Papillomavirus Type 16 in
454 Individual Clinical Specimens Revealed by Deep Sequencing. *PLOS ONE.* 2013; 8(11):e80583.
- 455 44. Ruiz-Carrascoso G, Romero-Gómez MP, Plaza D, Mingorance J. Rapid detection and quantitation of
456 ganciclovir resistance in cytomegalovirus quasispecies. *Journal of Medical Virology.* 2013;
457 85(7):1250–1257.
- 458 45. Vignuzzi M, Stone JK, Arnold JJ, Cameron CE, Andino R. Quasispecies diversity determines pathogenesis
459 through cooperative interactions within a viral population. *Nature.* 2006; 439(7074):344–348.
- 460 46. Debbink K, McCrone JT, Petrie JC, et al. Vaccination has minimal impact on the intrahost diversity of
461 H3N2 influenza viruses. *PLOS Pathogens.* 2017; 13(1):e1006194.
- 462



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Chapitre 6. Existe-t-il des différences de diversité génomique virale minoritaire à l'état de base ou au cours de la diversification chez les hôtes à risque de formes graves ?

1. Objectif

Dans cette étude, nous décrivons l'évolution de l'infection grippale sévère à virus H1N1 chez un patient présentant un Déficit Immunitaire Commun Variable, aboutissant à une excrétion de plus de 6 mois et permettant l'étude de cette diversité virale sous sélection immunitaire et thérapeutique, par méthode conventionnelle et NGS.

2. Article

Pichon M., Picard C., Simon B., Gaymard A., Renard C., Massenavette B. Malcus C., Monneret G., Morfin-Sherpa F., Valette M., Javouhey E., Millat G., Lina B., Josset L., Escuret V. Clinical management and viral genomic diversity analysis of a child's influenza A(H1N1)pdm09 infection in the context of a severe combined immunodeficiency. Antiviral Res. 2018 Oct 11;160:1-9



Contents lists available at ScienceDirect

Antiviral Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/antiviral

Clinical management and viral genomic diversity analysis of a child's influenza A(H1N1)pdm09 infection in the context of a severe combined immunodeficiency

Maxime Pichon^{a,b,3}, Caroline Picard^{a,b,1,2,3}, Bruno Simon^a, Alexandre Gaynard^{a,b}, Cécile Renard^c, Bruno Massenavette^d, Christophe Malcus^c, Guillaume Monneret^c, Florence Morfin-Sherpa^{a,b}, Martine Valette^{a,b}, Etienne Javouhey^d, Gilles Millat^f, Bruno Lina^{a,b}, Laurence Josset^{a,b}, Vanessa Escuret^{a,b,*}

^a Hospices Civils de Lyon, Centre National de Référence des virus des infections respiratoires, Laboratoire de Virologie, Institut des Agents Infectieux, Groupement Hospitalier Nord, F-69317, Lyon Cedex 04, France

^b Univ Lyon, CIRI, Inserm U1111, CNRS UMR5308, ENS, UCBL1, Équipe Virpath, Faculté de Médecine Lyon Est, 7-11 Rue Guillaume Paradin, F-69372, Lyon Cedex 08, France

^c Hospices Civils de Lyon, Institut d'Hématologie et d'Oncologie Pédiatrique, Unité Protégée, 1 Place Joseph Renuit, F-69008, Lyon, France

^d Hospices Civils de Lyon, Service de Réanimation Pédiatrique, Hôpital Femme Mère Enfant, Groupement Hospitalier Est, 59 Boulevard Pineau, F-69677, Bron, France

^e Hospices Civils de Lyon, Laboratoire d'Immunologie, Groupement Hospitalier Edouard Herriot, 5 Place d'Ansonval, F-69437, Lyon Cedex 03, France

^f Hospices Civils de Lyon, Plateforme de séquençage diagnostique, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Groupement Hospitalier Est, F-69677, Bron, France

ARTICLE INFO

Keywords

Influenza A(H1N1)pdm09 virus
Oseltamivir resistance
Intravenous zanamivir
Next-generation sequencing
NA-H275Y substitution
NA-E119A substitution

ABSTRACT

Introduction: A child with severe combined immunodeficiency (SCID) had an influenza A(H1N1)pdm09 infection with viral excretion longer than 6 months, during 2013–2014 influenza season, despite cord blood transplantation and antiviral treatments.

Method: Conventional real-time RT-PCR methods were used to estimate viral load and to detect the presence of the common N1 neuraminidase (NA) H275Y substitution responsible for oseltamivir resistance. Next-generation sequencing (NGS) of influenza viruses was performed retrospectively to characterize viral quasispecies in specimens.

Results: The patient was first treated with oral oseltamivir, leading to detection of low-levels of NA-H275Y substitution. Concomitant cord blood cell transplantation, intravenous administration of zanamivir and immunoglobulins led to an increase in white blood cells and influenza viral load decrease. A viral rebound occurred as soon as the antiviral treatment was discontinued. Eventually, influenza viral load was negated with immune reconstitution. NGS found influenza quasispecies harboring NA-E119A substitution (10.3%). Moreover, NGS showed that viral genomic diversity evolved under antiviral treatment and immune status.

Conclusions: Conventional virological techniques were sufficient for influenza infection follow-up but NGS performances allowed characterization of viral variants evolution in this specific case of prolonged influenza virus infection. New and efficient treatments against influenza in immunocompromised patients are needed.

1. Introduction

The duration of influenza viral shedding is usually about 6 days in immunocompetent patients but increase in function of the immunity impairment (Baz et al., 2006; Boivin et al., 2002; Memoli et al., 2014).

In immunocompromised patients, influenza virus infections are more severe, with an elevated risk of antiviral resistance after selection in treated patients (Memoli et al., 2014).

Neuraminidase (NA) inhibitors (NAI) are the only anti-influenza drugs recommended by WHO. In France, only oral oseltamivir and

* Corresponding author. Laboratoire de Virologie – Institut des Agents Infectieux, Groupement Hospitalier Nord, F-69317, Lyon Cedex 04, France.
E-mail address: vanessa.escuret@chu-lyon.fr (V. Escuret).

¹ CIRI, Centre National de référence des fièvres hémorragiques virales, Unité de biologie des infections virales émergentes, Institut Pasteur, F-69007, Lyon, France.

² correspond to present address of author no longer at the institution where the work was performed.

³ These authors contributed equally to the work.

<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.10.009>

Received 11 May 2018; Received in revised form 3 October 2018; Accepted 8 October 2018

Available online 11 October 2018

0166-3542/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

intravenous (IV) zanamivir (upon special authorization) are available. In immunocompromised patients, IV zanamivir may be considered an option for the first line of treatment (Marty et al., 2017), but there is currently no consensus recommendation. However, oseltamivir and zanamivir combined is not recommended as it could lead to a competitive antagonism (Duval et al., 2010). Furthermore, a phase II clinical trial conducted in patients at risk of complications that investigated the combination oseltamivir, amantadine and ribavirin versus oseltamivir monotherapy did not find any clinical benefit of the combination treatment; the median duration of symptoms was 4.5 days in the combination arm and 4.0 days in the monotherapy arm (Beigel et al., 2017).

The 2007/2008 winter season was marked by the emergence of seasonal A (H1N1) influenza viruses bearing a NA-H275Y substitution responsible for oseltamivir resistance in untreated patients. However, since the 2009 pandemic, oseltamivir treatment in immunocompromised patients is the leading cause of oseltamivir resistance (Hurt et al., 2012; Okomo-Adhiambo et al., 2015; Takashita et al., 2013).

Currently, influenza virus genomic diversity study is focused on hemagglutinin antigenic evolution and matching with current vaccines. Next-generation sequencing (NGS) allows precise influenza genomic diversity assessment of individual specimens and a longitudinal evaluation over the course of infection and the immune status of a patient. However, NGS has been rarely used to characterize prolonged influenza A(H1N1)pdm09 or A(H3N2) infection in immunocompromised patients (Eshaghi et al., 2014; Ghedin et al., 2011, 2012; Trebbien et al., 2017), and only two papers report viral quasispecies investigation in severe combined immunodeficiency (SCID) patients, infected with respiratory syncytial virus (RSV) (Grad et al., 2014) or influenza A(H3N2) virus (Rogers et al., 2015).

In this paper, we describe severe influenza A(H1N1)pdm09 virus infection in a SCID child with more than 6 months of viral excretion. Viral genomic diversity under immune and antiviral treatment selection was studied using conventional techniques and NGS.

2. Materials and methods

2.1. Ethics

This study was approved by the ethics committee of Hospices Civils de Lyon on July 18, 2017. To protect anonymity of the patient the precise dates of specimen collection was not given. Respiratory samples were collected for regular disease management during hospital stay and no additional samples were taken.

2.2. Virological diagnosis of influenza virus infection

A total of 12 nasopharyngeal aspirates (NPA) and 21 nasopharyngeal swabs (NS) were collected from March to August 2014. Subsequently, virus culture medium was added to obtain at least 1.5 mL final volume. All clinical samples were screened for the presence of influenza virus using the respiratory MWS Influenza A/B R-GENE[®] real time reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction (rt RT-qPCR) assay (Argène bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) that can detect both influenza A and B viruses. RNA was extracted from 200 µL of sample using the automated NucliSENS[®] easyMAG[®] system (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). Elution was performed in 50 µL. Influenza A subtyping was performed using in-house RT-qPCR (CNR des virus des infections respiratoires, Institut Pasteur, Paris).

2.3. Cells and viral culture

Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells (obtained from ATCC; CCL34) were maintained in serum-free medium (EMEM; Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 1% L-Glutamine (200 nM;

Lonza), 2% of penicillin-streptomycin (10,000U penicillin/mL; 10,000U streptomycin/mL; Lonza). Cells were maintained at 37 °C and 5% CO₂. Respiratory samples were cultured on MDCK cells to isolate virus; two passages were performed prior to NA inhibition assays. Viral culture was performed at 34 °C and 5% CO₂.

2.4. NA activity and inhibition assays

Oseltamivir carboxylate was provided by Hoffmann-La Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), and zanamivir by GlaxoSmithKline (GSK, Brentford, UK). The fluorometric inhibition assays were performed using a MFX fluorometer (Dynex technologies, Chantilly, VA, USA) as described previously, except MES buffer was at pH 6.4 (Ferraris et al., 2005). The NA inhibition assay was performed using a standardized amount of NA activity (10 nmol/h/mL). The NA activity was calculated as the quantity of 2'-(4-methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid (MUNANA) substrate (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) degraded to 4-methylumbelliferone in 1 h per mL of viral suspensions (nmol/h/mL). The inhibitory concentration (IC₅₀) is the drug concentration (nM) able to inhibit 50% of the NA activity and was calculated using SigmaPlot software v 8.0 (Systat software, San Jose, CA, USA).

2.5. RT-qPCR for quantification of the NA-H275Y substitution in clinical samples

RT-qPCR for NA-H275Y substitution quantification in N1 was performed on 28 specimens as previously described (Escuret et al., 2012). Briefly, probes were specific for 275Y (FAM-probe) or H275 (VIC-probe). The assay was performed on the ABI7500 thermocycler (Applied Biosystem, Foster city, CA, USA) that was programmed as follows: 50 °C for 15 min (RT), 95 °C for 2 min (polymerase activation), then 45 cycles at 95 °C for 15 s (denaturation), and 60 °C for 40 s (annealing elongation; reading of fluorescence). A Ct value higher than 45 was considered as negative for the rest of the study.

2.6. Influenza A(H1N1)pdm09 next-generation sequencing

Six NPA samples (collected on post-infection day 14, 99, 111, 115, 121, and 136) and two NS specimens (collected on post-infection day 40 and 72) were included in this study. Extraction was performed as for the diagnosis step. Nucleic acids were stored at -80 °C. Sequences corresponding to each influenza A genomic segment were obtained by a commercial multiplex RT-PCR using the PathAmp[™] Flu A reagents kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), controlled on a 1% agarose gel. After purification using Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, Beverly, MA, USA). Quality and quantity of DNA was evaluated using a NanoDrop1000 spectrophotometer and Qubit 2.0 HS DNA kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Sequencing of these amplicons was performed using two different NGS methodologies. On the one hand, samples were sequenced using PGM technologies, as previously described (Pichon et al., 2017). Library was prepared manually using 100ng of DNA; using Ion Xpress[™] plus Library Preparation kit (Life Technologies). After purification using Agencourt AMPure XP beads, quality and quantity of each library was verified using the 2100 Bioanalyzer (DNA High Sensitivity Chip, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). They were then diluted and pooled in equimolar amounts (26pM) before emulsification and sequencing. Emulsified libraries were finally loaded onto a Ion 318v2 chip (Life Technologies) then sequenced on an Ion-Torrent sequencer following the manufacturer's instructions (Ion PGM[™] 200 Sequencing v2 protocol, Life Technologies).

On the other hand, amplicons were sequenced using an Illumina sequencing platform (Illumina, San Diego, CA, USA) to reinforce observed results on PGM platform. Briefly, after mechanical shearing on M220 Focused-ultrasonicator[™], (Covaris Inc., Woburn, MA, USA), end-

repair, adenylation, and adapter ligation were performed using NextFlex™ Rapid DNA Sequencing Bundle (Bio Scientific, Austin, TX, USA). Size selection was performed to obtain 150–250 to 700 bp DNAc (corresponding to a 150-bp-insert). Amplification was performed according to the manufacturer's recommendations, quality was then checked using Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) and followed by quantification of each library on Lab Chip™ GX Touch DNA High-Sensitivity (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). All libraries were pooled and sequenced on Illumina NextSeq 500⁺ (Illumina) using a MidOutput cartridge (Illumina). The reads obtained on the sequencing platform were submitted to NCBI's Sequence Read Archive and can be found under project number SUB3709326.

2.7. Bioinformatic analysis

The sequence reads, obtained from Ion PGM and Illumina NextSeq, were analyzed separately but followed the same bioinformatic procedure except for technology-dependent settings. The reads were trimmed using cutadapt (v0.4.4) (Martin, 2011), for adapters and low base quality removal (Phred score < 20). Reads smaller than 50 bases and, for Illumina NextSeq only, the paired reads with which they were associated, were excluded. Since the studied strain belonged to clade 6, its representative, A/South Africa/3626/2013 (GISAID Isolate 175880), was used as reference for further steps (Supplementary Figure) (Bogner et al., 2006). Mapping was conducted with the BWA-MEM algorithm (v0.7.15) (Li, 2014) using default settings except for gap opening and extension penalties set to 10 and 2, respectively, to increase indel stringency. Sorted mapped reads were manually inspected through Fastqc (v0.11.5) to verify read quality. Single nucleotide polymorphism (SNP) calling was divided into two steps. First, variant calling files (vcf) were generated with naive variant caller (Biomina Galaxy platform) (Blankenberg et al., 2014), only excluding bases presenting a base- or a mapping-Phred score < 20. Second, a homemade vcf analysis python script was used that applied filters to validate SNPs retrieved previously and generate end-user workable files. Briefly, to this purpose, a quantitative strand bias (SB) score was calculated to estimate an uncertainty for variants frequencies reported (Guo et al., 2012a, 2012b). For each position, a depth-adapted threshold was calculated following a *t*-test distribution and corresponded to the lowest variant frequency detected with 99% power of detection for a given depth. These SNPs required to have a SB score lesser than 1.0, corresponding to an uncertainty at least smaller than reported frequency, and an estimated minimal frequency greater than both an arbitrary (5%) and a depth-adapted threshold. SB score could only be calculated for paired-end files; therefore, no correction could be applied to Ion PGM SNP frequencies. Results reported in this study were based on validated SNPs found in both Ion PGM and Illumina NextSeq sequencing and their estimated minimal frequency. Segment sequences with a low coverage (mean depth < 2,000X) were excluded from analysis.

3. Results

3.1. Patient clinical history

A five-month-old child was admitted for oxygen-requiring interstitial pneumonia associated with bronchiolitis symptoms. These respiratory symptoms had started 14 days before hand (considered as Day 0, D0) and were due to an influenza virus infection diagnosed on NPA at D14 (Fig. 1A). Within his first months of life, he had presented two episodes of acute pyelonephritis and an episode of wheezing complicated by oral candidiasis due to steroid treatment. These iterative infections led to immunological analyses to be performed that found agammaglobulinemia and a defect of T and NK cells suggesting an X-SCID.

In order to correct the SCID, and despite the ongoing influenza infection, the patient underwent allogeneic cord blood transplantation on

D83, previously conditioned by fludarabine, melphalan and anti-lymphocyte serum association. Immunosuppressive therapy was based on cyclosporin and steroids. Aplasia ended on D97 with an increase in neutrophils and monocytes but lymphopenia persisted until lymphocytes increased on D173 and from D206 to D219 (Fig. 1B). The patient's condition deteriorated in the weeks following cord blood transplantation; severe respiratory distress (due to influenza infection concomitant with innate immunity reconstitution but with persistent lymphopenia) leading to intensive care unit (ICU) admission from D99 to D138. A graft-versus-host-disease (GVHD) was suspected due to hepatic impairment characterized by moderate hepatic cytolysis (2-fold increase of liver transaminases on D123) and important cholestasis (35-fold increase of gamma glutamyl transferases on D129). Thus, immunosuppression with cyclosporin and steroids was maintained but these drugs were responsible for hypertension. Due to persistent cholestasis, the patient was admitted again to the ICU on D220 to undergo plasmapheresis, and cyclosporin was replaced by tacrolimus on D222. The patient was also infected by a bocavirus and norovirus II whose viral loads also varied according to the immunity and were still detected on D236 and D240. Finally, the patient died on D243.

3.2. Influenza viral infection and antiviral treatment

Influenza virus detection remained positive in respiratory samples for 6 months (last positive specimen on D177) despite NAI treatment (Fig. 1A). Oral oseltamivir (15mg twice daily) was administered from D35 to D40. A temporary authorization for the compassionate use of IV zanamivir was obtained on D100 since an oseltamivir-resistant subpopulation was detected. This treatment, associated with IV immunoglobulins, was extended during 15 days. This treatment, concomitant with partial immune reconstitution, allowed an influenza viral load decrease around 2 log₁₀ copies/mL on NPA (Fig. 1A, Table 1). However, insufficient data on a potential toxicity during extended use led to discontinue IV zanamivir and initiate another oseltamivir therapy from D118 to D123, as the oseltamivir-resistant subpopulation had lowered, but this treatment was inefficient. The viral load was correlated to immune reconstitution (Fig. 1). The white blood cells decrease between D117 and D146, associated to the antiviral stop led to a viral load rebound (very close Ct for NPA specimens at D136 and D100). Finally, the viral clearance was obtained when immune reconstitution was sufficient.

3.3. Evaluation of susceptibility of influenza virus to NAI using conventional techniques

During the clinical management of the patient, 11 NPA and 17 NS, collected between D14 to D177 after the onset of symptoms, were found to be positive for influenza A viruses (Table 1) and secondarily sub-typed as an A(H1N1)pdm09 virus. The viral loads for NPA samples were higher as this sampling method allows recovering more cells than NS (Fig. 1A). A proportion of 11%–29% of influenza viruses bearing a NA-H275Y substitution were detected, after oseltamivir therapy, on NS performed on D40, D44, D51, D66 and D72 but not D58 when viral load was very low (Ct = 34). This subpopulation appeared just after oseltamivir treatment (from D35 to D40), persisted at least up to D121 (Table 1) during which there was low immune pressure (Fig. 1B). After cord blood allograft transplant, on D83, the respiratory distress worsened as viral load increased at D86 at which time no 275Y variants could be detected. On D107, the highest proportion of 275Y variants (24%) were detected and the viral load was the lowest since transplant (Ct = 29; Table 1).

The 275Y substitution was detected on several specimens but only at a low proportion (≤29%) (Table 1, Table 3) and only wild-type viruses were selected after cell culture. Fourteen influenza virus isolates were obtained after culture and all presented normal inhibition by oseltamivir (mean ± SD oseltamivir IC₅₀: 0.38 ± 0.18nM) and

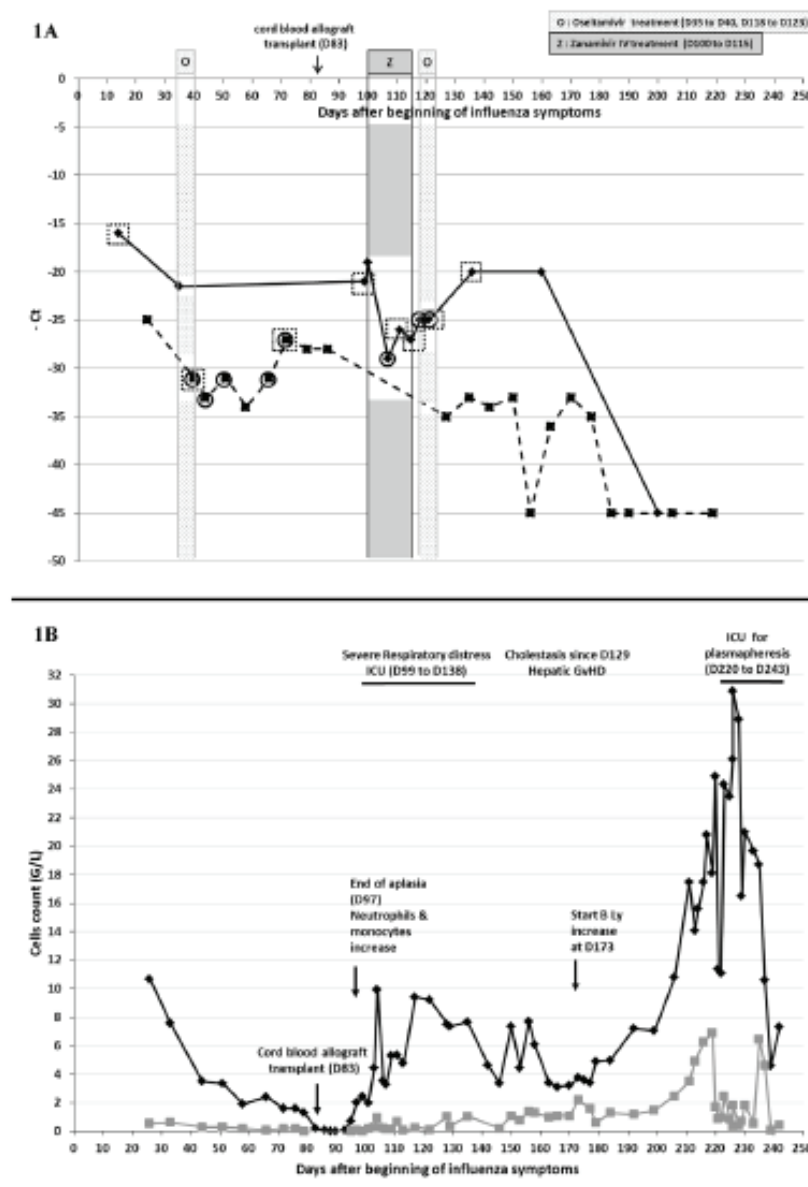


Fig. 1. Influenza viral load in clinical specimens (1A) and white blood cell counts (1B) during the course of influenza A(H1N1)pdm09 infection follow-up. (1A) Real-time RT-qPCR cycle thresholds (C_t) were inversely proportional to the influenza virus load in the respiratory sample. Inverted y-axis allows an easier comprehension of viral load kinetics. The x-axis represents days of specimen sampling after beginning of influenza clinical symptoms considered as D0. Diamonds represent nasopharyngeal aspirates (NPA) and squares nasopharyngeal swabs (NS). Viral load kinetics were represented by discontinuous or continuous lines depending of the sample nature (NPA and NS respectively). The H275Y NA substitution presence was tested by RT-qPCR in all specimens collected until D156. Specimens with detection of a proportion of 275Y NA substitution are circled. Specimens used for influenza deep genome sequencing are indicated with a dashed square. Treatments by oseltamivir or zanamivir are noted by shades of gray (light gray for oseltamivir and dark gray for zanamivir). Note that C_t could not be strictly superposed between NPA and NS, due to the difference between these sampling methods. (1B) The x-axis represents days after beginning of influenza clinical symptoms considered as D0. Absolute counts are expressed in G/L (corresponding to 10^6 Cells/ml). White blood cells are presented with a black line and include polymuclear cells, lymphocytes and monocytes. Lymphocytes are presented with a gray line. Aplasia ended at D97 with a rapid increase in the neutrophil count followed by an increase in monocyte count. Lymphopenia persisted on T and NK cells. Note that lymphocytes increase was due to B lymphocytes increase at D173 and from D206 to D219. Abbreviations: ICU, intensive care unit; Ly, lymphocytes; GVHD, graft versus host disease.

zanamivir (mean \pm SD zanamivir IC_{50} : 0.51 ± 0.13 nM).

3.4. Influenza A(H1N1)pdm09 virus deep sequencing

Whole genome sequencing of influenza A was performed by NGS on the first specimen (D14) after the onset of symptoms and on a selection of the next following specimens with a possible variant selection by antiviral treatment (D40, D72, D99, D111, D115, D121, and D136).

The sequencing depth and coverage was better in specimens with a higher viral load (D14, D99, and D136 specimens; Fig. 2A) and for shorter segments (Fig. 2B). In particular, PB1 and PA segments had a low mean depth ($< 2,000\times$) at D111 and D115 (Fig. 2B). Viral genomic diversity was the greatest in the D115 specimen at the end of zanamivir treatment, especially on the NP segment (Fig. 2C). Hemagglutinin (HA) and NA segments presented the highest number of substitutions on the first D14 specimen compared to the A/South Africa/3626/2013 virus

reference strain (GISAID reference 175880) (Table 2). PB2, NP then PA and NS1 segments presented four and three substitutions respectively; PB1, NS2 and M segments were very conserved (Table 2). Within-host influenza virus genomic diversity revealed that NP, HA, PB2 and NS1 segments were the most variable (Table 3). The analysis of PB1 and PA genome segments found a limited number of mutations and two distinct deletions on PB1 segment at D136 (Table 3). Matrix segment harbored few minor polymorphisms but no amino-acid substitutions of their consensus sequence. The NA sequencing was consistent with the specific H275Y RT-qPCR with 29% of 275Y variants in specimen at D72 and only H275 variants in specimens at D111 and D115 (Table 1, Table 3). A low proportion (10.3%) of NA-E119A substitution was detected at D111 during IV zanamivir treatment (Table 3).

Table 1
Influenza A(H1N1)pdm09 analysis and phenotypic characterization of sequential specimens collected from the patient and course of antiviral therapy.

Days ^a	Specimen origin	H or Y275 NA substitution quantification ^b (log ₁₀ copies/mL of specimen)		Viral Culture result	NA activity (nMol 4Mu/h/ ^c mL) ^c	Mean IC ₅₀ ± SD (nM) ^c	
		H275	Y275(%)			oseltamivir	zanamivir
14 ^f	NPA	7.38	0	IAV	164	0.21 ± 0.11	0.32 ± 0.04
24	NS	4.84	0	IAV	117	0.26 ± 0.11	0.42 ± 0.06
35 ^d	NPA	7.71	0	IAV	124	0.22 ± 0.01	0.44 ± 0.04
40 ^{d,f}	NS	3.89	3.00 (12%)	N	ND	ND	ND
44	NS	3.04	2.66 (29%)	N	ND	ND	ND
51	NS	3.36	2.73 (19%)	IAV	88	0.63 ± 0.18	0.49 ± 0.01
58	NS	2.91	0	N	ND	ND	ND
66	NS	3.36	2.46 (11%)	N	ND	ND	ND
72 ^f	NS	4.71	4.16 (22%)	IAV	68	0.41 ± 0.15	0.81 ± 0.28
79	NS	4.16	0	IAV	76	0.81 ± 0.16	0.50 ± 0.03
86	NS	5.09	0	IAV	101	0.31 ± 0.04	0.63 ± 0.18
93	NS	3.10	0	N	ND	ND	ND
99 ^f	NPA	6.63	0	IAV	96	0.51 ± 0.10	0.60 ± 0.06
100	NPA	7.77	0	IAV	85	0.35 ± 0.11	0.57 ± 0.07
107 ^g	NPA	5.13	4.63 (24%)	N	ND	ND	ND
111 ^{d,f}	NPA	6.30	0	IAV	19	0.25 ± 0.03	0.45 ± 0.06
115 ^{d,f}	NPA	5.73	0	N	ND	ND	ND
118 ^d	NPA	5.03	3.79 (5%)	N	ND	ND	ND
121 ^{d,f}	NPA	4.95	3.93 (9%)	IAV	38	0.27 ± 0.04	0.50 ± 0.25
127	NS	0	0	N	ND	ND	ND
135	NS	3.92	0	N	ND	ND	ND
136 ^f	NPA	7.59	0	IAV	55	0.36 ± 0.18	0.43 ± 0.16
142	NS	3.12	0	IAV	ND	ND	ND
150	NS	3.47	0	N	ND	ND	ND
156	NS	0	0	N	ND	ND	ND
160	NPA	ND	ND	IAV	ND	ND	ND
163	NS	ND	ND	N	ND	ND	ND
170	NS	ND	ND	N	ND	ND	ND
177	NS	ND	ND	N	ND	ND	ND

We used reference strains for validation of the NA inhibition assays.

For A/California/07/2009 reference strain (reference for wild-type H275 NA), the mean oseltamivir IC₅₀ was 0.44 ± 0.21 nM and zanamivir IC₅₀ was 0.65 ± 0.15 nM.

For A/LyonChu/48.307/2009 isolate (reference for variant 275Y NA) (Escuret et al., 2012), the mean oseltamivir IC₅₀ was 147.87 ± 45.80 nM and zanamivir IC₅₀ was 0.52 ± 0.14 nM.

Abbreviations: Ct, cycle threshold; IC₅₀, NAI concentration able to inhibit 50% of the NA activity; IAV, Influenza A Virus; N, Negative; NA, neuraminidase; ND, not determined; NPA Naso Pharyngeal Aspirates; NS: nasal swabs; 4Mu, 4-methylumbelliferone.

Samples D184, D190, D200, D205, and D219 were not represented as influenza detection remained negative at these time points.

^a Days after beginning of influenza symptoms.

^b The quantification of the proportion of a wild type H275 NA or variant 275Y NA substitution were performed using an in house RT-qPCR. As only low proportion (< 29%) of 275Y NA substitution were detected, only wild type viruses were selected after cell culture.

^c The NA activity and IC₅₀ were determined using the MUNANA substrate as described in materials and methods section. The mean IC₅₀ ± SD of influenza A isolates are duplicates.

^d Sampled under antiviral treatment (oseltamivir).

^e Sampled under antiviral treatment (zanamivir).

^f Samples that were sequenced using NGS.

4. Discussion

The present study combines specimen whole influenza genome sequencing, clinical data, and antiviral treatment of a SCID patient infected by influenza A(H1N1)pdm09 virus.

The late SCID diagnosis led to perform the cord blood transplantation with an ongoing infection, which is known to have a poor outcome (Rivers and Gaspar, 2015). Influenza infections in immunocompromised patients require effective antiviral agents but only oseltamivir and zanamivir are available.

IV zanamivir as late add-on therapy has been described to have a limited effectiveness; however most patients were immunocompromised (Fraaij et al., 2011). In the case presented here, we observed a partial viral response with a 2 log₁₀ copies/mL decrease in seven days. This observation is consistent with a median decrease in viral load of 1.81 log₁₀ copies/mL after 2 days of IV zanamivir treatment of children (phase II assay) (Bradley et al., 2017). In previously published cases, IV zanamivir was also associated with viral load decrease although with WB cells increase and persistent lymphopenia

(Dulek et al., 2010). It was reported to be effective in stem cell transplanted teenagers; however, although IV zanamivir decreased influenza viral load, genome clearing was only observed more than 4 months later, following immune reconstitution (Ghosh et al., 2012). IV zanamivir was discontinued after the usual 15 days of treatment (Dohna-Schwake et al., 2010; Dulek et al., 2010; Gaur et al., 2010). In another clinical case, IV zanamivir was administered for a total of 34 days without notification of particular adverse events (Ghosh et al., 2012). In this situation, owing to important cholestasis on D129, the hepatotoxicity of IV zanamivir was questioned. Hepatotoxicity of IV zanamivir was hypothesized in a case of pediatric liver transplant (Dohna-Schwake et al., 2010) without any serious adverse events detected in other patients (Dulek et al., 2010; Fraaij et al., 2011). IV zanamivir in adults led to liver enzyme elevations during a Phase II evaluation (Marty et al., 2014). However no increased hepatotoxicity was noted in the IV zanamivir groups in the phase III trial in adults (Marty et al., 2017) and in the phase II trial in children (Bradley et al., 2017). In this child's history, the 14-day interval between IV zanamivir treatment discontinuation and appearance of liver injury signs suggests that

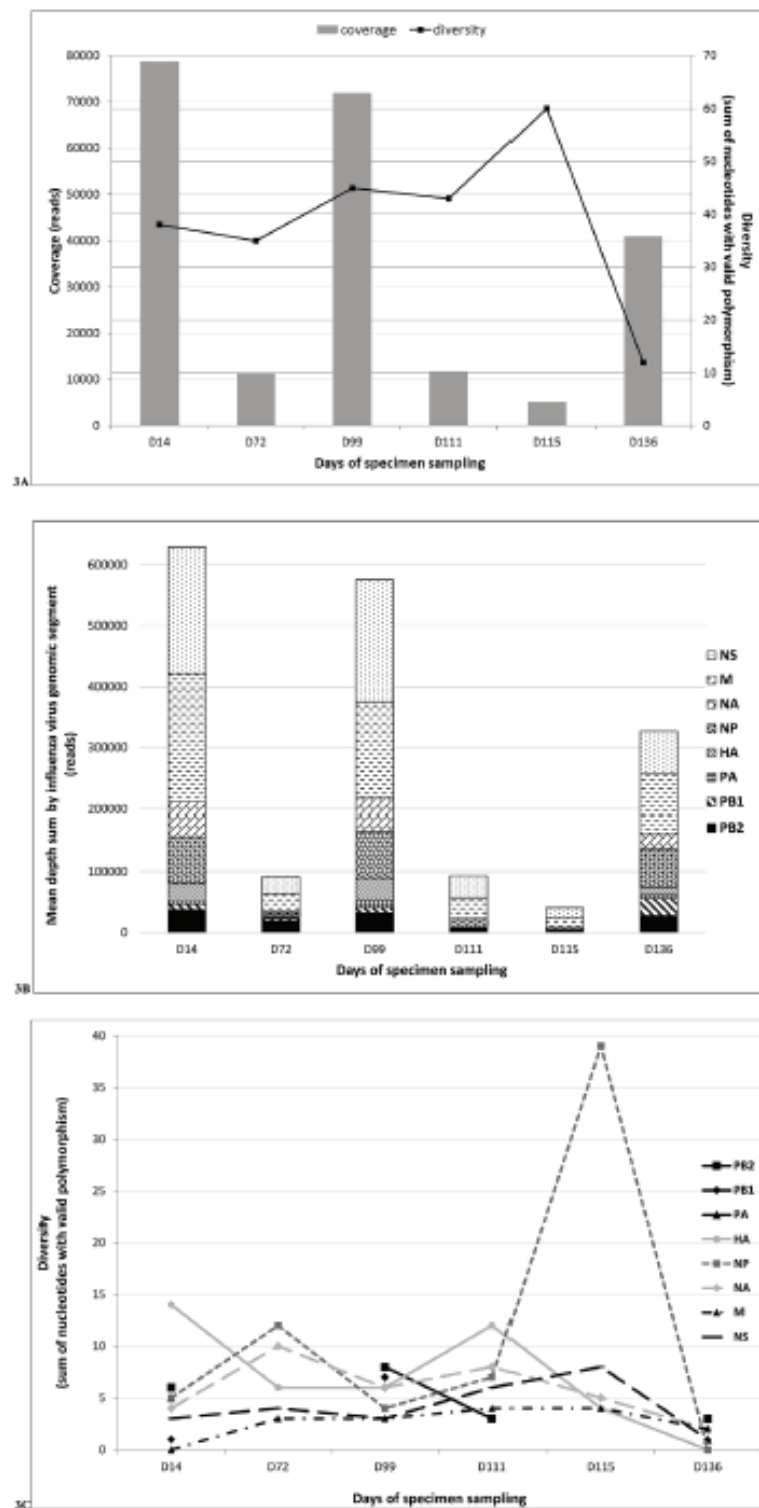


Fig. 2. Influenza viral sequence coverage and genomic diversity. (2A) Influenza viral sequence coverage and genomic diversity: viral sequence coverage corresponds to the mean number of reads obtained for influenza virus genome segments for each specimen, and global genomic diversity is the sum of nucleotides identified for all the segments with a mean depth > 2,000X. (2B) Mean depth by influenza viral genomic segment. (2C) Viral genomic diversity according to segment viral genomic diversity is the sum of nucleotides identified with a valid polymorphism on each genome segment. Only the results of diversity obtained when mean depth was > 2,000X are presented. Due to insufficient coverage, data for specimens at D40 and D121 were not presented. Results for PB2, PB1 and PA segments at D72 and D115 and for PB1 segment at D111 are not shown. Day of specimen sampling correspond to the day after beginning of influenza symptoms.

hepatotoxicity resulted from GvHD and/or from immunosuppressive drugs toxicity.

As only few antivirals were available, conventional virological techniques were sufficient to allow the influenza infection follow-up

and antiviral adaptation. However, we only had very partial information thus we performed retrospectively an NGS analysis to characterize viral genomic diversity along the course of this prolonged influenza episode. NGS allowed the study of influenza viral quasispecies, under

Table 2
Amino acid homology between the patient's first specimen and the A/South Africa/3626/2013 reference strain sequences.

Protein	Substitutions (variant %) ^a in first specimen at D14 by comparison with the A/South Africa/3626/2013
PB2	M28K (7.7%), E72D (8.9%), T102N, T129I ^b (12.7%)
PB1	R687Q
PA	R356K, D529N, K716N
HA	K119R (14.6%), E127D, H138Q, A139D (7.6%), K142R (12.6%), N162S, S183P (44.5%), A186T (11.5%), D187G (8.4%), S190I (8.6%), I216K (58.8%), E224V (36.9%), V524L
NP	G17E (37.9%), I411I ^b (8.1%), N101D, V119I (45.8%)
NA	L40I, V81I (5.3%), I85I, M242I (18.3%), G249R, N307K
M1	None
M2	None
NS1	M6R (57.5%), T76A, V178I (15.4%)
NS2	M6R (57.5%)

The A/South Africa/3626/2013 strain (GISAID sequence n° 175880) was used as a reference. For HA, the numbering system was based on the mature HA sequence, without the 17 amino acid residues of the signal peptide.

Variant populations detected by Illumina sequencing only are indicated with a ^b.

^a When a mix of wild type and variant amino acids was detected, the proportion (%) of variant substitution was indicated between parentheses.

antiviral and altered-immune pressures, crosschecked on two different platforms, which support the validity of results reported. However, differences in viral populations could be influenced by the sampling site as it was shown for NGS analysis of bronchoalveolar lavages and NS collected the same day (Trebbien et al., 2017). Moreover, the longer segments (PB2, PB1, and PA) presented a lower coverage in both techniques. This technical limitation led to an absence of conclusion as to whether large deletions were due to a technical problem or truly reflected the presence of defective interfering particles (Dimmock and Easton, 2014; Saira et al., 2013). Similarly to RSV studies, genomic diversity was shown unequally distributed along the viral genome with highly-conserved regions and highly-varying regions (Do et al., 2015). In this study, we observed variation in genomic diversity among segments, with most of the variation occurring in proteins exposed to antibody neutralization (HA or NA) but also in NP and less in M or PA segments. The high genomic diversity detected in NP may reflect a bias of selection as the coverage was the lowest for this D115 specimen (Fig. 2A). Viral genomic diversity seemed to increase concomitantly with selection by immunity and lymphocytes recovery after cord blood allograft or by antiviral treatment, as previously reported for RSV infection in an SCID patient (Grad et al., 2014). We did not detect the D222G substitution in HA known to be associated to illness severity (Casalegno et al., 2014; Goka et al., 2014). Severe respiratory distress was concomitant with partial immune reconstitution leading to inflammation; viral clearance was observed only when lymphocytes increased (Gooskens et al., 2016).

NGS allowed a better characterization of influenza variants selected by antiviral treatment. The NA-H275Y substitution is the most frequently encountered in NI, under oseltamivir pressure, despite lowering viral fitness (Abed et al., 2014). These data are consistent with the present study where NA 275Y variants were repeatedly detected only as a minority under antiviral pressure; corresponding influenza virus isolates were oseltamivir-sensitive suggesting that NA 275Y variants were outcompeted by wild-type viruses. Our results were consistent for specimens tested both with RT-qPCR and NGS. Our results are consistent with previous studies demonstrating that 275Y variants were present at concentration below the threshold value in first specimens and were selected by oseltamivir treatment (Ghedini et al., 2011, 2012). *In vitro* studies suggested that oseltamivir could expand diversification of influenza virus by facilitating accumulation of virions in intercellular spaces (Mori et al., 2015). This accumulation allows cell-to-cell transmission and co-infection between defective and helper viruses (Mori

et al., 2015). In the case presented herein we could not ascertain whether oseltamivir treatment could increase viral genomic diversity, as coverage was insufficient for specimens at D40 and D121 (sampled just after the end or during oseltamivir treatment). However, as discussed above, oseltamivir was responsible for selection of oseltamivir-resistant variants and then for evolution of viral genomic diversity.

In the present case, NGS allowed E119A minor variants detection under zanamivir selection. The emergence of substitutions E119G and E119D in NI have been described in two cases of very immunocompromised patients under IV zanamivir treatment (L'Huillier et al., 2015; Tamura et al., 2015). Mainly mixes of E119G and E119D substitution were detected but E119A was also detected in one specimen at a very low percent (0.5%) (L'Huillier et al., 2015). *In vitro*, seasonal A(H1N1) influenza viruses bearing a NA-E119A substitution were selected with laninamivir (Samson et al., 2014). A recombinant A(H1N1)pdm09 virus harboring a NA-E119A substitution exhibited a 90- and 17-fold increase in zanamivir and oseltamivir IC₅₀ respectively and a reduced NA activity (36% compared to wild type NA) (Samson et al., 2014).

5. Conclusions

To conclude, the present report demonstrated that NGS is particularly relevant in specific situations, as major immune defects, where minor viral variants could reveal a risk of antiviral efficacy loss. However, to modify clinical management of influenza infection in immunocompromised patients, the use of NGS would need implementation of bioinformatics pipelines and softwares to obtain results rapidly and the development of alternative efficient antiviral agents against influenza.

Funding information

This study was performed in the field of the global surveillance of the susceptibility of influenza viruses to antiviral agents (performed by WHO and by the Centre National de Référence des virus des infections respiratoires supported by Santé Publique France (SPF) in France).

Transparency declarations

(1) Conflict of interest

M.P. received a travel grant from Theradiag and Hologic to attend the ESCV 2017 and 2018 Conférences.

A.G. received a travel grant from Cobas to attend the RICAI 2017 Conference.

M.V. received a grant from Medical Wire to attend the ECCMID 2017 Congress.

B.L. is the co-Chair of the Global Influenza Initiative, a member of the scientific committee of the Global Hospital Influenza Surveillance Network, a member of the Foundation for Influenza. He received a travel grant from Alere to attend the RICAI 2017 Conference, and a travel Grant from Seegene to attend the ECCMID conference in 2017. All personal remuneration stopped in September 2010.

L.J. served on the French Advisory Board for SANOFI on the 'Quadrivalent Influenza Vaccine' in 2017.

V.E. received a travel grant from Roche Pharmaceuticals to attend the Fourth ESWI Conference and declares potential conflict of interests with Sanofi-Pasteur (intervention in symposia in 2013).

All other authors C.P., B.S., C.R., B.M., C.M., G.M., F.M.S., E.J., G.M. have no conflicts of interest to declare.

(2) This work has not been presented in any meeting.

Acknowledgements

We thank Gwendolyne Burfin (Centre National de Référence des virus des infections respiratoires), for her technical assistance and development

Table 3
Amino acid homology between the first and subsequent specimens sequences.

Protein	Substitutions (variant%) ^a in subsequent specimens compared to first specimen at D14					
	specimen at D72	specimen at D99	specimen at D111	specimen at D115	specimen at D136	
PB2	NI	T16P (7.0%)	T129I* (57.5%)	NI	V89M	
		T129I* (71.4%)				
		Y704H (12.9%)	1716R (5.3%)			
		A722T (10.4%) L725P (30.3%)	1725P (6.7%) NI			
PB1	NI	E297D (17.7%)	NI	NI	K11X (56.6%) (2nt)	
		E237K (41.6%)				E237K (59.0%)
PA HA	NI	V19L (11.1%) K142R* (54.0%) S183P* A186T* (55.0%)	K142R* (84.3%) S183P* (84.9%) A186T* (84.2%) I216K (86.2%) E224V (12.0%) V250A (7.3%)	K142R* S183P* A186T*	K142R* S183P* A186T*	
		NP	V119I* (88.8%)	G17E* (94.2%) I41T* (6.7%)	G17E* (74.1%)	I460V (8.0%) G17E* (76.6%) G34D (5.4%) I41T* (63.1%) I109V ^b (6.6%) V119I* (21.9%) A286S* (19.7%)
A286S* (25.4%)	A286S* (40.9%) R293K ^b (8.1%)			R384G (19.0%) K400R (19.7%) I406T (6.9%)	A286S*	
S482N ^b (6.7%) G96E (7.2%)	N50S ^b (5.8%)					
M242I* (19.3%)	M242I* (42.6%)			E119A (10.3%) M242I* (29.8%)	M242I* (81.5%)	N270K
M1 M2	None V68M (5.1%)	None None	None None	None None	F62V (62.4%)	
						H275Y (29.1%)
NS1	M6R* (30.6%)	None	M6R* (9.8%) M106V (15.6%) I111T (8.8%)	S82N ^b (6.8%) M6R* (66.7%) I90L ^b (5.7%) Q109K (8.9%)	S82N	
			V157I (6.7%)			
			V178I* (58.9%) M6R* (30.6%)	V178I* (81.1%) M6R* (9.8%)	V178I* (25.2%) M6R* (66.7%) S29N ^b (6.4%)	V178I*
			M83I (6.9%)			K64E (5.4%)

We considered only the result obtained for segments with a mean depth > 2000 X. Due to insufficient coverage, data for specimens at D40 and D121 were not presented. For HA, the numbering system was based on the mature HA sequence, without the 17 amino acid residues of the signal peptide.

Specimen at D72 was a NS. Other specimens at D99, D111, D115 and D136 were NPA.

Variant populations detected in first specimen at D14 by comparison with A/South Africa/3626/2013 reference strain but with various proportions in subsequent specimens are indicated with *.

Variant populations detected by Illumina sequencing only are indicated with a ^b.

Deletions of two nucleotides and one nucleotide detected in PB1 segment at D136 were responsible for amino acid deletions K11X and K744X respectively.

Abbreviations: D, Day; NI, not interpretable; NPA, nasopharyngeal aspirate.

^a The proportion (%) of variant substitution was indicated between parentheses.

of H275Y RTqPCR and Rémi Fanget for his valuable help on viral culture and IC₅₀ determination. We want to thank as well Philip Robinson (DRCI, Hospices Civils de Lyon) for his valuable help in manuscript preparation.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://>

doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.10.009.

References

- Abed, Y., Pizzorno, A., Bouhy, X., Béraud, C., Boivin, G., 2014. Impact of potential permissive neuraminidase mutations on viral fitness of the H275Y oseltamivir-resistant influenza A(H1N1)pdm09 virus in vitro, in mice and in ferrets. *J. Virol.* 88, 1652–1658.
- Baz, M., Abed, Y., McDonald, J., Boivin, G., 2006. Characterization of multidrug-resistant

Partie C. Conclusion

1. Propos général

Avec l'émergence des technologies de séquençage à haut débit, il est devenu évident que la simple caractérisation d'un pathogène comme le virus *Influenza*, aussi précise soit-elle, n'est pas suffisante. Ne prenant en compte que le pathogène responsable ou suspecté comme tel, Robert Koch, dès la fin du XIX^e siècle, a établi le postulat qui classiquement porte son nom (« Postulat de Koch ») afin d'établir la causalité entre infection et pathogène. Avec l'émergence des technologies de biologie moléculaire à la fin du XX^e siècle, la caractérisation de gènes de virulence présents chez certains individus d'une population microbienne a fait évoluer ce postulat. Le lien « pathogène – maladie » devenant un lien « gène de virulence – maladie » le postulat devient ce qui pouvait être qualifié de « Postulat moléculaire de Koch ». Enfin, avec l'émergence de technologies permettant de générer une quantité très importante de donnée en un temps court, il fut séduisant de vouloir pousser ce postulat aux limites de sa finesse. Ainsi, le postulat a évolué de nouveau, l'intégralité de l'organisme hôte de la maladie infectieuse étant prise en considération, étant considéré comme un écosystème. La maladie, quel que soit son origine, et particulièrement en cas de maladie infectieuse, étant principalement due à une dysbiose de la niche écologique considérée, le postulat évolua pour se dénommer « Postulat écologique de Koch ». Ce travail de thèse, bien que ne comportant que l'analyse des populations virales et bactériennes dans le cadre d'étude de la santé humaine, soutient l'idée d'élargir le paradigme de prise en charge des pathologies infectieuses. Ce paradigme classiquement concentré sur l'immunité de l'hôte et l'élimination du pathogène, pourrait donc se voir évoluer en profitant de ce qui pourrait être caractérisé comme un « Postulat intégratif de Koch ».

Dans ce contexte, ce travail n'est que le début d'une conception plus grande de la prise en charge des maladies infectieuses et de toute pathologies par la prise en compte des individus, quel que soit leur nature, comme étant et faisant parti d'une population plus large.

2. Le microbiome respiratoire dans la maladie grippale : impact et prise en compte

L'amélioration du pronostic et du traitement des complications de la maladie grippale nécessite une compréhension globale approfondie de cette maladie. La sévérité des pathologies infectieuses est donc la résultante d'interactions complexes entre le pathogène, son environnement et l'hôte infecté. Ces interactions doivent être appréhendées comme faisant partie d'un « tout » dont les caractéristiques sont plus importantes que la somme de chacune d'entre elles (208). À ce titre le microbiome était encore un facteur faiblement pris en compte, un « parent pauvre » devant revendiquer son importance dans les modèle de pathogénie du virus grippal, appartenant à plus d'un titre à son environnement (209,210).

La survenue des complications de grippe ainsi que leurs pathogénies restent imprévisibles, particulièrement en termes de gradation de sévérité. C'est pourquoi l'identification précoce des patients à risque de complication est cruciale pour la prise en charge, et donc la survie des patients concernés. Du fait du temps que nécessite leur recherche, aucun marqueur biologique ou radiologique de l'hôte n'est aisément, et avec des performances satisfaisantes, disponible pour prédire cette évolution au cours de l'évolution clinique.

Dans ce contexte, le premier travail de ce manuscrit a consisté en la caractérisation et la détermination de l'utilisation, dans un contexte clinique du microbiome comme signature pronostique de la maladie grippale. En comparant les abondances relatives des chaque OTU et en quantifiant la diversité globale du microbiome respiratoire au moment de l'inclusion, nous avons pu identifier des profils bactériens permettant de discriminer les enfants en fonction de leur devenir clinique. Les index de diversité ont en effet montré une différence entre ces deux groupes cliniques, comme revu dans (211). Au moment de la publication de ce travail, il s'agissait de la première étude étudiant l'association entre sévérité grippale et composition du microbiome respiratoire chez l'enfant.

2.1. Microbiome respiratoire et population pédiatrique : une preuve de concept

Les études commencent à décrire la composition du microbiome respiratoire des enfants « sains » comme des enfants malades. Certaines études ont, par exemple, pu montrer que, chez l'enfant de moins de deux ans en bon état de santé, le tractus respiratoire supérieur est principalement colonisé par l'un des genres commensaux suivant *Moraxella*, *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Dolosigranulum*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Flavobacteria* ou *Neisseria* (104,212–214). Ces descriptions renforcent les qualités méthodologiques de notre travail, car nous avons retrouvés quatre de ces genres (*Moraxella*, *Streptococcus*, *Haemophilus* et *Staphylococcus*) comme étant dominants chez les enfants étudiés. Néanmoins, aucune espèce de bactérie à Gram positif n'a été retrouvée dominante, possiblement par une diminution de cette abondance par la simple présence du virus grippal et indépendamment de toute considération d'évolution clinique. Néanmoins, nous avons pu retrouver la dominance de *Staphylococcus aureus* comme « protecteur » au niveau du nasopharynx. Cette dominance est protectrice au niveau du tractus respiratoire haut, les surinfections pulmonaires (donc du tractus respiratoire bas) étant associées, de fait, à une évolution plus sévère. Il a par ailleurs déjà été montré que la présence de bactéries à Gram positif était associée à un contrôle de la colonisation par des germes associés à un sur-risque d'otite moyenne, de bronchiolite, ou même de pneumonie (214–216). Le genre dominant le plus fréquemment retrouvé dans notre population était *Moraxella*, avec deux principales espèces retrouvées (*Moraxella catarrhalis* et *Moraxella nonliquefaciens*). La présence de cette dernière a été déjà associée à une prévalence augmentée des pneumonies virales à *Adenovirus*, *Rhinovirus*, *Enterovirus* ainsi qu'aux infections à MPV ou VRS (213). Dans ce dernier cas, la présence de *Moraxella nonliquefaciens* était associée à un sur-risque de complication comparativement à la colonisation par *Alloiococcus* (104). Du fait

de l'absence, pour des considérations éthiques, de prélèvements issus de patients strictement sains, il nous a été impossible de déterminer si la colonisation à *Moraxella* était associée à l'infection virale mais nous avons pu montrer que ni *Moraxella catarrhalis* ni *Moraxella nonliquefaciens* ne sont prédictives de l'évolution clinique, en prenant en compte les covariables d'ajustement.

Dans notre étude, les infections grippales sévères peuvent être prédites par une augmentation de la diversité des microbiomes respiratoires mais aussi une signature préférentielle de douze OTU, et ce, avant survenue de complications. Huit de ces OTU étaient surreprésentées chez les patients sévères comparativement aux patients sains (*Prevotella*, *Streptobacillus*, *Porphyromonas*, *Granulicatella*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Lachnospiracea* et *Haemophilus* spp.). À l'exception de ce dernier, ces genres contiennent exclusivement des bactéries anaérobies (facultatifs ou non). *Prevotella* et *Veillonella* sont des genres bactériens dont certains représentants, à Gram négatif, sont présents de façon usuelle dans la sphère oropharyngée ainsi que dans la sphère respiratoire (217,218). Ils ont aussi été associés à des infections pulmonaires anaérobies, des méningites et des endocardites (217,219). *Granulicatella*, faisant partie des *Streptococcae* à culture difficile présents dans la flore oropharyngée, a aussi été associé à des endocardites et des septicémies (220). Seul un des OTU présent dans la signature retrouvée était préférentiellement abondant chez les patients aux formes bénignes, à savoir *Staphylococcus aureus*. Cette constatation est concordante avec les publications de Wang *et al.* qui ont montré dans un modèle murin que cette bactérie limitait les altérations pulmonaires liées au virus *Influenza*, par polarisation des macrophages alvéolaires vers un profil moins destructeur (phénotype M2). *In fine*, cette modification limite l'inflammation, souvent responsable de la létalité (125). Sur la base de notre étude pilote, l'abondance augmentée de *Staphylococcus aureus* dans les prélèvements des patients aux formes bénignes peut donc expliquer

la plus faible prévalence de manifestation clinique, alors que les microbiomes présentant une plus grande abondance de pathobiontes présentent une prévalence augmentée de complications.

De plus, nous avons comparé chacun des deux groupes sévères (complications neurologiques et respiratoires). Sept OTU sont différemment abondants dans ces deux groupes. Deux sont plus abondants dans le groupe respiratoire (*Moraxella catarrhalis* et *Parvimonas micra*) alors que cinq d'entre eux sont plus abondant dans le groupe neurologique (*Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Dolosigranulum pigrum*, *Chryseobacterium* et *Prevotella*). Physiologiquement, ces bactéries sont présentes de façon commensale dans la sphère respiratoire et oropharyngée. Principalement décrites dans les pneumonies et les parodontites, ces bactéries peuvent aussi être responsable d'infection ostéoarticulaire et d'endocardite (221–223). De façon intéressante, *Dolosigranulum pigrum*, associé au développement de kérato-conjonctivite, a été retrouvé dans le microbiome respiratoire de communauté bien portante (191). À noter que cette analyse manquait probablement de puissance, au vu du faible nombre de patients dans chacun des groupes sévères (218). Il est à noter que la prédiction par la signature microbienne peut être réduite à seulement deux ou trois OTU, permettant le développement d'une PCR associant diagnostic et pronostic par un panel quantifiant à la fois bactérie et virus.

Alors que notre étude était, à notre connaissance, la première étudiant l'association d'un microbiome respiratoire pathologique et du virus *Influenza*, de nombreuses études sont maintenant publiées sur l'association bronchiolite et microbiote respiratoire. Si *Staphylococcus aureus* est plus abondant chez les enfants sains (corrélation négative à la sévérité), l'association du genre *Streptococcus* aux VRS, de même que l'association des *Moraxella* et *Haemophilus* aux *Rhinovirus* a clairement montré une augmentation de la sévérité des bronchiolites qui sont ainsi provoqués (224). Une autre étude a retrouvé

une plus grande abondance d'*Haemophilus* chez les enfants infectés par le VRS comparativement à des patients sains ou guéris, sans association à la sévérité, et ce malgré une modification marquée de la réponse immunitaire (225).

Du fait de sa nature rétrospective, cette étude présentait quelques limitations. Tout d'abord, malgré un nombre important d'échantillons disponible au screening (n=372), moins de 10% (n=36 ; 9.7%) remplissaient tous nos critères d'inclusion et d'exclusion, empêchant un appariement par âge et sexe pouvant être pertinent. Ces deux paramètres étant déjà décrits comme des facteurs impactant de façon importante le microbiome du nasopharynx nous avons réalisé des analyses multivariées prenant en compte ces covariables (104,212). Nous avons ainsi retrouvé l'âge comme facteur majeur impactant le microbiome. Le sexe en revanche n'impacte pas, comme attendu, les enfants prépubères. De plus, si le microbiome a déjà été décrit comme variant avec les saisons, dans notre étude les périodes de collecte des prélèvements étaient globalement superposables d'année en année, limitant l'impact d'un tel effet (212). Enfin, du fait de la nature rétrospective de cette étude pilote, aucune comparaison de performances n'a pu être réalisée avec les scores cliniques de diversité déjà décrits (PRISM III par exemple). À noter par ailleurs que la différence de nombre de patients aux formes sévères neurologiques et respiratoires (10 *versus* 4) peut s'expliquer par l'administration rapide d'antibiotique pré-hospitalière, excluant les patients de l'analyse. Par comparaison, les patients aux formes neurologiques ont reçu des antibiotiques, au cours de l'hospitalisation, après prélèvement, l'urgence thérapeutique étant plutôt au traitement antiépileptique.

2.2. Microbiome respiratoire et population adulte : une standardisation complexe

L'étude du microbiome respiratoire est une étude de complexité plus élevée que son équivalent sur une population pédiatrique. En effet, si la standardisation (et donc

la comparabilité) de patients est aisément envisageable, il reste difficile de prouver qu'une population adulte étudiée est parfaitement comparable entre elle, devant le nombre de facteur confondant entrant en ligne de compte.

Dans ce contexte, notre travail a nécessité d'être extrêmement sévères quant aux critères d'inclusions, justifiant la petite taille de la cohorte (bien que deux fois plus importante que la cohorte pédiatrique) en partant d'une population éligible de plus de 2 000 patients potentiels. Nécessitant d'être pour partie à nouveau séquencés pour compenser un déficit de profondeur, certains résultats sont déjà exploitables. Sur la moitié des échantillons suffisamment séquencés, la diversité était retrouvée, comme sur la population pédiatrique, associée aux conséquences de la maladie grippale et à la catégorie d'âge du patient.

Les respirotypes des patients analysés a permis de retrouver les profils dominants les échantillons pédiatriques, trois autres profils étant dominés par *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium* et *Pseudomonas* sp. Il est intéressant de constater qu'à l'exception de ce dernier, connu pour donner des infections respiratoires pouvant être sévères, les autres sont des germes connus pour coloniser la surface cutanée et certains respirotypes. Ces résultats suggèrent une continuité tractus respiratoire - peau ou une colonisation des prélèvements. Il a par ailleurs pu être montré que ces bactéries ont un effet immunomodulateur ou inflammatoire, bien décrits dans l'acné mais aussi dans les maladies néoplasiques (226)

Les OTU retrouvés différemment abondants entre les formes bénignes et sévères étaient moins nombreux que dans le cadre de la population pédiatrique. Un genre bactérien était toutefois retrouvé à savoir *Veillonella* sp. Les autres espèces bactériennes, *Turicella* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum* étaient principalement retrouvées

dans le cadre d'infection ORL, otite et pharyngite, mais aussi dans les abcédations plus profondes (227,228).

2.3. Futures études à mettre en place dans le cadre de l'étude du microbiome respiratoire grippal

Une future étude devra prévoir le prélèvement prospectif de patients admis au service d'accueil des urgences. Cette étude, coordonnée par notre équipe depuis la saison 2017-2018 en multicentrique inter-régional (PHRC BMiG) permettra de valider les signatures pédiatriques (et adultes dans un second temps) déterminées par les études rétrospectives, ainsi que leur applicabilité en routine clinique. Par ailleurs, une validation de l'évolution longitudinale des microbiomes respiratoires semble nécessaire, l'étude de la résilience de ceux-ci pouvant apporter des informations non apportées au temps initial. Dans ce travail de thèse, il n'a pu être complété la validation, au sens industriel, de l'utilisation de la signature microbienne dans le cadre de la prise en charge clinique des patients.

Comme rappelé dans l'étude bibliographique du présent travail, une approche intégrative, comportant l'analyse de l'ensemble des intervenants de l'interaction microbiome viral et bactérien – virus – hôte seront aussi à compléter (Protocole ViBraFlu, thèse en cours de Marina Sabatier, équipe VirPath). Ces études, associées à des études mécanistiques, sont aussi nécessaires pour déterminer l'influence du microbiome respiratoire, par ses interactions avec le virus, sur les conséquences cliniques de l'infection virale. Ces études sont un prérequis indispensable au développement de thérapies innovantes impactant ces paramètres.

Enfin, il est nécessaire de prendre en compte les interactions à distance des microbiomes extra-respiratoires avec le système immunitaire. En effet, ces microbiomes (principalement le microbiome digestif), bien qu'à distance de la niche écologique que représente le tractus

respiratoire, modulent fortement la réponse antivirale contre la grippe. Il a par exemple été montré, dans un modèle murin, que la présence de *Clostridium orbiscindens* (appartenant au microbiote bactérien intestinal) produit de la désaminotyrosine, augmentant la réponse antivirale et diminuant les atteintes respiratoires liées à la grippe (229).

3. Diversité génomique virale : impact d'un marqueur viral intrinsèque

3.1. Technologies de PCR digitale et quantification des sous-populations résistantes

La PCR digitale est actuellement principalement utilisée dans le cadre de détection et/ou de quantification de variant en biologie moléculaire humaine. L'utilisation de cette technologie dans le domaine de la microbiologie, et plus particulièrement de la virologie, est plus restreinte mais explose depuis la démocratisation de cette technologie (détection et quantification de provirus sanguin comme le VIH ou HTLV, de virus à contamination entérique comme les *Norovirus*, *Adenovirus* ou virus de l'hépatite B, de virus respiratoires comme le VRS, d'*Arbovirus* comme le *Zikavirus* ou le virus de la dengue, de virus épithéliotropes comme le *Papillomavirus* ou les *Polyomavirus*, ...)(230–238)

À notre connaissance, l'étude présentée dans ce travail était la première à comparer les performances de la RT-qPCR, de la RT-ddPCR et de la quantification par NGS (considérée comme le gold standard de quantification des SNV) dans le domaine de la recherche sur les virus grippaux.

Contrairement à l'annonce faite par les constructeurs, le transfert de technique vers la PCR digitale nécessite la mise en place d'optimisation (63). Ceci fait, cette méthode permet une quantification simple et absolue, dans le cas des échantillons comportant de 1 à 100 000 copies par échantillon (60). Ainsi la saturation du système est

l'un des principaux inconvénients observés avec la PCR digitale, limitant son utilisation en diagnostic direct. Le dépassement de ce seuil entraîne l'impossibilité pour le système de distinguer gouttelettes positives et négatives, comme c'était le cas pour les échantillons au Ct inférieur à 23 qui ont dû être dilués. Ainsi, pour ne pas dépasser ce seuil de concentration, une qPCR évaluant la charge virale est indispensable.

Une autre difficulté soulevée par cette étude concernait la discrimination insuffisante entre les « groupes de gouttelette » et ce, particulièrement dans les échantillons à faible charge virale (patient en cours de traitement par exemple) ou dans le cadre de protocole non optimisé. Certains logiciels bio-informatiques, comme « definetherain » pourraient être utilisés pour classer les gouttelettes ambiguës, limitant ainsi le nombre de faux positifs, même si aucun n'est complètement intégré dans les logiciels utilisateurs (239). Ces outils bio-informatiques restent néanmoins adaptés pour les expérimentations utilisant du SyberGreen, mais non pas pour les sondes TaqMan. Il est donc nécessaire d'optimiser ce logiciel pour faire face à toutes situations, et limiter l'interprétation subjective du seuil de discrimination, avant d'envisager une utilisation en pratique clinique en infectiologie.

Un des avantages majeurs de la PCR digitale reste sa sensibilité et sa précision dans la détection des cibles minoritaires, comparativement aux RT-qPCR (156). Si la limite de détection est de 10% pour la qPCR, elle est de 0.5% pour la digitale PCR. Le seuil de quantification fiable est plus élevé mais reste en faveur de la PCR digitale (1.82% pour la détection de la sous-population résistante et 3.57% pour la sous population sensible contre 25% et 50% pour la qPCR). Par ailleurs, là où les technologies de PCR ont détecté seulement une population résistante ou seulement une population sauvage, le NGS a détecté un mélange de populations suggérant, en excluant la possibilité d'un artefact technique, la présence de population résistante à bas bruit avant traitement, ou la persistance de population sensible sous traitement. Cette observation aurait pu permettre de prédire la réponse thérapeutique de

ce patient aux traitements antiviraux (156). À noter que la persistance de sous populations résistantes est limitée par le coût évolutif de ces virus, mais que cette substitution reste fréquemment sélectionnée chez les patients immunodéprimés aux excréctions longues (155). Ainsi, dans le cadre de la recherche des pathogènes à faible charge, ou de variants minoritaires, la PCR digitale reste d'un apport considérable (238). Néanmoins, le bénéfice à profiter d'une détection à sensibilité si importante reste à valider en pratique de routine. En effet, si les techniques usuelles comme le pyroséquençage ou les RT-qPCR ne permettent pas la détection des sous-populations inférieures à 10%, ce seuil reste un seuil suffisant, l'adaptation thérapeutique n'étant recommandé que dans le cadre de modifications phénotypiques de l'antibiogramme (63,240).

Dans cette étude, les résultats de séquences autant en termes de faisabilité (exclusion des échantillons au Ct supérieur à 27 par RT-qPCR) que de diversité observée (associée à la diversité analysée) ont pu être impactés par la charge virale initiale. Cette limite peut aisément être dépassée par l'utilisation d'une plateforme de séquençage plus efficiente, comme les plateformes Illumina (NextSeq500, MiSeq ou HiSeq), ou en limitant le multiplexage des librairies séquencées. Bien que ces solutions augmentent considérablement le coût des expérimentations, les études de ce travail de thèse ont montré l'efficacité de ces mêmes protocoles aux Ct supérieurs à 27 (241). Par ailleurs, et malgré ces considérations, cette première étude a montré une détection jusqu'à 1% des variants minoritaires. Il faut néanmoins garder à l'esprit que ces populations sont possiblement des artefacts techniques introduits par la PCR ou le séquençage et qu'à l'inverse de la NGS, les techniques de PCR (digitale ou non) ne sont capables de détecter qu'une mutation précise.

Au vu de l'étude présentée dans le présent travail, la PCR digitale est un outil intéressant, suffisamment précis pour établir une quantification fiable des variants minoritaires dans le cadre de mutation ponctuelle, comme dans le cas des substitutions H275Y

de la neuraminidase. Toutefois, le bénéfice des performances de détection précoces de ces sous-populations minoritaires ne pourra être clairement établi qu'une fois des thérapeutiques de remplacement disponibles et efficaces, déstabilisant ou stabilisant par exemple la diversification génomique virale. Les performances bien plus importantes de cette nouvelle méthode de biologie moléculaire peuvent cependant être d'un grand intérêt pour détecter les variants minoritaires associés à la sévérité de la maladie comme retrouvés dans le cadre d'une étude décrite ci-après.

3.2. La diversité initiale du génome viral : description précise dans le cadre d'une excrétion longue de l'immunodéprimé

Dans cette étude longitudinale d'un cas unique de patient immunodéprimé du fait de son DICS, la transplantation a conduit à son décès, comme décrite dans le cadre des greffes de patients infectés (242). L'histoire clinique de ce patient permet d'insister sur la nécessité de prise en charge optimale de ces patients chez qui un traitement antiviral efficace est nécessaire, même si seul l'oseltamivir est actuellement disponible.

Nous avons pu montrer que le NGS permet une caractérisation précise des variants viraux sélectionnés par les traitements antiviraux, les résultats obtenus étant validés par leur concordance sur deux plateformes complémentaires. Comme décrit précédemment, la mutation H275Y de la neuraminidase émerge sous pression thérapeutique et ce, malgré une perte de fitness viral parfaitement décrite (243). Cette notion est donc concordante avec l'étude de cette excrétion longue, où, en absence de traitement, les variants résistants sont supplantés par les variants sauvages ainsi qu'avec les études détectant les virus résistants à bas bruit dès les premiers prélèvements avant toute évolution thérapeutique (155,156). Dans ces études comme dans la nôtre (même si aucune preuve robuste n'a pu être établie à coups sûr du fait d'un défaut de profondeur), l'oseltamivir pourrait agir en augmentant la diversification virale par accumulation des virions dans les espaces péricellulaires (244).

La transmission s'y fait donc de proche en proche, avec une interaction des virus « normaux » avec des virus « aidants » et des virus « défectifs » au génome incomplet (244). À noter néanmoins que l'absence de couverture homogène suffisante dans notre étude a empêché de conclure quant à la présence de particules interférentes défectives (245,246). Il aurait pu être intéressant de vérifier si la présence de ces particules conduisait à des cas plus sévères ou non. En effet une étude de 2017 a pu identifier une mutation de la polymérase des virus *Influenza A* chez des patients aux formes sévères, dont l'introduction dans des virus de génomique inverse réduit le taux de ces particules. Cette mutation, associé à une diminution des interférences était liés à des formes sévères respiratoires (247).

Les différences observées d'identification des populations résistantes peuvent aussi avoir été influencées par le site de prélèvements comme montré dans une étude comparant LBA et NG (248). Une différence de diversité entre les tractus respiratoires hauts et bas, ayant été suggérée par une étude dédiée de ce travail de thèse (n'ayant pas pu être contributive par défaut de recrutement) même si non retrouvées sur les autres études de ce travail, il est licite d'anticiper que cette différence de diversité serait associée à une présence de variant résistant ou de plus virulent. Néanmoins, cette étude n'a pas permis la détection des substitutions D222G de la neuraminidase connues comme associé à la sévérité de la maladie (249,250).

Enfin, comme pour les études sur le VRS, la diversité génomique virale semble hétérogénéiquement répartie le long du génome viral, avec une alternance de régions hautement conservées ou hautement variantes (196). La diversité chez ce patient était observée principalement sur les coordonnées codants les épitopes (HA ou NA) mais aussi sur le segment codant NP (et moins sur les segments codants M ou PA). Cette majoration de diversité sur le segment codant NP peut donc être le reflet d'un biais analytique, la couverture étant le plus faible pour l'un des échantillons. Il a néanmoins été décrit une diversité importante dans les régions non-antigéniques des virus respiratoires.

Cette description chez les virus H3N2 est à associer à un avantage sélectif de mutation de ces segments supportant l'évolution de ces virus (251). Nos données supportent donc l'intérêt de surveiller les segments non-HA et non-NA dans l'épidémiologie des virus *Influenza*. Enfin, cette diversité génomique virale augmente lors de la restauration immunitaire après greffe, comme cela avait été rapporté pour le VRS chez un patient au facteur de risque similaire (172).

En conclusion de cette partie, cette étude a montré que le NGS pouvait être intéressant dans les situations particulières comme les altérations immunitaires, là où les variants minoritaires représentent un risque d'échec thérapeutique. Néanmoins à l'heure actuelle, malgré les performances de détection de très faibles populations virales minoritaires, le défaut de processus efficient d'analyse informatique ainsi que le développement d'antiviraux ne ciblant pas les protéines antigéniques semblent être un besoin majeur. Ainsi et du fait de l'absence d'alternative thérapeutique fiable, les techniques conventionnelles de détection des variants résistants restent suffisantes à l'heure actuelle. La détection des variants présentant une virulence augmentée reste néanmoins un enjeu majeur de biologie moléculaire, permettant d'orienter précocement un patient en fonction de son devenir clinique potentiel.

3.3. La diversification génomique virale : un paramètre de virulence ?

Après un premier cas d'étude de la diversification des virus grippaux dans le cadre d'un patient immunodéprimé, cette étude était la première, à notre connaissance, à décrire la diversification du virus *Influenza* au cours de l'évolution clinique des patients immunocompétents, au moyen de séquençage profond.

En effet, avant l'émergence du NGS, le séquençage par méthode de Sanger ne permettait pas une caractérisation si précise des populations virales, et particulièrement

des sous-populations minoritaires, du fait d'absence de considération pour les bases non majoritaires (252–254). En effet, le NGS produisant de nombreuses gigabases en un simple run de séquençage et du fait de la relative brièveté du génome du virus *Influenza* (~13.5 kb), la couverture et la profondeur obtenue satisfont pleinement à cette problématique (255). Toutefois, la nature segmentée de ce génome rend difficile une couverture à profondeur suffisamment homogène pour permettre une analyse comparative satisfaisante de chacun des huit segments. Dans le cadre de cette problématique et pour s'affranchir des possibles biais expérimentaux, (introduits à la fois pendant la (RT-)PCR, le séquençage en lui-même mais aussi pendant les analyses informatiques), l'utilisation de contrôles de qualité validés est un élément crucial à mettre en place pour valider le processus (pré-) analytique (256). L'étude présentée dans ces travaux de thèse propose l'utilisation de contrôles de qualité adaptés à la validation de la comparaison intra- et inter-run des diversités virales dans le cadre d'études de quantification/caractérisation des variants minoritaires. Au moyen de dix mélanges de plasmides caractérisés, toutes les mutations attendues étaient retrouvées avec un seuil de fréquence de 5% pour l'appel de variant. Une approche similaire, utilisant seulement deux plasmides différents mais ne prenant pas en compte la notion de biais de brins, avait validé un seuil de 2% (257,258). Par précaution, nous avons remonté le seuil et ce, même si aucune différence supplémentaire n'avait été retrouvé à 1%, dans l'étude de diversification de la diversité. De plus et contrairement à une autre approche déjà publiée, l'utilisation de plasmide est une méthode d'évaluation des performances des études de diversité encore plus robuste que l'utilisation de virus de plages de lyse (259). Les plasmides étant exempts de mutations non attendues, un seuil de fausse positivité peut donc être anticipé et donc pris en compte.

Comme indiqué précédemment, les différences observées entre les échantillons restaient identiques, séparément du filtre de fréquence appliqué, dans cette étude de diversification.

Le filtre étant inversement relié à la profondeur de séquençage, ces résultats confirment la robustesse des différences observées, indépendamment des performances analytiques. Cette information est fondamentale pour les futures études, permettant d'assurer la comparabilité d'échantillons issus d'études aux performances de séquençage différente, même en cas de profondeur de séquençage plus faible au-delà d'un certain seuil de performances.

Dans le cadre de ce travail de thèse, quelle que soit l'étude (à l'exception des études de l'immunodéprimé), nous avons limité les échantillons respiratoires sélectionnés aux spécimens prélevés avant toute thérapie antimicrobienne. Ce critère d'inclusion permettait l'analyse de la diversité virale sans le facteur confondant majeur qu'est la prise d'antibiotique préalable. Ce critère est de standardisation difficile et présente un impact conséquent sur le microbiome (dont les virus pathogènes font partis par ailleurs). À l'échelle du génome entier, nous avons pu observer que la faible diversité génomique initiale, résultant d'un goulot d'étranglement de transmission dans les études de virus respiratoires augmente pendant l'évolution clinique (260). De plus, notre étude montre des différences en termes de diversification génomique, en fonction de la classification clinique finale. En effet, alors qu'une diminution de diversité était observée chez les patients ne présentant pas de complication, aucune différence n'était retrouvée chez les patients présentant des complications quelles qu'elles soient. Cette différence dans l'évolution de la diversité virale suggère que la diversification des virus *Influenza* pourrait être considéré comme un facteur de virulence, comme cela a été suggéré pour les *Coxsackievirus* ou les *Poliovirus* (181,261,262). Elle supporte aussi le bénéfice potentiel à l'utilisation de virus génétiquement modifiés (à la polymérase de fidélité augmentée), en vue de produire de vaccin à sécurité et efficacité augmentés) (263). En effet, les populations moins diversifiées engendrant des manifestations moins sévères, il pourrait être envisagé l'utilisation de virus vivants

atténués comme modalité de vaccination. De plus, la chute importante du taux de diversité observé chez les patients aux formes bénignes est cohérente avec la notion de seuil d'erreur toléré et est suggéré par certaines interventions thérapeutiques (244). Les résultats observés peuvent donc suggérer que cette diminution de diversité associée à la clairance virale ainsi qu'une amélioration de la symptomatologie, serait consécutive au dépassement de ce seuil, conduisant à l'extinction de la population virale par elle-même. Ainsi, cette observation supporte l'utilisation de la ribavirine comme thérapeutique antigrippale, déstabilisant, entre autre, la polymérase grippale, comme c'est le cas pour les *Hantavirus* (189).

À l'échelle des segments pris individuellement, la diversité génomique virale évolue différemment. La diminution significative observée au niveau du génome entier étant causée principalement par l'évolution des segments codant PB2 et NS1. Ces différences ont été associées aux devenir cliniques, la diversité initiale du segment codant PB2 étant plus importante dans le groupe neurologique, en comparaison aux deux autres groupes cliniques, et à l'inverse du segment NS1. Les mutations du segment codant NS1 sont associées à une différence de devenir clinique, par exemple dans les modèles équins ou de virus H5N1 et les segments non antigéniques (tous les segments sauf ceux codant HA et NA) sont associés à une capacité d'augmentation du fitness viral (264–266). Il a été montré que les mutations dans la nucléoprotéine jouaient un rôle majeur dans l'adaptation et la virulence virale, permettant au virus d'échapper à l'immunité médiée par les lymphocytes T (267). Ainsi, notre étude apporte des éléments concernant la diversité par coordonnées nucléotidiques comme un ensemble et pas seulement au niveau de la mutation ponctuelle. Elle suggère donc que les segments porteurs d'une diversité importante sont associés au devenir clinique, apportant de potentielles propriétés émergentes à des virus néoformés.

Cette étude de diversification génomique virale souffrait néanmoins de quelques limites, principalement dues à sa nature rétrospective. La principale étant sa taille limitée, réduisant

la précision de l'observation des variants sur une coordonnée nucléotidique donnée, sans pour autant impacter de façon majeure les résultats obtenus. De plus, du fait de la nature non interventionnelle de cette étude, aucun prélèvement n'était réalisé en dehors de la prise en charge usuelle des patients infectés, même si dans le cadre de cette étude, il aurait pu être intéressant de prévoir des prélèvements supplémentaires, rapprochés dans le temps, pour peaufiner les variations de cette diversité. Néanmoins et indépendamment de toute considération clinique, il a déjà été rapporté que les variations sur une échelle plus courte qu'une journée peuvent être considérées comme négligeables, représentant un faible nombre de cycle de réplication virale.

En conclusion, cette étude, bien qu'étant une étude préliminaire de la diversification génomique virale, associe pour la première fois à celle-ci les informations cliniques et biologiques de l'infection d'un hôte humain. Les informations qu'elle apporte ouvrent un large champ d'investigation dans la prise en charge des infections au moyen du séquençage à haut débit. Elle suggère de plus l'utilité de nouvelles thérapies ne ciblant pas les protéines antigéniques des virus grippaux et renforce l'utilité de générer des virus modifiés génétiquement.

3.4. La diversité initiale du génome viral : une discrimination possible des souches virulentes ?

Après avoir considéré la diversification des virus grippaux dans une dimension temporelle, ce travail de thèse a considéré la diversité de ces virus dans une dimension interindividuelle en l'étudiant à un temps précoce de la maladie grippale.

Comme suggérée par des études de transmission inter-hôte, il a ainsi pu être observé que le nombre de coordonnées nucléotidiques impliquées dans les variants minoritaires est plutôt faible, environ un sixième du génome complet (260). Ce taux est concordant avec

les descriptions réalisées chez d'autres virus respiratoires comme le VRS, peu diversifié en 50 ans de suivi épidémiologique (203). Comme pour les VRS, une répartition hétérogène des régions comportant des substitutions a été mise en évidence dans le génome du virus grippal, quel que soit la conséquence clinique et ce dès le temps initial de la maladie (196). L'intérêt de cette information est grand dans la prise en charge de la maladie grippale : i/ pour la constitution d'amorces de diagnostic permettant une détection aux performances constantes indépendamment du glissement antigénique; ii/ pour limiter les émergences de résistance au traitement antiviral par la production de thérapeutiques ciblant des régions peu variantes; et iii/ pour développer des vaccins comportant une région antigénique ne variant pas (ou peu) au sein d'un individu afin d'augmenter la persistance d'une immunité vaccinale résiduelle de saison en saison.

Comme montré précédemment, la diversité initiale au moment de l'infection par une population virale est un facteur important de la pathogénicité de celle-ci. Dans des modèles murins, il a été montré qu'à une restriction de diversité était associée une létalité diminuée (181,182). Néanmoins, avant l'étude présentée dans le présent travail, les études réalisées chez l'humain ne l'étaient que chez les patients immunodéprimés, à l'excrétion prolongée plus simple à étudier.

Dans cette étude, comme dans celle étudiant la diversification génomique, seuls les échantillons prélevés chez les patients immunocompétents sans pathologie chronique ni antibiothérapie préalable au prélèvement ont été inclus. De plus, et malgré les difficultés inhérentes à sa réalisation dans un contexte hospitalier, cette étude avait pour avantage d'inclure les patients dans la phase précoce de leur maladie (2 jours de symptômes, soit 4 jours post infection au maximum). En excluant les patients à l'évolution clinique plus ancienne, il a été possible d'analyser la diversité virale initiale en association avec l'évolution clinique sans facteur confondant, comme aurait pu l'être l'âge du patient (268).

Dans nos observations, cette diversité initiale a été décrite comme limitée (260). Au niveau du génome dans sa globalité, comme au niveau des segments génomiques isolés, les IBV ont montré une plus haute diversité initiale. Cette observation dans notre étude est discordante avec le taux d'erreur estimé pour ces virus (de 1800 à 2200 substitutions par coordonnée nucléotidique par an pour les IAV contre 450 à 800 substitution par coordonnée nucléotidique par an pour les IBV) (269). Ces études étudiant la transmission inter-hôte, cette discordance apparente semble donc être plutôt le reflet d'un goulot d'étranglement de la transmission, plus qu'une diversification intra-hôte précoce (158).

La différence observée entre les formes bénignes de H3N2 et sévères de H1N1 était principalement due au segment codant NP. Le développement de nouvelles molécules antivirales, ciblant l'interaction de la protéine NP avec le génome viral pour limiter le taux de réplication virale semble être d'intérêt, l'émergence de variant résistant étant moins probable, car moins diversifié (270).

De plus, une différence de diversité initiale n'a pu être observée entre les formes neurologiques et respiratoires de grippe qu'en termes de diversification du segment codant la neuraminidase. Après une validation extensive sur une cohorte prospective, ce paramètre pourra être utilisé comme facteur de prédiction du devenir clinique des patients, en vue d'optimiser la prise en charge. Ainsi par ce mécanisme, il pourrait être intéressant d'envisager l'association des INA, à l'action directe associée à une action de diversification génomique, et de molécules antivirales déstabilisant la polymérase, en vue d'un dépassement du seuil d'erreur toléré à visée thérapeutique. Cette observation permet aussi d'insister sur le bénéfice à utiliser les inhibiteurs de neuraminidase de façon plus modérée. En effet, la limitation de la libération des variants, associée à une augmentation massive du taux d'erreur par les INA peut être l'explication pour laquelle sous certaines conditions (comme

une inflammation excessive ou un système immunitaire altéré) les patients traités présentent un sur-risque de complication respiratoire (244).

Il a aussi été mis en évidence que la plupart des variants minoritaires s'exprimaient par des substitutions en dehors du site d'attachement à la cellule ou du site catalytique pour les virus H1N1. Supporté par l'existence d'une diversification en dehors de régions antigéniques, cette répartition justifie l'existence de ces hotspots, ainsi que leur impact, indépendamment de (préalablement ou non à) toute décision thérapeutique.

Comme dans l'étude de diversification, aucune différence pertinente en termes de diversité n'a pu être associée au choix du seuil de diversité retenu (271). Une seule différence a pu être mise en évidence, impliquant une différence retrouvée au seuil de 1% et reflétant probablement le manque de puissance (et la variabilité inter-échantillon) de cette étude. Ce manque de puissance, lié à un faible nombre de patient par groupe clinique est le principal problème de cette étude, limitant la stratification par type/sous-type viral.

Face à ces résultats, deux hypothèses persistent. Il pourrait s'avérer que la diversification soit plus importante dans le cadre de la physiopathologie des infections grippales que la diversité initiale (271). De plus, la plupart des échantillons proviennent du tractus respiratoire supérieur, du fait de l'inclusion rétrospective. Il faudrait donc réaliser une étude de comparaison des tractus respiratoires supérieur et inférieur pour s'assurer que la diversification ne se produit pas à distance de la sphère nasopharyngée, difficile dans le cas de forme bénigne de la maladie. Une étude, non publiée dans ce travail, n'a pas pu permettre, sur la même période d'inclusion, d'inclure plus de 10 couples tractus haut – tractus bas, avec seulement de rares prélèvements chez les patients sains et n'a donc pu strictement conclure à une différence significative. À noter néanmoins que l'étude comparant les patients du réseau de surveillance et des patients hospitalisés en réanimation aux Hospices Civils de Lyon au

cours de la seule saison 2016-2017 n'a montré aucune différence en termes de diversité entre les zones de prélèvement (272). Cette étude a par ailleurs montré que l'association de deux mutations sur deux segments distincts pouvait, avec des performances de classification satisfaisantes, prédire le devenir clinique du patient sans montrer de différence de diversité en fonction du statut vaccinal du patient, comme déjà montré pour les virus H3N2 (180).

En conclusion, ces études sont importantes pour comprendre la diversité initiale des virus *Influenza* infectant l'être humain. Malgré les limitations techniques décrites ci-avant, celles-ci ouvrent un large champ d'investigation, renforçant le bénéfice à étudier une large cohorte de patients infectés en associant données cliniques et biologiques en un processus analytique unique.

4. Conclusion générale

L'infection grippale est une maladie infectieuse sévère, dont la présentation polymorphique, conduit à des formes sévères voire à des décès.

Depuis l'identification du virus de la grippe, il a longtemps été considéré que cette infection, monolithique, était entièrement due à ce seul pathogène. L'évolution des technologies de biologie moléculaire d'abord, puis plus récemment des technologies de séquençage à haut débit, a modifié considérablement les paradigmes étudiant cette maladie infectieuse. Il est maintenant évident que la susceptibilité et la sévérité des infections respiratoires aiguës, dont la grippe fait partie, est une résultante des interactions entre les différents règnes des cellules eucaryotes de l'hôte et des micro-organismes présents dans l'abondante niche écologique que constitue les tractus respiratoires supérieurs et inférieurs, avec, en premier lieu, les microbiomes bactériens et viraux, dont fait partie le virus lui-même.

Dans ce contexte d'évolution rapide des connaissances, ce travail de thèse, réalisé à partir de cohortes standardisées de patients inclus au stade précoce de la maladie et en dehors

de toute antibiothérapie, apporte des données nouvelles permettant d'améliorer la compréhension de l'évolution clinique des humains infectés par le virus grippal. Dans une première partie, l'étude des microbiomes bactériens des enfants et adultes infectés a permis de mettre en évidence, dans des prélèvements standardisés, une différence de diversité entre les patients en fonction de leur devenir clinique diversité. Cette différence de diversité, mis en évidence au niveau global est associée à une différence d'abondance de nombreuses OTU, dont certaines permettent la constitution d'un score « microbiotique » à l'application clinique aisément envisageable en pratique quotidienne. La transposition de ce principe sur des populations moins standardisées (adultes et/ou aux maladies chroniques) reste néanmoins à vérifier pour sa pleine utilisation en routine.

Dans un deuxième axe, ce travail de thèse a étudié la diversité du virus *Influenza*, au temps précoce de la maladie mais aussi au cours de sa diversification. Ces travaux ont concerné autant chez les patients immunocompétents, représentatifs de la population générale, que les patients immunodéprimés, modèles d'étude plus simple grâce à la prolongation de leur excrétion virale. Ces travaux ont pu mettre en évidence le bénéfice à étudier précisément les populations virales minoritaires, du fait de l'émergence très précoce de populations résistantes aux antiviraux en dehors de tout traitement mais aussi le maintien de populations sensibles sous traitement. La diversification des virus grippaux au cours de la maladie grippale semble être un paramètre à prendre en compte dans le développement de thérapeutique et dans le développement de nouvelles stratégies de prévention vaccinale. En effet, les données de ces travaux supportent le bénéfice à utiliser comme souches vaccinales une population virale à faible diversification associées à une issue clinique plus bénigne. Par ailleurs, ces données de diversifications peuvent aussi être utiles en situation de traitement, par le développement de nouvelles thérapeutiques ciblées sur les régions non diversifiées, limitant l'émergence de population résistantes, ou de thérapeutiques non ciblées, déstabilisant

les polymérase virales en vue de franchir le seuil d'erreur tolérable pour les populations virales.

En conclusion, ce travail de thèse a permis d'étudier en profondeur deux intervenants majeurs de l'infection grippale : le pathogène lui-même et la communauté bactérienne résidente. Dans le cadre d'une approche intégrative de toute maladie infectieuse, les interactions avec les règnes fongique (mycobiome) et viraux (virome) restent à établir en corrélation avec les réponses transcriptomiques de l'hôte. En l'absence d'évolution en terme de faisabilité (cout-efficacité, simplicité d'analyse bioinformatique, ...), il est difficile d'imaginer à court terme une évolution des pratiques clinico-biologiques s'appuyant sur un séquençage des communautés bactériennes et du séquençage profond des virus *Influenza* dans le cadre de la prise en charge de tout patient grippé. Une telle approche permettra toutefois de mieux comprendre la physiopathologie de l'infection et donc de permettre une meilleure prise en charge globale de celle-ci, améliorant son pronostic, ainsi que la santé publique.

Partie D. Bibliographie

Cette bibliographie ne comporte que les parties additionnelles aux bibliographies de chacun des articles et annexes du présent travail. Une partie bibliographie est disponible à la fin de ceux-ci, les renvois s'y référant.

1. Lederberg J. 'Ome Sweet 'Omics-- A Genealogical Treasury of Words. 2001 Apr 2;
2. Iwai S, Fei M, Huang D, Fong S, Subramanian A, Grieco K, et al. Oral and airway microbiota in HIV-infected pneumonia patients. *J Clin Microbiol.* 2012;50(9):2995–3002.
3. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biol.* 2016 Aug 19;14(8):e1002533.
4. Segal LN, Blaser MJ. A brave new world: the lung microbiota in an era of change. *Ann Am Thorac Soc.* 2014;11 Suppl 1:S21-27.
5. Moustafa A, Xie C, Kirkness E, Biggs W, Wong E, Turpaz Y, et al. The blood DNA virome in 8,000 humans. Belshaw R, editor. *PLOS Pathog.* 2017 Mar 22;13(3):e1006292.
6. Man WH, de Steenhuijsen Piters WA, Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15(5):259–70.
7. Di Bella JM, Bao Y, Gloor GB, Burton JP, Reid G. High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research. *J Microbiol Methods.* 2013;95(3):401–14.
8. Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1998;73(1):127–41.
9. Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 1997 Nov;63(11):4516–22.
10. Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(11):5088–90.
11. Hamady M, Walker JJ, Harris JK, Gold NJ, Knight R. Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. *Nat Methods.* 2008;5(3):235–7.
12. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(23):7537–41.

13. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010;7(5):335–6.
14. Ahn J-H, Kim B-Y, Song J, Weon H-Y. Effects of PCR cycle number and DNA polymerase type on the 16S rRNA gene pyrosequencing analysis of bacterial communities. *J Microbiol Seoul Korea*. 2012;50(6):1071–4.
15. Albertsen M, Karst SM, Ziegler AS, Kirkegaard RH, Nielsen PH. Back to Basics-The Influence of DNA Extraction and Primer Choice on Phylogenetic Analysis of Activated Sludge Communities. *PloS One*. 2015;10(7):e0132783.
16. Leung RK-K, Zhou J-W, Guan W, Li S-K, Yang Z-F, Tsui SK-W. Modulation of potential respiratory pathogens by pH1N1 viral infection. Raoult D, editor. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(10):930–5.
17. Sze MA, Hogg JC, Sin DD. Bacterial microbiome of lungs in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2014;9:229–38.
18. Engel P, Stepanauskas R, Moran NA. Hidden Diversity in Honey Bee Gut Symbionts Detected by Single-Cell Genomics. Richardson PM, editor. *PLoS Genet*. 2014;10(9):e1004596.
19. Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods*. 2003;55(3):541–55.
20. Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, Freeman CM, McCloskey L, Schmidt LA, et al. Analysis of the Lung Microbiome in the “Healthy” Smoker and in COPD. Bereswill S, editor. *PLoS ONE*. 2011;6(2):e16384.
21. Huse SM, Ye Y, Zhou Y, Fodor AA. A core human microbiome as viewed through 16S rRNA sequence clusters. *PloS One*. 2012;7(6):e34242.
22. Chu DM, Ma J, Prince AL, Antony KM, Seferovic MD, Aagaard KM. Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. *Nat Med*. 2017;23(3):314–26.
23. Biesbroek G, Tsivtsivadze E, Sanders EAM, Montijn R, Veenhoven RH, Keijser BJB, et al. Early respiratory microbiota composition determines bacterial succession patterns and respiratory health in children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190(11):1283–92.
24. Teo SM, Mok D, Pham K, Kusel M, Serralha M, Troy N, et al. The infant nasopharyngeal microbiome impacts severity of lower respiratory infection and risk of asthma development. *Cell Host Microbe*. 2015;17(5):704–15.
25. Praveen P, Jordan F, Priami C, Morine MJ. The role of breast-feeding in infant immune system: a systems perspective on the intestinal microbiome. *Microbiome*. 2015;3:41.
26. Perez GF, Pérez-Losada M, Isaza N, Rose MC, Colberg-Poley AM, Nino G. Nasopharyngeal microbiome in premature infants and stability during rhinovirus infection. *J Investig Med*. 2017;

27. Lynch SV. Viruses and microbiome alterations. *Ann Am Thorac Soc.* 2014;11 Suppl 1:S57-60.
28. Jain P, Jain A, Prakash S, Khan DN, Singh DD, Kumar A, et al. Prevalence and genotypic characterization of human parvovirus B19 in children with hemato-oncological disorders in North India. *J Med Virol.* 2015 Feb;87(2):303–9.
29. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108 Suppl 1:4578–85.
30. Planer JD, Peng Y, Kau AL, Blanton LV, Ndao IM, Tarr PI, et al. Development of the gut microbiota and mucosal IgA responses in twins and gnotobiotic mice. *Nature.* 2016;534(7606):263–6.
31. Bokulich NA, Chung J, Battaglia T, Henderson N, Jay M, Li H, et al. Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Sci Transl Med.* 2016 Jun 15;8(343):343ra82-343ra82.
32. Yatsunencko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature.* 2012 May 9;
33. Desai MS, Seekatz AM, Koropatkin NM, Kamada N, Hickey CA, Wolter M, et al. A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell.* 2016;167(5):1339–1353.e21.
34. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature.* 2013 Dec 19;504(7480):446–50.
35. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veecken J, deRoos P, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature.* 2013;504(7480):451–5.
36. Beura LK, Hamilton SE, Bi K, Schenkel JM, Odumade OA, Casey KA, et al. Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. *Nature.* 2016;532(7600):512–6.
37. McCullers JA, Bartmess KC. Role of Neuraminidase in Lethal Synergism between Influenza Virus and *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis.* 2003 Mar 15;187(6):1000–9.
38. McCullers JA. The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(4):252–62.
39. Pichon M, Lina B, Josset L. Impact of the Respiratory Microbiome on Host Responses to Respiratory Viral Infection. *Vaccines.* 2017;5(4).
40. Pfeiffer JK, Virgin HW. Viral immunity. Transkingdom control of viral infection and immunity in the mammalian intestine. *Science.* 2016;351(6270).

41. Kuss SK, Best GT, Etheredge CA, Pruijssers AJ, Frierson JM, Hooper LV, et al. Intestinal microbiota promote enteric virus replication and systemic pathogenesis. *Science*. 2011;334(6053):249–52.
42. Sajjan US, Jia Y, Newcomb DC, Bentley JK, Lukacs NW, LiPuma J., et al. H. influenzae potentiates airway epithelial cell responses to rhinovirus by increasing ICAM-1 and TLR3 expression. *FASEB*. 2006;20(12):2121–3.
43. Yun Y, Srinivas G, Kuenzel S, Linnenbrink M, Alnahas S, Bruce KD, et al. Environmentally determined differences in the murine lung microbiota and their relation to alveolar architecture. *PloS One*. 2014;9(12):e113466.
44. Marsland BJ, Gollwitzer ES. Host-microorganism interactions in lung diseases. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(12):827–35.
45. Wang J, Li F, Sun R, Gao X, Wei H, Li L-J, et al. Bacterial colonization dampens influenza-mediated acute lung injury via induction of M2 alveolar macrophages. *Nat Commun*. 2013;4.
46. Abt MC, Osborne LC, Monticelli LA, Doering TA, Alenghat T, Sonnenberg GF, et al. Commensal Bacteria Calibrate the Activation Threshold of Innate Antiviral Immunity. *Immunity*. 2012;37(1):158–70.
47. Ichinohe T, Pang IK, Kumamoto Y, Peaper DR, Ho JH, Murray TS, et al. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *PNAS USA*. 2011;108(13):5354–9.
48. de Steenhuijsen P, WAA, Heinonen S, Hasrat R, Bunsow E, Smith B, Suarez-Arrabal M-C, et al. Nasopharyngeal Microbiota, Host Transcriptome, and Disease Severity in Children with Respiratory Syncytial Virus Infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;194(9):1104–15.
49. Luoto R, Ruuskanen O, Waris M, Kalliomäki M, Salminen S, Isolauri E. Prebiotic and probiotic supplementation prevents rhinovirus infections in preterm infants: a randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(2):405–13.
50. Tapiovaara L, Kumpu M, Mäkiyuokko H, Waris M, Korpela R, Pitkäranta A, et al. Human rhinovirus in experimental infection after peroral *Lactobacillus rhamnosus* GG consumption, a pilot study. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2016;6(8):848–53.
51. Langevin S, Pichon M, Smith E, Morrison J, Bent Z, Green R, et al. Early nasopharyngeal microbial signature associated with severe influenza in children: a retrospective pilot study. *Journal of General Virology*. 2017;
52. De Paepe M, Leclerc M, Tinsley CR, Petit M-A. Bacteriophages: an underestimated role in human and animal health? *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:39.
53. Barr JJ, Auro R, Furlan M, Whiteson KL, Erb ML, Pogliano J, et al. Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity. *PNAS*. 2013;110(26):10771–6.

54. Nembrini C, Sichelstiel A, Kisielow J, Kurrer M, Kopf M, Marsland BJ. Bacterial-induced protection against allergic inflammation through a multicomponent immunoregulatory mechanism. *Thorax*. 2011 Sep 1;66(9):755–63.
55. Bruzzese E, Raia V, Spagnuolo MI, Volpicelli M, De Marco G, Maiuri L, et al. Effect of *Lactobacillus* GG supplementation on pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis: a pilot study. *Clin Nutr*. 2007;26(3):322–8.
56. Salk HM, Simon WL, Lambert ND, Kennedy RB, Grill DE, Kabat BF, et al. Taxa of the Nasal Microbiome Are Associated with Influenza-Specific IgA Response to Live Attenuated Influenza Vaccine. *PloS One*. 2016;11(9):e0162803.
57. Verkaik NJ, Nguyen DT, de Vogel CP, Moll HA, Verbrugh HA, Jaddoe VWV, et al. *Streptococcus pneumoniae* exposure is associated with human metapneumovirus seroconversion and increased susceptibility to in vitro HMPV infection. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(12):1840–4.
58. Cagno V, Donalisio M, Civra A, Volante M, Veccelli E, Oreste P, et al. Highly sulfated K5 *Escherichia coli* polysaccharide derivatives inhibit respiratory syncytial virus infectivity in cell lines and human tracheal-bronchial histocultures. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(8):4782–94.
59. Tuvim MJ, Evans SE, Clement CG, Dickey BF, Gilbert B. Augmented lung inflammation protects against influenza A pneumonia. *PloS One*. 2009;4(1):e4176.
60. Liu Q, Zhou Y-H, Yang Z-Q. The cytokine storm of severe influenza and development of immunomodulatory therapy. *Cell Mol Immunol*. 2016;13(1):3–10.
61. Monneret G, Venet F. Sepsis-induced immune alterations monitoring by flow cytometry as a promising tool for individualized therapy. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016;90(4):376–86.
62. Drake MG, Evans SE, Dickey BF, Fryer AD, Jacoby DB. Toll-like receptor-2/6 and Toll-like receptor-9 agonists suppress viral replication but not airway hyperreactivity in guinea pigs. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013;48(6):790–6.
63. Norton EB, Clements JD, Voss TG, Cárdenas-Freytag L. Prophylactic administration of bacterially derived immunomodulators improves the outcome of influenza virus infection in a murine model. *J Virol*. 2010;84(6):2983–95.
64. Williams AE, Edwards L, Humphreys IR, Snelgrove R, Rae A, Rappuoli R, et al. Innate imprinting by the modified heat-labile toxin of *Escherichia coli* (LTK63) provides generic protection against lung infectious disease. *J Immunol*. 2004;173(12):7435–43.
65. Chiba E, Tomosada Y, Vizoso-Pinto MG, Salva S, Takahashi T, Tsukida K, et al. Immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* improves resistance of infant mice against respiratory syncytial virus infection. *Int Immunopharmacol*. 2013;17(2):373–82.
66. Suzuki T, Yamaya M, Sekizawa K, Hosoda M, Yamada N, Ishizuka S, et al. Erythromycin inhibits rhinovirus infection in cultured human tracheal epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(8):1113–8.

67. Arslanoglu S, Moro GE, Boehm G. Early supplementation of prebiotic oligosaccharides protects formula-fed infants against infections during the first 6 months of life. *J Nutr.* 2007;137(11):2420–4.
68. Rautava S, Salminen S, Isolauri E. Specific probiotics in reducing the risk of acute infections in infancy? a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr.* 2009 Jun;101(11):1722.
69. Taipale T, Pienihekkinen K, Isolauri E, Larsen C, Brockmann E, Alanen P, et al. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in reducing the risk of infections in infancy. *Br J Nutr.* 2011 Feb;105(03):409–16.
70. Maldonado J, Cañabate F, Sempere L, Vela F, Sánchez AR, Narbona E, et al. Human milk probiotic *Lactobacillus fermentum* CECT5716 reduces the incidence of gastrointestinal and upper respiratory tract infections in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012 Jan;54(1):55–61.
71. Wu S, Jiang Z-Y, Sun Y-F, Yu B, Chen J, Dai C-Q, et al. Microbiota Regulates the TLR7 Signaling Pathway Against Respiratory Tract Influenza A Virus Infection. *Curr Microbiol.* 2013 Oct;67(4):414–22.
72. Mayer-Hamblett N, Rosenfeld M, Gibson RL, Ramsey BW, Kulasekara HD, Retsch-Bogart GZ, et al. *Pseudomonas aeruginosa* in vitro phenotypes distinguish cystic fibrosis infection stages and outcomes. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;190(3):289–97.
73. Biesbroek G, Wang X, Keijser BJJ, Eijkemans RM., Trzciński K, Rots NY, et al. Seven-valent pneumococcal conjugate vaccine and nasopharyngeal microbiota in healthy children. *Emerg Infect Dis.* 2014 Feb;20(2):201–10.
74. Tarabichi Y, Li K, Hu S, Nguyen C, Wang X, Elashoff D, et al. The administration of intranasal live attenuated influenza vaccine induces changes in the nasal microbiota and nasal epithelium gene expression profiles. *Microbiome.* 2015;3(1).
75. Ghedin E, Fitch A, Boyne A, Griesemer S, DePasse J, Bera J, et al. Mixed infection and the genesis of influenza virus diversity. *J Virol.* 2009;83(17):8832–41.
76. Ghedin E, Laplante J, DePasse J, Wentworth DE, Santos RP, Lepow ML, et al. Deep sequencing reveals mixed infection with 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus strains and the emergence of oseltamivir resistance. *J Infect Dis.* 2011;203(2):168–74.
77. Ghedin E, Holmes EC, DePasse JV, Pinilla LT, Fitch A, Hamelin M-E, et al. Presence of oseltamivir-resistant pandemic A/H1N1 minor variants before drug therapy with subsequent selection and transmission. *J Infect Dis.* 2012;206(10):1504–11.
78. McCrone JT, Lauring AS. Measurements of Intrahost Viral Diversity Are Extremely Sensitive to Systematic Errors in Variant Calling. *J Virol.* 2016;90(15):6884–95.
79. Sanjuan R, Nebot MR, Chirico N, Mansky LM, Belshaw R. Viral Mutation Rates. *J Virol.* 2010 Oct 1;84(19):9733–48.
80. Kunkel TA. DNA Replication Fidelity. *J Biol Chem.* 2004;279(17):16895–8.

81. Eigen M. Molecular self-organization and the early stages of evolution. *Experientia*. 1971;27.
82. Domingo E, Sheldon J, Perales C. Viral quasispecies evolution. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2012;76(2):159–216.
83. Poon LLM, Song T, Rosenfeld R, Lin X, Rogers MB, Zhou B, et al. Quantifying influenza virus diversity and transmission in humans. *Nat Genet*. 2016;48(2):195–200.
84. Murcia PR, Hughes J, Battista P, Lloyd L, Baillie GJ, Ramirez-Gonzalez RH, et al. Evolution of an Eurasian avian-like influenza virus in naïve and vaccinated pigs. *PLoS Pathog*. 2012;8(5):1002730.
85. Hughes J, Allen RC, Baguelin M, Hampson K, Baillie GJ, Elton D, et al. Transmission of equine influenza virus during an outbreak is characterized by frequent mixed infections and loose transmission bottlenecks. *PLoS Pathog*. 2012;8(12):e1003081.
86. Wilker PR, Dinis JM, Starrett G, Imai M, Hatta M, Nelson CW. Selection on haemagglutinin imposes a bottleneck during mammalian transmission of reassortant H5N1 influenza viruses. *Nat Commun*. 2013;4.
87. Varble A, Albrecht RA, Backes S, Crumiller M, Bouvier NM, Sachs D, et al. Influenza A virus transmission bottlenecks are defined by infection route and recipient host. *Cell Host Microbe*. 2014;16(5):691–700.
88. Parvin JD, Moscona A, Pan WT, Leider JM, Palese P. Measurement of the mutation rates of animal viruses: influenza A virus and poliovirus type 1. *J Virol*. 1986;59.
89. Schirmer M, Ijaz UZ, D'Amore R, Hall N, Sloan WT, Quince C. Insight into biases and sequencing errors for amplicon sequencing with the Illumina MiSeq platform. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(6):e37.
90. Dohm JC, Lottaz C, Borodina T, Himmelbauer H. Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing. *Nucleic Acids Res*. 2008;36.
91. Kircher M, Stenzel U, Kelso J. Improved base calling for the Illumina Genome Analyzer using machine learning strategies. *Genome Biol*. 2009;10(8):R83.
92. Quiñones-Mateu ME, Avila S, Reyes-Teran G, Martinez MA. Deep sequencing: Becoming a critical tool in clinical virology. *J Clin Virol*. 2014;
93. Grad YH, Newman R, Zody M, Yang X, Murphy R, Qu J, et al. Within-host whole-genome deep sequencing and diversity analysis of human respiratory syncytial virus infection reveals dynamics of genomic diversity in the absence and presence of immune pressure. *J Virol*. 2014;88(13):7286–93.
94. Zhao C, Liu F, Pyle AM. An ultra-processive, accurate reverse transcriptase encoded by a metazoan group II intron. *RNA N Y N*. 2017 Nov 6;
95. Song L, Huang W, Kang J, Huang Y, Ren H, Ding K. Comparison of error correction algorithms for Ion Torrent PGM data: application to hepatitis B virus. *Sci Rep*. 2017 Aug 14;7(1):8106.

96. Hoffmann E, Krauss S, Perez D, Webby R, Webster RG. Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine* [Internet]. 2002;20. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00268-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00268-2)
97. Wilm A, Aw PPK, Bertrand D, Yeo GHT, Ong SH, Wong CH, et al. LoFreq: a sequence-quality aware, ultra-sensitive variant caller for uncovering cell-population heterogeneity from high-throughput sequencing datasets. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(22):11189–201.
98. Acevedo A, Andino R. Library preparation for highly accurate population sequencing of RNA viruses. *Nat Protoc.* 2014 Jun 26;9(7):1760–9.
99. Malhotra R, Prabhakara S, Poss M, Acharya R, Ngom A, Formenti E, et al. Estimating Viral Haplotypes in a Population Using k-mer Counting. 2013; Berlin, Heidelberg.
100. Thompson JF, Milos PM. The properties and applications of single-molecule DNA sequencing. *Genome Biol.* 2011;12(2):217.
101. Debbink K, McCrone JT, Petrie JG, Truscon R, Johnson E, Mantlo EK, et al. Vaccination has minimal impact on the intrahost diversity of H3N2 influenza viruses. *PLoS Pathog.* 2017;13(1):e1006194.
102. Vignuzzi M, Stone JK, Arnold JJ, Cameron CE, Andino R. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature.* 2006;439.
103. Pfeiffer JK, Kirkegaard K. Increased fidelity reduces poliovirus fitness and virulence under selective pressure in mice. *PLoS Pathog.* 2005 Oct;1(2):e11.
104. Crotty S, Maag D, Arnold JJ, Zhong W, Lau JY, Hong Z, et al. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat Med.* 2000;6(12):1375–9.
105. Crotty S, Cameron CE, Andino R. RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *PNAS USA.* 2001;98(12):6895–900.
106. Airaksinen A, Pariente N, Menéndez-Arias L, Domingo E. Curing of foot-and-mouth disease virus from persistently infected cells by ribavirin involves enhanced mutagenesis. *Virology.* 2003;311(2):339–49.
107. Day CW, Smee DF, Julander JG, Yamshchikov VF, Sidwell RW, Morrey JD. Error-prone replication of West Nile virus caused by ribavirin. *Antiviral Res.* 2005;67(1):38–45.
108. Maag D, Castro C, Hong Z, Cameron CE. Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) as a mediator of the antiviral activity of ribavirin. *J Biol Chem.* 2001;276(49):46094–8.
109. Lanford RE, Chavez D, Guerra B, Lau JY, Hong Z, Brasky KM, et al. Ribavirin induces error-prone replication of GB virus B in primary tamarin hepatocytes. *J Virol.* 2001;75(17):8074–81.

110. Severson WE, Schmaljohn CS, Javadian A, Jonsson CB. Ribavirin causes error catastrophe during Hantaan virus replication. *J Virol.* 2003;77(1):481–8.
111. Anderson JP, Daifuku R, Loeb LA. Viral error catastrophe by mutagenic nucleosides. *Annu Rev Microbiol.* 2004;58:183–205.
112. Holland JJ, Domingo E, de la Torre JC, Steinhauer DA. Mutation frequencies at defined single codon sites in vesicular stomatitis virus and poliovirus can be increased only slightly by chemical mutagenesis. *J Virol.* 1990 Aug;64(8):3960–2.
113. Grande-Pérez A, Lázaro E, Lowenstein P, Domingo E, Manrubia SC. Suppression of viral infectivity through lethal defection. *PNAS USA.* 2005;102(12):4448–52.
114. González-López C, Arias A, Pariente N, Gómez-Mariano G, Domingo E. Preextinction viral RNA can interfere with infectivity. *J Virol.* 2004;78(7):3319–24.
115. Mullins JI, Heath L, Hughes JP, Kicha J, Styrchak S, Wong KG, et al. Mutation of HIV-1 genomes in a clinical population treated with the mutagenic nucleoside KP1461. *PloS One.* 2011;6(1):e15135.
116. Ruiz-Jarabo CM, Ly C, Domingo E, de la Torre JC. Lethal mutagenesis of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV). *Virology.* 2003;308(1):37–47.
117. Do LA, Wilm A, Van Doorn HR, Lam HM, Sim S, Sukumaran R, et al. Direct whole-genome deep-sequencing of human respiratory syncytial virus A and B from Vietnamese children identifies distinct patterns of inter- and intra-host evolution. *J Gen Virol.* 2015;96(12):3470–83.
118. Pauly MD, Procaro MC, Lauring AS. A novel twelve class fluctuation test reveals higher than expected mutation rates for influenza A viruses. *eLife.* 2017;6.
119. Luria SE, Delbrück M. Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics.* 1943;28(6):491–511.
120. Visher E, Whitefield SE, McCrone JT, Fitzsimmons W, Lauring AS. The Mutational Robustness of Influenza A Virus. *PLoS Pathog.* 2016;12(8):e1005856.
121. Pauly MD, Lauring AS. Effective lethal mutagenesis of influenza virus by three nucleoside analogs. *J Virol.* 2015;89(7):3584–97.
122. Dinis J., Florek NW, Fatola OO, Moncla LH, Mutschler JP, Charlier OK, et al. Deep Sequencing Reveals Potential Antigenic Variants at Low Frequencies in Influenza A Virus-Infected Humans. *J Virol.* 2016;90(7):3355–65.
123. Rogers MB, Song T, Sebra R, Greenbaum BD, Hamelin M-E, Fitch A, et al. Intra-host dynamics of antiviral resistance in influenza A virus reflect complex patterns of segment linkage, reassortment, and natural selection. *mBio.* 2015;6(2).
124. Agoti CN, Munywoki PK, Phan MVT, Otieno JR, Kamau E, Bett A, et al. Transmission patterns and evolution of respiratory syncytial virus in a community outbreak identified by genomic analysis. *Virus Evol.* 2017;3(1).

125. Tan L, Lemey P, Houspie L, Viveen MC, Jansen NJG, van Loon AM, et al. Genetic variability among complete human respiratory syncytial virus subgroup A genomes: bridging molecular evolutionary dynamics and epidemiology. *PloS One*. 2012;7(12):e51439.
126. Cordey S, Junier T, Gerlach D, Gobbin F, Farinelli L, Zdobnov EM, et al. Rhinovirus Genome Evolution during Experimental Human Infection. Martin DP, editor. *PLoS ONE*. 2010;5(5):e10588.
127. Sobel Leonard A, Weissman D, Greenbaum B, Ghedin E, Koelle K. Transmission Bottleneck Size Estimation from Pathogen Deep-Sequencing Data, with an Application to Human Influenza A Virus. *J Virol*. 2017;JVI.00171-17.
128. Gill PJ, Ashdown HF, Wang K, Heneghan C, Roberts NW, Harnden A, et al. Identification of children at risk of influenza-related complications in primary and ambulatory care: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Respir Med*. 2015;3(2):139–49.
129. Khandaker G, Zurynski Y, Buttery J, Marshall H, Richmond PC, Dale RC, et al. Neurologic complications of influenza A(H1N1)pdm09: Surveillance in 6 pediatric hospitals. *Neurology*. 2012;79(14):1474–81.
130. Josset L, Tisoncik-Go J, Katze MG. Moving H5N1 studies into the era of systems biology. *Virus Res*. 2013;178(1):151–67.
131. Weinstock GM. Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature*. 2012;489(7415):250–6.
132. Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*. 2015;3:31.
133. Chao A, Chiu C-H, Jost L. Unifying Species Diversity, Phylogenetic Diversity, Functional Diversity, and Related Similarity and Differentiation Measures Through Hill Numbers. *Annu Rev Ecol Evol Syst*. 2014 Nov 23;45(1):297–324.
134. Bogaert D, Keijsers B, Huse S, Rossen J, Veenhoven R, van Gils E, et al. Variability and Diversity of Nasopharyngeal Microbiota in Children: A Metagenomic Analysis. Semple M, editor. *PLoS ONE*. 2011;6(2):e17035.
135. Sakwinska O, Bastic Schmid V, Berger B, Bruttin A, Keitel K, Lepage M, et al. Nasopharyngeal Microbiota in Healthy Children and Pneumonia Patients. *J Clin Microbiol*. 2014;52(5):1590–4.
136. Hilty M, Qi W, Brugger SD, Frei L, Agyeman P, Frey PM, et al. Nasopharyngeal Microbiota in Infants With Acute Otitis Media. *J Infect Dis*. 2012;205(7):1048–55.
137. Pettigrew MM, Laufer AS, Gent JF, Kong Y, Fennie KP, Metlay JP. Upper Respiratory Tract Microbial Communities, Acute Otitis Media Pathogens, and Antibiotic Use in Healthy and Sick Children. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(17):6262–70.

138. Vissing NH, Chawes BLK, Bisgaard H. Increased Risk of Pneumonia and Bronchiolitis after Bacterial Colonization of the Airways as Neonates. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(10):1246–52.
139. Schreiner A. Anaerobic pulmonary infections. *Scand J Infect Dis Suppl*. 1979;(19):77–9.
140. Bosch AATM, Levin E, van Houten MA, Hasrat R, Kalkman G, Biesbroek G, et al. Development of Upper Respiratory Tract Microbiota in Infancy is Affected by Mode of Delivery. *EBioMedicine*. 2016 Jul;9:336–45.
141. Loughrey AC, Chew EW. Endocarditis caused by *Veillonella dispar*. *J Infect*. 1990;21(3):319–21.
142. Yacoub AT, Krishnan J, Acevedo IM, Halliday J, Greene JN. Nutritionally variant streptococci bacteremia in cancer patients: a retrospective study, 1999-2014. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2015;7(1):2015030.
143. Abou Abdallah R, Cimmino T, Baron S, Cadoret F, Michelle C, Raoult D, et al. Description of *Chryseobacterium timonianum* sp. nov., isolated from a patient with pneumonia. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2017 May 16;
144. Cobo F, Rodríguez-Granger J, Sampedro A, Aliaga-Martínez L, Navarro-Marí JM. Pleural effusion due to *Parvimonas micra*. A case report and a literature review of 30 cases. *Rev Esp Quimioter*. 2017 Aug;30(4):285–92.
145. Wong VK, Turmezei TD, Weston VC. Actinomycosis. *BMJ*. 2011 Oct 11;343:d6099.
146. Mansbach JM, Hasegawa K, Henke DM, Ajami NJ, Petrosino JF, Shaw CA, et al. Respiratory syncytial virus and rhinovirus severe bronchiolitis are associated with distinct nasopharyngeal microbiota. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(6):1909–1913.e4.
147. Ederveen THA, Ferwerda G, Ahout IM, Vissers M, de Groot R, Boekhorst J, et al. *Haemophilus* is overrepresented in the nasopharynx of infants hospitalized with RSV infection and associated with increased viral load and enhanced mucosal CXCL8 responses. *Microbiome*. 2018;6(1):10.
148. Ishimura ME, Teixeira D, Silveira GP, Gambero M, Gama GAC, Pimenta BSO, et al. Killed *Propionibacterium acnes* enhances immunogenicity and tumor growth control of a dendritic-tumor cell hybrid vaccine in a murine melanoma model. *PLOS ONE*. 2018;13(10):e0205148.
149. Gomez-Garces JL, Alhambra A, Alos JI, Barrera B, García G. Acute and chronic otitis media and *Turicella* otitidis: a controversial association. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;10(9):854–7.
150. Shamriz O, Engelhard D, Temper V, Revel-Vilk S, Benenson S, Brooks R, et al. Infections caused by *Fusobacterium* in children: a 14-year single-center experience. *Infection*. 2015;43(6):663–70.

151. Steed AL, Christophi GP, Kaiko GE, Sun L, Goodwin VM, Jain U, et al. The microbial metabolite desaminotyrosine protects from influenza through type I interferon. *Science*. 2017;357(6350):498–502.
152. Lada SM, Huang K, VanBelzen DJ, Montaner LJ, O’Doherty U, Richman DD. Quantitation of Integrated HIV Provirus by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Droplet Digital PCR. *J Clin Microbiol*. 2018;
153. Thulin Hedberg S, Eriksson L, Demontis MA, Mölling P, Sundqvist M, Taylor G, et al. Droplet digital PCR for absolute quantification of proviral load of human T-cell lymphotropic virus (HTLV) types 1 and 2. *J Virol Methods*. 2018;260:70–4.
154. Sedji MI, Varbanov M, Meo M, Colin M, Mathieu L, Bertrand I. Quantification of human adenovirus and norovirus in river water in the north-east of France. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2018;
155. Yang D, Hu T, Wu X, Li K, Zhong Q, Liu W. Droplet-digital polymerase chain reaction for detection of clinical hepatitis B virus DNA samples. *J Med Virol*. 2018;
156. Fonceca AM, Chopra A, Levy A, Noakes PS, Poh M.-P, Bear NL, et al. Infective respiratory syncytial virus is present in human cord blood samples and most prevalent during winter months. *PloS One*. 2017;12(4):e0173738.
157. Hui Y, Wu Z, Qin Z, Zhu L, Liang J, Li X, et al. Micro-droplet Digital Polymerase Chain Reaction and Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Technologies Provide Highly Sensitive and Accurate Detection of Zika Virus. *Virol Sin*. 2018;33(3):270–7.
158. Abachin E, Convers S, Falque S, Esson R, Mallet L, Nougarede N. Comparison of reverse-transcriptase qPCR and droplet digital PCR for the quantification of dengue virus nucleic acid. *Biologicals*. 2018;52:49–54.
159. Lillsunde Larsson G, Helenius G. Digital droplet PCR (ddPCR) for the detection and quantification of HPV 16, 18, 33 and 45 - a short report. *Cell Oncol Dordr*. 2017;40(5):521–7.
160. Arvia R, Sollai M, Pierucci F, Urso C, Massi D, Zakrzewska K. Droplet digital PCR (ddPCR) vs quantitative real-time PCR (qPCR) approach for detection and quantification of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) DNA in formalin fixed paraffin embedded (FFPE) cutaneous biopsies. *J Virol Methods*. 2017;
161. Taylor SC, Carbonneau J, Shelton DN, Boivin G. Optimization of Droplet Digital PCR from RNA and DNA extracts with direct comparison to RT-qPCR: Clinical implications for quantification of Oseltamivir-resistant subpopulations. *J Virol Methods*. 2015;224:58–66.
162. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem*. 2011;83(22):8604–10.

163. Jones M, Williams J, Gärtner K, Phillips R, Hurst J, Frater J. Low copy target detection by Droplet Digital PCR through application of a novel open access bioinformatic pipeline, “definetherain.” *J Virol Methods*. 2014;202:46–53.
164. Boivin G. Detection and management of antiviral resistance for influenza viruses. *Influenza Other Respir Viruses*. 2013;7 Suppl 3:18–23.
165. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol*. 2012;
166. Rivers L, Gaspar HB. Severe combined immunodeficiency: recent developments and guidance on clinical management. *Arch Dis Child*. 2015;100(7):667–72.
167. Samson M, Abed Y, Desrochers F-M, Hamilton S, Luttick A, Tucker SP, et al. Characterization of drug-resistant influenza virus A(H1N1) and A(H3N2) variants selected in vitro with laninamivir. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(9):5220–8.
168. Mori K, Murano K, Ohniwa RL, Kawaguchi A, Nagata K. Oseltamivir expands quasispecies of influenza virus through cell-to-cell transmission. *Sci Rep*. 2015;5:9163.
169. Dimmock NJ, Easton AJ. Defective interfering influenza virus RNAs: time to reevaluate their clinical potential as broad-spectrum antivirals? *J Virol*. 2014;88(10):5217–27.
170. Saira K, Lin X, DePasse JV, Halpin R, Twaddle A, Stockwell T, et al. Sequence analysis of in vivo defective interfering-like RNA of influenza A H1N1 pandemic virus. *J Virol*. 2013;87(14):8064–74.
171. Vasilijevic J, Zamarreño N, Oliveros JC, Rodriguez-Frandsen A, Gómez G, Rodriguez G, et al. Reduced accumulation of defective viral genomes contributes to severe outcome in influenza virus infected patients. *PLoS Pathog*. 2017 Oct;13(10):e1006650.
172. Trebbien R, Pedersen SS, Vorborg K, Franck KT, Fischer TK. Development of oseltamivir and zanamivir resistance in influenza A(H1N1)pdm09 virus, Denmark, 2014. *Euro Surveill*. 2017;22(3).
173. Casalegno J-S, Ferraris O, Escuret V, Bouscambert M, Bergeron C, Linès L, et al. Functional balance between the hemagglutinin and neuraminidase of influenza A(H1N1)pdm09 HA D222 variants. *PloS One*. 2014;9(8):104009.
174. Goka EA, Valley PJ, Mutton KJ, Klapper PE. Mutations associated with severity of the pandemic influenza A(H1N1)pdm09 in humans: a systematic review and meta-analysis of epidemiological evidence. *Arch Virol*. 2014;159(12):3167–83.
175. Raghwan J, Thompson RN, Koelle K. Selection on non-antigenic gene segments of seasonal influenza A virus and its impact on adaptive evolution. *Virus Evol* [Internet]. 2017 [cited 2018 Oct 13];3(2). Available from: <http://academic.oup.com/ve/article/doi/10.1093/vex034/4614565>
176. Junemann S, Sedlazeck FJ, Prior K, Albersmeier A, John U, Kalinowski J. Updating benchtop sequencing performance comparison. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2013;31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2522>


177. Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, Constantinidou C, Gharbia SE, Wain J. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol.* 2012;30.
178. Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics.* 2012;13.
179. Glenn TC. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol Ecol Resour* [Internet]. 2011;11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03024.x>
180. Robasky K, Lewis NE, Church GM. The role of replicates for error mitigation in next-generation sequencing. *Nat Rev Genet.* 2014;15.
181. Guo Y, Li J, Li C-I, Long J, Samuels DC, Shyr Y. The effect of strand bias in Illumina short-read sequencing data. *BMC Genomics.* 2012;13(1):666.
182. McCrone JT, Woods RJ, Martin ET, Malosh RE, Monto AS, Lauring AS. Stochastic processes constrain the within and between host evolution of influenza virus. *eLife.* 2018;7.
183. Dulbecco R, Vogt M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J Exp Med.* 1954 Feb;99(2):167–82.
184. McCrone JT, Lauring AS. Genetic bottlenecks in intraspecies virus transmission. *Curr Opin Virol.* 2018;28:20–5.
185. Moratorio G, Henningsson R, Barbezange C, Carrau L, Bordería AV, Blanc H, et al. Attenuation of RNA viruses by redirecting their evolution in sequence space. *Nat Microbiol.* 2017;2:17088.
186. Rai DK, Diaz-San Segundo F, Campagnola G, Keith A, Schafer EA, Kloc A, et al. Attenuation of Foot-and-Mouth Disease Virus by Engineered Viral Polymerase Fidelity. *J Virol.* 2017;91(15).
187. Vignuzzi M, Wendt E, Andino R. Engineering attenuated virus vaccines by controlling replication fidelity. *Nat Med.* 2008 Feb;14(2):154–61.
188. Chambers TM, Quinlivan M, Sturgill T, Cullinane A, Horohov DW, Zamarin D, et al. Influenza A viruses with truncated NS1 as modified live virus vaccines: pilot studies of safety and efficacy in horses. *Equine Vet J.* 2009 Jan;41(1):87–92.
189. Steel J, Lowen AC, Pena L, Angel M, Solórzano A, Albrecht R, et al. Live attenuated influenza viruses containing NS1 truncations as vaccine candidates against H5N1 highly pathogenic avian influenza. *J Virol.* 2009;83(4):1742–53.
190. Gong L., Bloom JD. Epistatically interacting substitutions are enriched during adaptive protein evolution. *PLoS Genet.* 2014;10(5):e1004328.
191. Lee EC, Viboud C, Simonsen L, Khan F, Bansal S. Detecting signals of seasonal influenza severity through age dynamics. *BMC Infect Dis.* 2015;15:587.

192. Nobusawa E, Sato K. Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses. *J Virol.* 2006;80(7):3675–8.
193. McKimm-Breschkin JL, Fry AM. Meeting report: 4th ISIRV antiviral group conference: Novel antiviral therapies for influenza and other respiratory viruses. *Antiviral Res.* 2016;129:21–38.
194. Pichon M, Simon B, Valette M, Bal A, Picard C, Escuret V, et al. Evolution of influenza virus genome during clinical course in immunocompetent patients. Submitted;
195. Simon B, Pichon M, Valette M, Burfin G, Lina B, Josset L. Whole genome sequencing of circulating H3N2 influenza viruses reveals variants associated with severity and ineffective vaccination. Submitted;

Partie E. Annexes

Annexe A. PICHON M., Gaymard A., Bouscambert-Duchamp M. Lina B.
[*Orthomyxoviridae*]. Traité de Virologie Médicale, 2nd Edition.

Maude Bouscambert-Duchamp - Alexandre Gaymard
Bruno Lina - Maxime Pichon

Virus influenza	
Famille : <i>Orthomyxoviridae</i>	
Genres : <i>Influenzavirus A et B</i>	
Génome : ARN monocaténaire linéaire de polarité négative segmenté (8 segments) ; 10 à 15 kb au total	Taille : 80 à 120 nm

1 - Historique

La famille des *Orthomyxoviridae* est composée de 7 genres : *Isavirus*, *Quararjavirus*, *Thogotovirus* et les 4 genres *Influenzavirus A*, *B*, *C* et *D*. Bien que les virus influenza de types *A*, *B* et *C* puissent être isolés chez l'être humain, seuls les virus de types *A* et *B* sont responsables de la grippe, les virus de type *C* étant responsables de simples rhinites.

La grippe est une infection respiratoire épidémique survenant chaque hiver dans les régions tempérées et toute l'année dans les régions intertropicales. Cette infection virale entraîne une mortalité et une morbidité très élevées, avec 290 000 à 650 000 décès par an (estimations de l'OMS). Les virus de type *A* sont classés en sous-types en fonction de leurs glycoprotéines de surface : l'hémagglutinine (*H*) et la neuraminidase (*N*). Seuls les sous-types *A(H1N1)* et *A(H3N2)* circulent annuellement chez l'être humain même si les autres sous-types, d'origine zoonotique, peuvent exceptionnellement l'infecter. Parmi les virus de type *B*, 2 lignages appelés *B/Yamagata* et *B/Victoria* coexistent et cocirculent à l'échelle planétaire depuis les années 1980. La survenue annuelle d'épidémies s'explique par l'évolution permanente de ces virus à ARN, par un mécanisme de glissement antigénique à

des rythmes différents et non linéaires. Ce glissement est le reflet de la modification des glycoprotéines de surface du virus, cibles principales de la réponse immunitaire. Chaque hiver, un virus plus ou moins variant antigéniquement, non reconnu par la réponse immunitaire préexistante de la population, est capable de réinfecter des individus ayant déjà été infectés dans le passé.

Bien que la plupart des infections observées n'entraînent pas de complication, le pouvoir pathogène de ces virus est important. Chez certains individus présentant des facteurs de risque, la grippe peut entraîner des formes graves et un diagnostic rapide devient un enjeu majeur pour une prise en charge adaptée. Des antiviraux spécifiques sont venus compléter efficacement l'arsenal thérapeutique qui ne comportait que le vaccin jusqu'au début des années 2000.

La grande variabilité des virus grippaux, le risque pandémique et leur pouvoir pathogène imposent une surveillance très étroite des virus circulants à la fois chez l'être humain et chez l'animal, ainsi que le développement de nouveaux moyens thérapeutiques ou préventifs.

Dans ce chapitre, nous décrivons uniquement les virus présentant un intérêt en pratique médicale : les virus influenza *A* et *B*.

2 - Historique

La grippe est une maladie infectieuse particulièrement contagieuse circulant chez l'être humain depuis très longtemps. Les 1^{res} descriptions d'épidémies d'infections respiratoires durant plusieurs semaines (évocatrices d'épidémies de grippe) ont été faites par Hippocrate en 412 avant JC, puis au Moyen-Age dans les armées de Charlemagne. C'est en Angleterre, en 1510, qu'a été faite une description précise des épidémies de grippe survenant par épisodes fréquents mais irréguliers et d'intensité variable touchant préférentiellement les personnes âgées.

Ensuite, en 1781 puis en 1830, ont été décrites des épidémies massives débutant en Asie avant de diffuser en Russie puis en Europe, rappelant la diffusion mondiale des virus pandémiques. La 1^{re} description détaillée d'une pandémie date de 1890, à l'occasion d'une épidémie majeure en Russie due vraisemblablement à un virus A(H3Nx), le type de N étant toujours débattu.

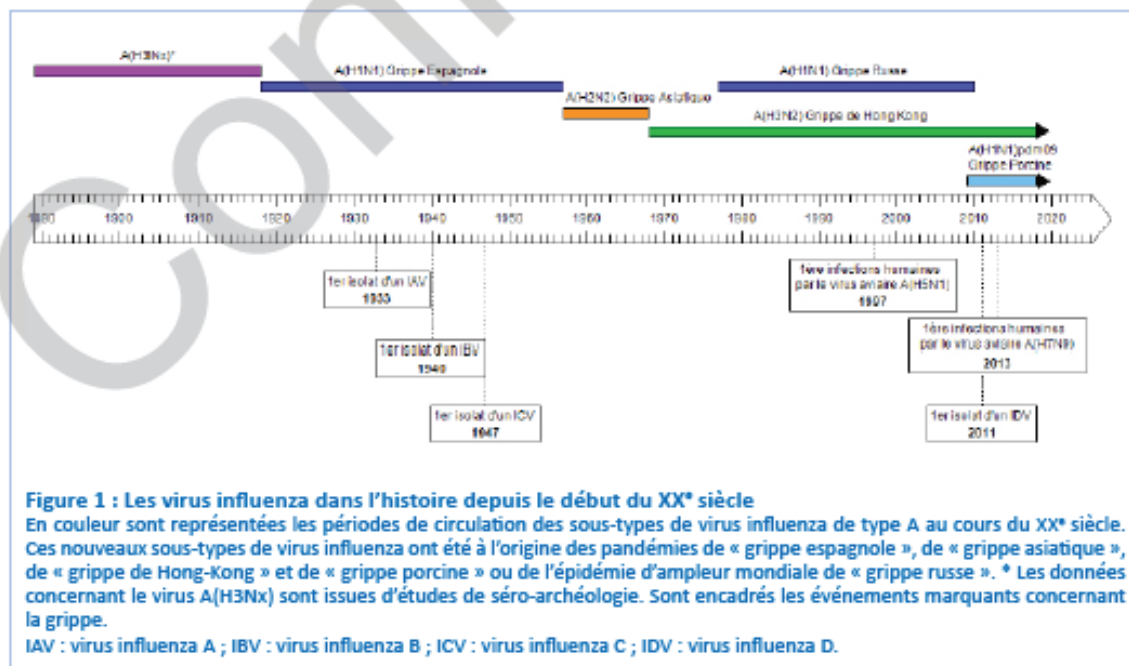
Au cours du XX^e siècle, les connaissances sur la grippe se sont améliorées : distinction entre épidémies saisonnières et pandémies, description de l'agent étiologique d'origine virale par Richard E. Shope en 1920, puis isolement du virus influenza A humain par Wilson Smith, Christopher Andrews et Patrick Laidlaw en 1933. Les virus influenza de type B ont été isolés en 1940, de type C en 1947 et de type D plus récemment en 2011 (Fig. 1).

Depuis le début du XX^e siècle, plusieurs pandémies ont été décrites chez l'être humain. En 1918, l'émergence d'un virus A(H1N1) a été responsable de la grippe

dite « espagnole ». L'origine de ce virus responsable de plusieurs dizaines de millions de décès dans le monde, n'est pas complètement élucidée, mais il pourrait provenir directement du réservoir aviaire. En 1957, une 2^e pandémie dite « asiatique » a été responsable de près d'un million de morts dans le monde. Le virus A(H2N2) issu du réassortiment entre un virus aviaire et le virus circulant A(H1N1) de 1918, s'imposa et circula jusqu'en 1968. Cette année-là, le virus A(H2N2) de 1957 a été remplacé par un virus A(H3N2) responsable de la 3^e pandémie ou « grippe de Hong Kong » avec environ 4 millions de morts dans le monde. Ce virus pandémique proviendrait également d'un réassortiment entre des virus aviaires et le virus humain circulant A(H2N2). En 1977, la réémergence de virus A(H1N1) proches des virus ayant circulé dans les années 1950 a donné lieu à l'épidémie mondiale dite de la « pseudo-pandémie russe ». Depuis cette date, en plus des virus de type B, co-circulent 2 sous-types de virus de type A chez l'être humain : A(H1N1) et A(H3N2) (Fig. 1).

La 1^{re} pandémie du XXI^e siècle ou « grippe porcine » fut causée par la transmission à l'être humain en 2009 d'un virus A(H1N1) (noté A(H1N1)pdm09) issu d'un réassortiment entre 4 virus dont 3 ne circulant que chez le porc et le virus humain A(H3N2). Depuis 2009, le virus A(H1N1)pdm09 continue à circuler lors des épidémies saisonnières. Il a complètement remplacé les souches A(H1N1) pré-pandémiques (Fig. 1).

De nos jours, la grippe est encore l'une des principales causes de morbidité et de mortalité par maladie infectieuse en France et dans le Monde.



Chapitre 39 - Virus influenza

3 - Structure du virus

3.1. Nomenclature

Les types de virus influenza sont définis selon les caractères antigéniques de leur nucléoprotéine (NP) et de leur protéine de matrice (M).

Depuis 1980, les virus influenza sont classés selon la nomenclature internationale de l'OMS : type antigénique viral A, B, C ou D / hôte d'isolement de la souche si non humaine / lieu (ville) d'isolement initial / numéro d'identification de la souche / année du 1^{er} isolement ; par exemple C/Paris/1/67. Pour les virus de type A, le sous-type en fonction de la nature antigénique de leur hémagglutinine et de leur neuraminidase (HxNx) complète ce nom : par exemple A/Lyon/1224/2017 (H3N2).

La dénomination des virus B se fait sur le même modèle ; 2 lignages de virus B circulent depuis les années 1980 : B/Yamagata et B/Victoria (Fig. 2).

3.2. Structure des virions

Les virions sont majoritairement de forme sphérique, enveloppés, à capsid hélicoïdale mesurant entre 80 et 120 nm. Les formes plus allongées peuvent atteindre jusqu'à 200 nm (Fig. 3). Trois protéines majeures sont intégrées dans la membrane de la capsid virale, formant les glycoprotéines de surface des virus de type A : l'hémagglutinine (HA ou H), la neuraminidase (NA ou N) et le canal à proton transmembranaire tétramérique (M2). Ces protéines sont les cibles des anticorps (HA et NA) et des molécules antivirales (NA et M2). Du fait de leur variabilité, notamment sous la pression de sélection immunitaire, la HA et la NA sont utilisées pour les études épidémiologiques.

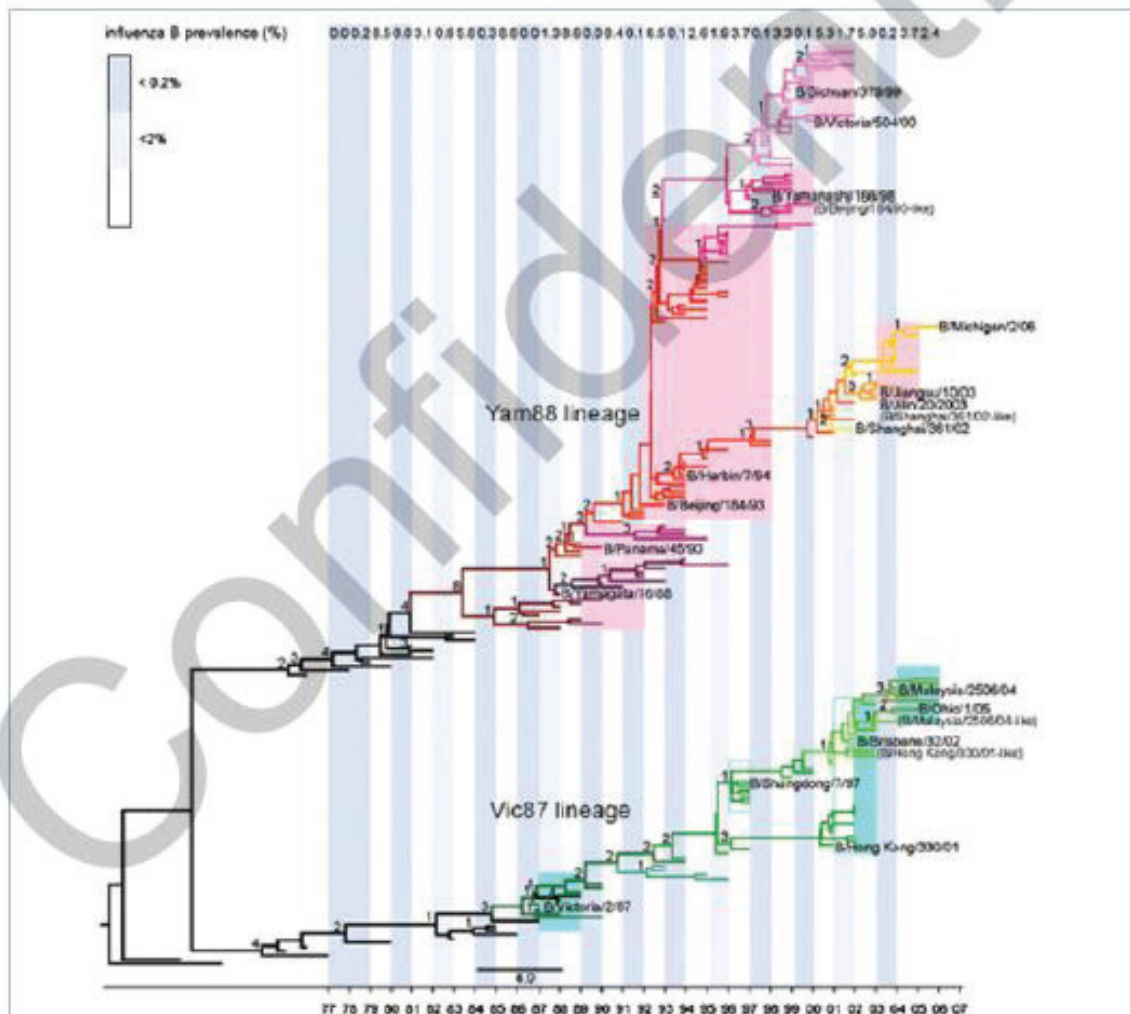


Figure 2 : Evolution génétique des virus influenza B depuis 1977

L'arbre phylogénétique représenté ci-dessus montre le schéma d'évolution des virus influenza B. Deux lignages de virus influenza B (Victoria et Yamagata) co-circulent mais n'évoluent pas de la même façon. Le lignage Yamagata évolue beaucoup plus vite avec l'apparition et la co-circulation depuis les années 1990 de 2 clades.

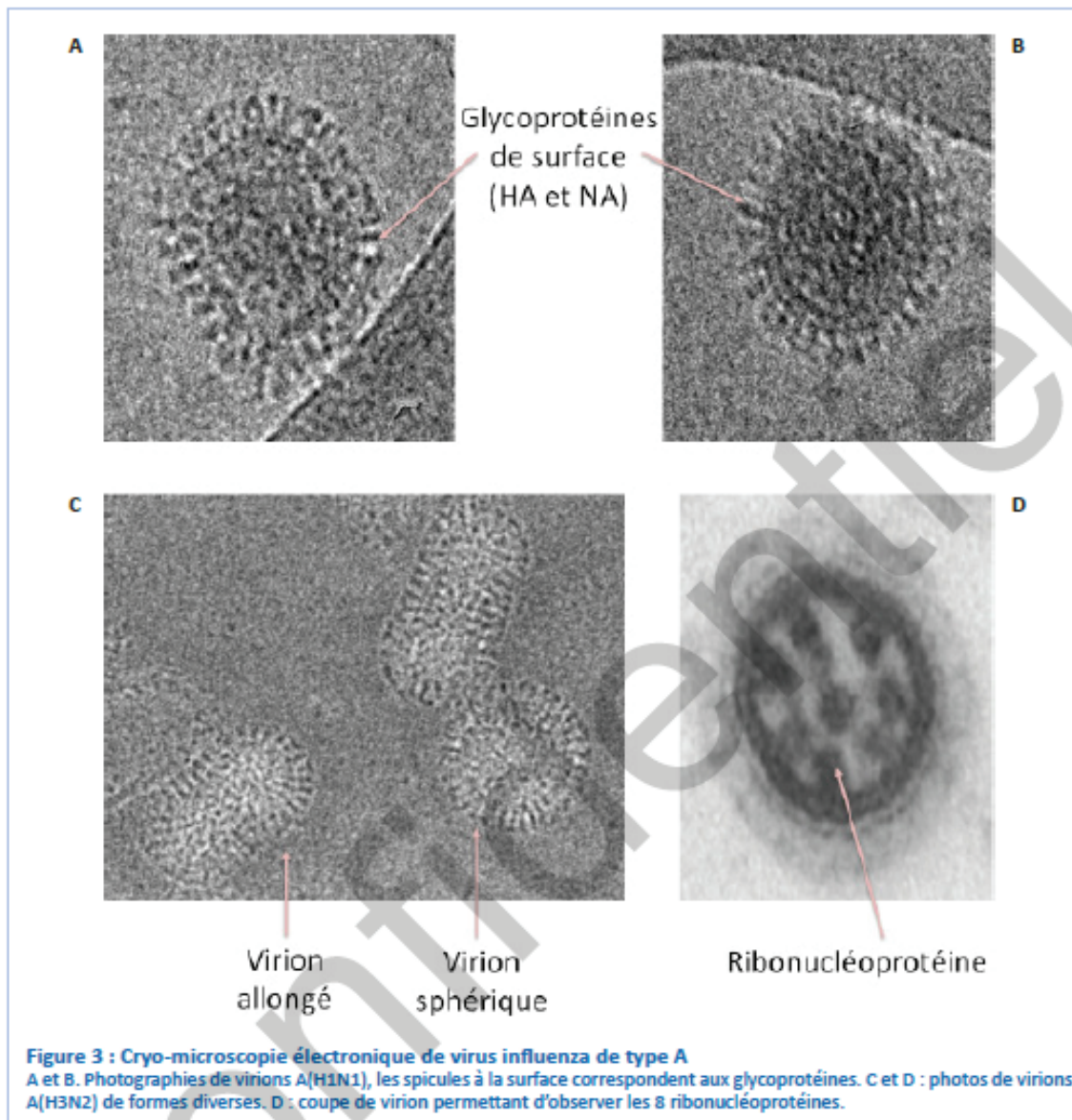


Figure 3 : Cryo-microscopie électronique de virus influenza de type A

A et B. Photographies de virions A(H1N1), les spicules à la surface correspondent aux glycoprotéines. C et D : photos de virions A(H3N2) de formes diverses. D : coupe de virion permettant d'observer les 8 ribonucléoprotéines.

L'enveloppe lipidique du virus, obtenue par bourgeonnement à partir de la membrane cellulaire est couverte sur sa face interne par des oligomères de protéine de matrice de type 1 (M1) (Fig. 4). Les virus de type B présentent une structure proche avec 4 protéines d'enveloppe : HA, NA et NB-BM2 remplaçant la protéine M2 présente chez les virus de type A.

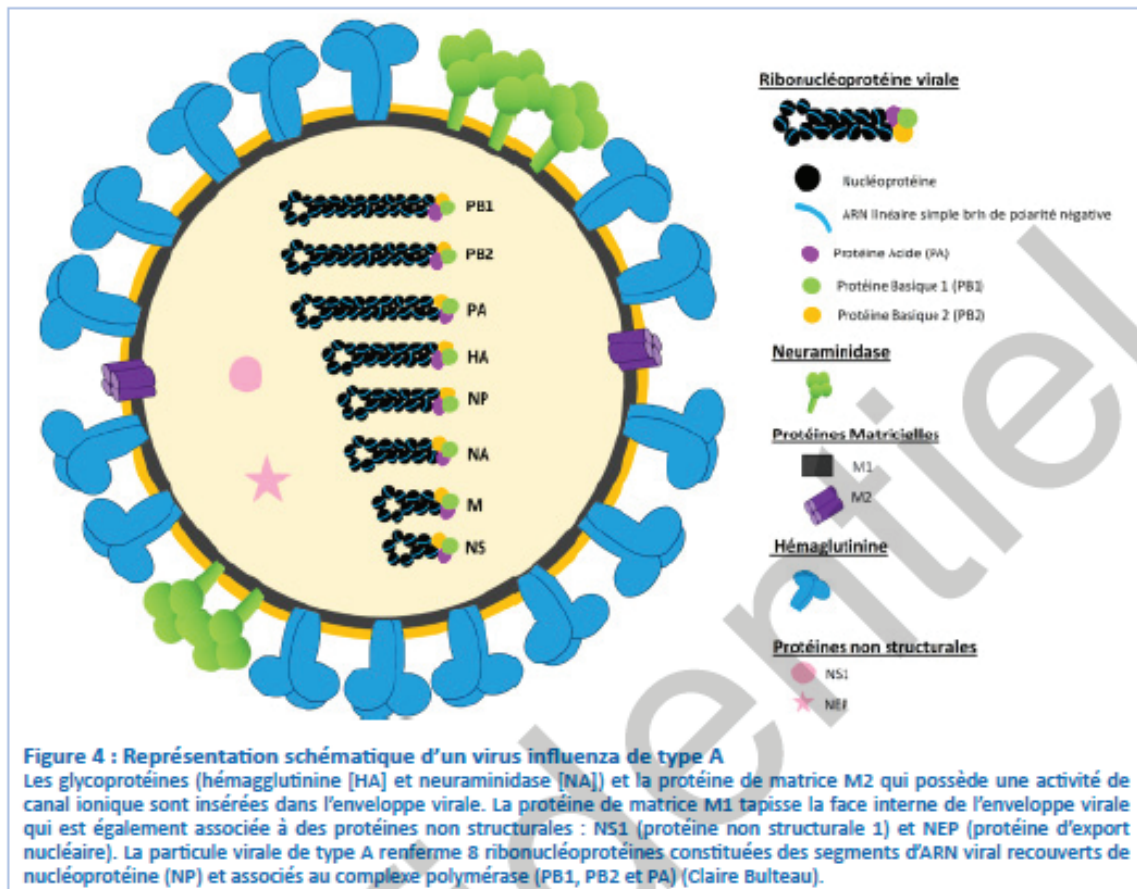
3.3. Génome viral et rôle des protéines virales

Le génome des virus influenza est constitué d'un ARN monocaténaire linéaire de polarité négative, d'environ 13,5 kb, pluri-segmenté (8 segments pour les virus de types A et B, et 7 pour les virus de types C et D). Les segments d'ARN viral (ARNv) sont liés à la nucléoprotéine (NP), l'ensemble interagissant avec les protéines du complexe de la polymérase virale (protéine acide ou PA, protéine basique 1 ou PB1 et protéine

basique 2 ou PB2) pour former les ribonucléoprotéines virales (RNPv, Fig. 4). Les segments codent jusqu'à 17 protéines virales présentant des fonctions variables (Tab. 1).

3.4. Glycoprotéines d'enveloppe

Les virus influenza présentent à leur surface des glycoprotéines possédant des fonctions à la fois complémentaires et antagonistes au cours du cycle de multiplication (Fig. 5). Ces glycoprotéines permettent l'attachement et l'internalisation du virus dans la cellule (HA) mais également sa libération en fin de cycle (NA) grâce à l'utilisation d'une cible cellulaire commune, l'acide sialique (ou acide N-5-acétylneuraminique). Une multiplication virale efficace dépend de la balance HA/NA, c'est-à-dire de l'équilibre entre les fonctions de ces glycoprotéines évaluées par la mesure de



l'affinité de la HA et de l'activité sialidasique de la NA. La balance HA/NA jouerait un rôle important dans l'évolution des virus au sein d'une espèce, notamment pour l'adaptation d'un virus influenza à un nouvel hôte et pour l'émergence de résistance aux inhibiteurs de la NA (INA). Les acides sialiques sont fixés à l'extrémité des glycoprotéines ou glycolipides cellulaires par des liaisons de type $\alpha 2,3$ ou $\alpha 2,6$. La distribution des acides sialiques $\alpha 2,3$ et $\alpha 2,6$ dans l'arbre respiratoire varie en fonction des espèces (voir paragraphe 7.1).

L'hémagglutinine (HA). L'hémagglutinine (HA) représente environ 80% des glycoprotéines de surface des virus A. Les 16 sous-types de HA, dits « classiques », sont répartis en 2 groupes et 4 clades : le groupe 1 contenant les clades H1 (H1, H2, H5, H6, H11, H13, H16) et H9 (H8, H9, H12) et le groupe 2 comprenant les clades H3 (H3, H4, H14) et H7 (H7, H10, H15). Il est à noter que depuis 2013, 2 nouvelles HA ont été décrites chez des virus isolés de chauves-souris (H17 et H18).

Les HA sont organisées en homotrimères dont chaque monomère se compose des 2 chaînes polypeptidiques : la chaîne HA1, composée d'un domaine globulaire contenant un site d'attachement aux acides sialiques (RBS pour *receptor binding site*) et des sites antigéniques ; la chaîne HA2, composée d'une tige fibreuse permettant l'ancrage de la protéine dans

l'enveloppe virale et du peptide fusion. La libération de ces chaînes polypeptidiques se fait par clivage d'un précurseur, HAO, par les protéases spécifiques sécrétées par les cellules non ciliées du tractus respiratoire humain et digestif aviaire. L'efficacité du clivage dépend du sous-type de HA, du pH et des protéases présentes dans le milieu. Les virus influenza aviaires hautement pathogènes (IAHP) (Encadré 2) possèdent une séquence polybasique entre les polypeptides HA1 et HA2 pouvant être clivée par des enzymes ubiquitaires telles que des sérines protéases. Ce clivage facilité permet la multiplication de ces virus en dehors du tractus respiratoire favorisant ainsi la diffusion systémique dans l'organisme infecté.

La neuraminidase (NA). Les neuraminidases représentent 20% des glycoprotéines de surface des virus de type A. Elles sont isolées ou groupées à la surface du virus. Ce sont des enzymes à activité sialidasique hydrolysant le lien entre l'acide sialique et le sucre adjacent. Les NA possèdent 3 rôles majeurs au cours de la multiplication virale. Elles dégradent le mucus riche en acides sialiques, aidant ainsi la progression du virus et l'accès aux cellules épithéliales dans le tractus respiratoire, elles facilitent l'activation des HA et permettent le détachement des nouveaux virions de la surface des cellules hôtes après bourgeonnement.

Tableau 1 : Fonctions des protéines codées par les 8 segments des virus influenza de types A et B

Segment d'ARN viral	Protéine	Fonctions des protéines
1	PB2	Sous-unité du complexe polymérase permettant la reconnaissance de la coiffe 5' des ARNm
2	PB1	Sous-unité du complexe polymérase permettant l'élongation de l'ARNm et avec activité endonucléasique
	PB1-F2 ^a	Activité pro-apoptotique et facteur de virulence
	PB1-N40 ^a	Régulation de l'expression de PB1 par rapport à PB1-F2
3	PA	Sous-unité du complexe polymérase avec activité protéasique
	PA-X ^a	Modulation de la réponse immunitaire et facteur de virulence
	PA-N155 ^a	Fonction inconnue
	PA-N182 ^a	Fonction inconnue
4	HA	Glycoprotéine de surface et antigène majeur ayant un rôle dans la liaison aux acides sialiques et dans la fusion membranaire
5	NP	Rôle dans la liaison, la synthèse et l'export nucléaire des ARN
6	NA	Glycoprotéine de surface avec une activité sialidasique permettant la libération des virions
	NB ^b	Glycoprotéine servant de canal ionique
7	M1	Protéine de matrice permettant l'export nucléaire des RNPv et le bourgeonnement en interagissant avec les RNPv et les glycoprotéines
	M2 ^a	Canal à proton permettant la fusion membranaire et l'assemblage du virion
	BM2 ^b	
	M42 ^a	
8	NS1	Inhibition de la réponse antivirale par antagonisme de l'IFN et rôle dans l'expression cellulaire
	NEP (ou NS2)	Export nucléaire des RNPv
	NS3 ^a	Rôle dans l'adaptation du virus à la souris ?

^a concerne les virus de type A et ^b concerne les virus de type B. HA : hémagglutinine ; M : matrice ; NA : neuraminidase ; NEP : protéine d'export nucléaire ; NS : protéine non structurale ; PA : protéine acide ; PB : protéine basique ; RNPv : ribonucléoprotéine virale.

Les 10 sous-types de NA, dits « classiques », sont classés en 3 groupes : le groupe 1 (N1, N4, N5 et N8), le groupe 2 (N2, N3, N6, N7 et N9) et le groupe 3 composé des NA des virus de type B. Comme pour les HA, 2 nouvelles NA ont été décrites chez des virus isolés de chauves-souris en 2013 (N10 et N11).

La NA est un homotétramère dont chaque monomère se divise en une tige ancrée dans l'enveloppe virale et une tête globulaire portant un site actif qui se fixe aux acides sialiques. Seule la forme tétramérique de la NA présente une activité enzymatique qui dépend des conditions environnementales telles que la température et/ou le pH.

3.5. Nucléoprotéine (NP), complexe polymérase (PA, PB1 et PB2) et protéines mineures

La NP est une des protéines les plus abondantes dans la particule virale et chaque molécule de NP peut s'associer à 24 nucléotides. Cette protéine se fixe à l'ARNv en exposant ses bases vers l'extérieur et permet la formation des RNPv. La NP possède également 2 signaux de localisation nucléaire permettant l'import nucléaire des RNPv.

Le complexe de l'ARN polymérase ARN-dépendante est un hétérotrimère formé de 3 protéines : 2 protéines basiques (PB1 et PB2) et une protéine acide (PA).

Chapitre 39 - Virus influenza

La protéine PB1 porte le domaine catalytique de l'activité de polymérisation ARN-ARN dépendante, ainsi que 2 sites de liaison : un pour les ARNv et un pour les ARNm. La protéine PB2 se lie à la coiffe des ARNm cellulaires avant clivage par la protéine PA (Fig. 5). La protéine PA joue un rôle dans la localisation nucléaire de la synthèse d'ARNv, l'activité de réplication de la polymérase et l'assemblage du génome au moment du bourgeonnement.

La plupart des virus de type A aviaires et humains possèdent une protéine PB1-F2 codée par le segment 2 (Tab. 1) sur un cadre de lecture alternatif en aval de l'ARNm de PB1. L'expression de cette protéine est corrélée à une excrétion massive de virus sans modification de pathogénicité notable. Toutes les souches pandémiques humaines qui contiennent un segment PB1 d'origine aviaire, A(H1N1) de 1918, A(H2N2) de 1957 et A(H3N2) de 1968, codent une PB1-F2 fonctionnelle. La protéine PB1-F2 possède une activité pro-apoptotique sur les cellules monocytaires et neutrophiles, après recrutement par activation de la voie NFκB pro-inflammatoire. Il est démontré, dans le modèle murin, que PB1-F2 favorise la surinfection pulmonaire par les bactéries à Gram positif.

PB1-N40 est la forme tronquée à l'extrémité N-terminale de PB1. Cette protéine découverte en 2009 a été observée dans de nombreuses souches de virus influenza A issues de différentes espèces. PB1-N40 ne semble pas indispensable à la multiplication du virus mais permet une régulation de l'expression des protéines PB1 et PB1-F2, favorisant la multiplication virale.

Chez le virus A(H1N1)pdm2009, le domaine N-terminal de la protéine PA (PA-X) a été identifié comme un facteur responsable de la suppression de l'expression de certains gènes cellulaires permettant une modulation de la réponse immunitaire. Cette protéine est un facteur de virulence.

Enfin, PA-N155 et PA-N182 sont 2 formes tronquées à l'extrémité N-terminale de PA. Ces protéines ont été détectées dans plusieurs souches de virus influenza A issues de différentes espèces. Ces protéines n'ont pas d'activité polymérase et leur rôle n'a pas encore pu être déterminé.

3.6. Protéines de matrice (M1 et M2)

La protéine M1 tapisse la totalité de la surface interne de l'enveloppe virale pour en assurer la rigidité, formant ainsi des liaisons avec la partie intracellulaire des glycoprotéines HA et NA ainsi qu'avec les RNPv. L'accumulation membranaire de la protéine M1 en fin de cycle viral est une étape cruciale de la maturation des virus.

Pour les virus de type A, les tétramères de protéines M2 forment un canal à proton transmembranaire permettant l'acidification de la particule virale indispensable pour le changement de conformation de la HA lors de la décapsidation (Fig. 5).

La protéine M42 est un variant de la protéine M2, transcrite à partir d'un 2nd codon d'initiation. Ce variant n'est présent que dans une minorité de souches du virus influenza A mais elle conserve les domaines majeurs de la protéine M2 lui conférant la même fonction.

Les virus influenza de type B possèdent 2 canaux ioniques formés par la protéine BM2 et la protéine NB codées par 2 segments différents (Tab. 1).

3.7. Protéines non structurales (NS1 et NEP)

NS1 est une protéine non structurale du virion exprimée à de très fortes concentrations dans le noyau de la cellule infectée. Cette protéine est un facteur de virulence par ses fonctions de régulation de la synthèse d'ARNm cellulaires et d'inhibition du système interféron mais joue aussi un rôle dans la régulation de la morphologie du virion.

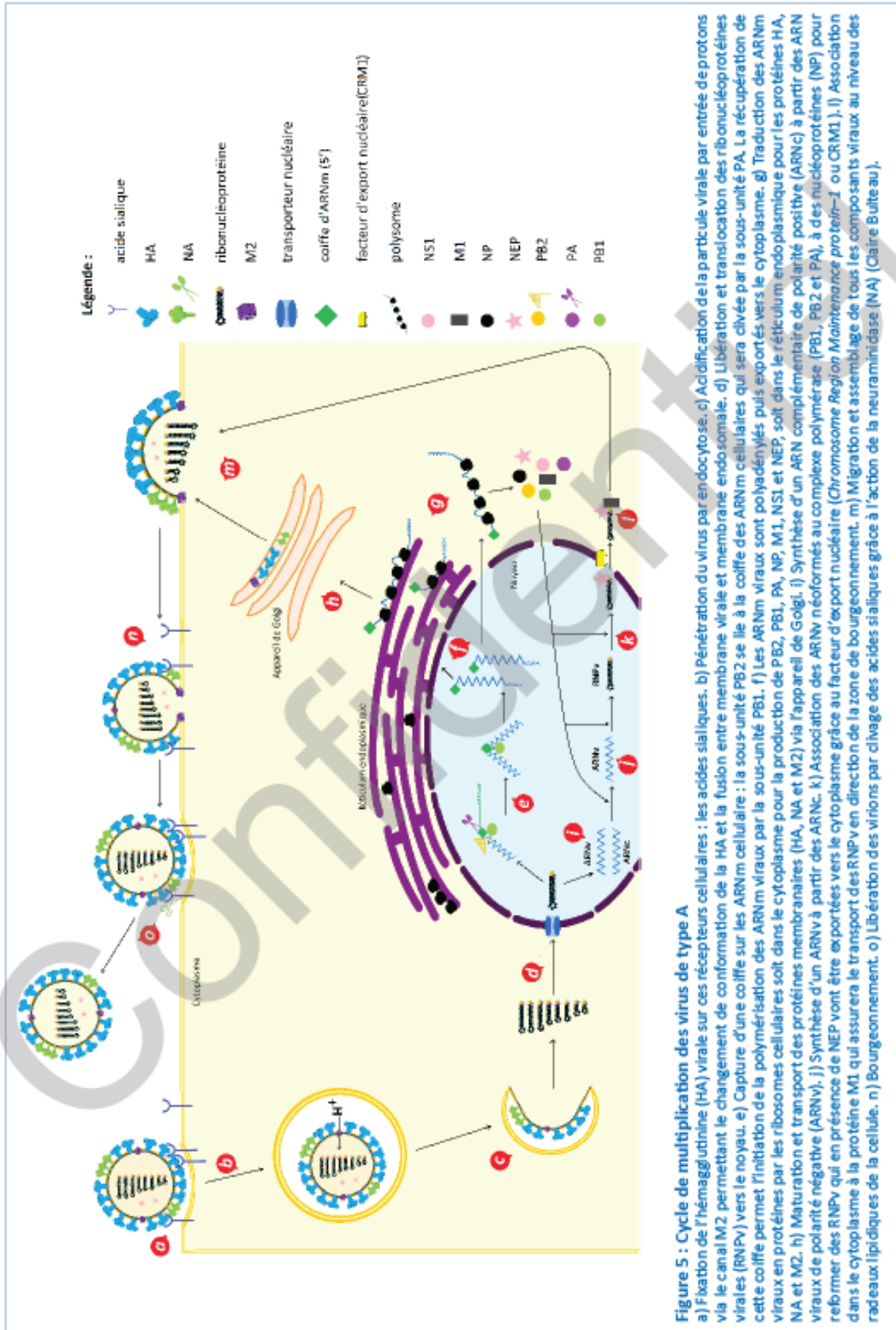
La protéine d'export nucléaire (*nuclear export protein*, NEP) (anciennement NS2) joue un rôle dans la sortie des ARNv hors du noyau puis dans le transport des RNPv vers la membrane cellulaire, en interagissant avec la protéine M1 dans le cytoplasme (Fig. 5). En effet, NEP possède un domaine reconnu par facteur cellulaire d'export nucléaire, le CRM1 (*chromosome region maintenance protein 1*).

NS3 est une isoforme de la protéine NS1 observée dans une minorité de souches du virus influenza A. L'expression de cette protéine est généralement associée à l'adaptation de la souche virale à un nouvel hôte et a été principalement observée lors de l'adaptation de souches humaines chez la souris.

4 - Multiplication du virus : de la cellule au modèle animal

4.1. Multiplication du virus *in vivo*

Le virus se fixe à la cellule cible grâce aux interactions entre la HA et les acides sialiques. Après fixation, le virus est internalisé dans la cellule hôte par endocytose. L'environnement acide de la vésicule endosomale va alors jouer 2 rôles fondamentaux : i) initiation du changement conformationnel des HA permettant l'exposition du peptide de fusion situé à l'extrémité N-terminale de la chaîne HA2, et ii) ouverture du canal à protons M2 permettant l'acidification de la particule virale. L'activation du peptide de fusion de la HA va enclencher le rapprochement et la fusion de la membrane endosomale avec l'enveloppe virale. L'acidification de la particule virale induit également la séparation des RNPv de la couche protéique M1 et la libération des segments viraux dans le cytoplasme cellulaire. Les protéines constituant les RNPv (NP et complexe polymérase) possèdent des signaux reconnus par les facteurs de transport nucléaires



Chapitre 39 - Virus influenza

de la cellule hôte permettant le transit des RNPv du cytoplasme vers le noyau. Après le passage des pores nucléaires, les ARNv vont servir de matrice pour la transcription et la réplication.

La transcription en ARNm commence par la capture d'une coiffe sur les ARNm cellulaires par le complexe polymérase. La sous-unité PB2 se lie à la coiffe des ARNm cellulaires qui sera clivée par la sous-unité PA. La récupération de la coiffe permet l'initiation de la polymérisation des ARNm viraux par la sous-unité PB1. A la fin de la transcription, les ARNm viraux sont polyadénylés puis exportés vers le cytoplasme pour la traduction en protéines. La synthèse de PB2, PB1, PA, NP, M1, NS1 et NEP se fait directement dans le cytoplasme tandis que celle des protéines ancrées dans l'enveloppe virale (HA, NA et M2) se fait dans le réticulum endoplasmique. Ces protéines membranaires subissent ensuite des modifications post-traductionnelles puis sont transportées *via* l'appareil de Golgi vers la membrane cellulaire.

Les ARNv vont également être utilisés pour la réplication du génome viral par la synthèse d'un ARN complémentaire de polarité positive (ARNc). Les ARNc restent dans le noyau et s'associent aux protéines NP et au complexe polymérase pour former des RNP complémentaires (RNPC). Enfin, les RNPC vont servir de matrice à la synthèse des ARNv de polarité négative pour reformer des RNPv.

L'export nucléaire des RNPv vers le site d'assemblage est possible grâce à des interactions entre les ARNv, la protéine NEP et un facteur cellulaire d'export nucléaire, le CRM1. Une fois dans le cytoplasme, la protéine NEP présente sur les RNPv va interagir avec la protéine M1 pour permettre le transport du génome viral vers la surface cellulaire. L'assemblage des particules virales se fait de façon ordonnée au niveau des raieaux lipidiques de la membrane cytoplasmique et se termine par le bourgeonnement des virions grâce aux interactions entre les protéines M1, M2 et les parties cytoplasmiques des glycoprotéines. À l'extérieur de la cellule, les virions sont libérés par l'activité sialidasique des NA.

Ce cycle de multiplication virale est similaire pour tous les types de virus influenza (Fig. 5). Pour les virus de type B, l'acidification de la particule virale se fait, comme pour les virus de type A, par l'activation de canaux ioniques : les protéines NB et BM2.

4.2. Culture cellulaire *in vitro*

Différentes lignées cellulaires sont utilisées pour l'isolement des virus influenza, ainsi que des autres virus respiratoires : LLC-MK2 (cellules de rein de singe rhésus), Vero (cellules de rein de singe africain), A549 (cellules de carcinome de poumon humain), Hep-2 (cellules de carcinome de larynx humain) et MRC-5 (fibroblastes embryonnaires de poumon humain). Certaines lignées sont spécifiquement dédiées à la culture des virus influenza comme les MDCK (cellules

de rein de chien Madin-Darby) qui sont les plus performantes pour l'amplification de ce virus. En effet, ces cellules possèdent à leur surface de nombreux acides sialiques α 2,3 et α 2,6. Par ailleurs, les cellules 293T (cellules embryonnaires de rein humain) sont utilisées dans les protocoles de génétique inverse pour la production de virus recombinants dans un contexte de recherche. Des lignées modifiées ont également été développées telles que les MDCK-SIAT qui surexpriment par rapport aux cellules MDCK standards, les acides sialiques α 2,6. Ces lignées favorisent l'infection cellulaire par des virus influenza humains et réduit le risque d'apparition de mutations d'adaptation sur l'hémagglutinine du virus amplifié en cas de passages successifs sur cellules. Plus récemment ont été développés des systèmes de culture en 3D constitués de protéines et de composants de matrice extracellulaire. Ces systèmes permettent de reproduire plus fidèlement l'expression protéique, la survie et la prolifération, la différenciation et le métabolisme des cellules au cours de l'infection.

4.3. Multiplication virale sur modèles animaux

Plusieurs modèles animaux existent et sont utilisés pour diverses applications. Leur sensibilité à l'infection virale, les sites de multiplication des virus, le développement de symptômes et la létalité dépendent de la nature et de la répartition des récepteurs acides sialiques dans l'organisme de chaque animal.

Bien que la souris ne soit pas naturellement infectée par les virus influenza, elle est un modèle largement répandu pour l'étude moléculaire des interactions virus-hôte. La plupart des virus influenza humains n'entraînent pas de maladie létale sans adaptation préalable. En revanche, les virus aviaires se multiplient dans le tractus respiratoire de la souris. Le développement des souris *knock-out* permet de mieux comprendre la contribution de la génétique et de la réponse immunitaire de l'hôte dans la virulence et la pathogénicité des virus influenza.

Le furet est le modèle animal de choix pour l'étude de la clinique et de la transmissibilité des virus influenza. En effet, le furet infecté par un virus influenza développe une rhinite fébrile plus ou moins associée à des atteintes bronchiques et pulmonaires.

Le cobaye est également un modèle intéressant pour l'étude de la transmission des virus influenza et de leur pathogénicité. Les virus humains, porcins et aviaires peuvent être détectés dans les poumons et le nasopharynx des animaux infectés, suggérant une multiplication efficace du virus, sans pour autant présenter de signes cliniques de la maladie. Ces animaux ne meurent pas d'infection grippale, même après infection par des souches très pathogènes telles que le virus A(H5N1) hautement pathogène ou le virus A(H1N1) pandémique de 1918.

Les virus influenza infectent divers primates non humains tels que les chimpanzés, les gibbons, les

babouins, les macaques crabiers (ou cynomolgus), les rhésus et les singes-écureuils. Ces modèles développent des symptômes de grippe identiques à ceux observés chez l'être humain et constituent donc d'excellents modèles pour étudier la pathogénicité des virus influenza bien qu'ils soient plus difficiles à utiliser (coût, conditions de confinement ...). Des travaux ont déjà été réalisés dans ces modèles pour évaluer la pathogénicité des virus influenza A(H1N1) de 1918, A(H5N1) aviaires et plus récemment A(H1N1)pdm09.

5 - Épidémiologie des infections grippales humaines

5.1. Circulation, saisonnalité et impact des virus influenza

La grippe est une maladie infectieuse virale aiguë associée chaque année à une morbidité et une mortalité très importantes. A l'échelle mondiale, l'OMS recense entre 3 et 5 millions de cas sévères et 290 000 à 650 000 décès par an. En France, au cours de l'épidémie grippale 2016-2017 qui a duré 6 semaines, ont été enregistrées plus de 2 millions de consultations ambulatoires, 40 000 admissions aux urgences et 7 600 hospitalisations. Parmi les patients hospitalisés, 1 sur 5 (1 300) a présenté une forme sévère nécessitant une prise en charge en réanimation. En plus de l'impact médical, la grippe est associée à un coût financier annuel majeur (plus de 100 millions d'euros) pour la société (arrêts de travail, absentéisme pour garde d'enfants ...).

Chaque épidémie saisonnière est différente, allant de la circulation d'un seul sous-type de virus de type A ou B à la co-circulation de 2 à 3 virus (Fig. 6). Dans tous les pays tempérés de l'hémisphère Nord, l'épidémie de grippe saisonnière peut débuter dès le mois de décembre et durer 6 à 12 semaines. Dans les zones tempérées de l'hémisphère Sud, l'épidémie de grippe est observée pendant l'hiver austral (janvier à août) selon une dynamique similaire à celle de l'hémisphère Nord. Enfin, dans les zones tropicales et intertropicales, le virus circule toute l'année, préférentiellement durant la saison humide. Il arrive donc qu'il y ait dans ces régions, deux pics épidémiques significatifs durant la même année. Ainsi, les zones tempérées sont probablement réensemencées chaque hiver à partir des zones intertropicales.

5.2. Mécanismes d'évolution des virus influenza

Les virus influenza connaissent une évolution génétique et antigénique rapide. En effet, sous la pression de sélection immunitaire de la population humaine principalement, les glycoprotéines de surface HA et NA évoluent selon deux mécanismes : la dérive antigénique ou « *drift* » et plus rarement la cassure antigénique ou « *shift* ».

Dérive antigénique. La dérive antigénique s'explique par des modifications mineures ou majeures d'au moins 1 des 2 glycoprotéines de surface (HA et/ou NA), au niveau des acides aminés des sites antigéniques. Ces substitutions d'acides aminés sont très fréquentes pour les virus influenza car ils possèdent une ARN polymérase ARN-dépendante sans fonction correctrice, ce qui entraîne des mutations aléatoires à la fréquence de 1/10 000 nucléotides.

Les HA et NA humaines évoluent bien plus rapidement que les segments internes (PB2, PB1, PA, NP et M1) car la pression de sélection exercée par le système immunitaire de l'hôte est plus importante vis-à-vis de ces protéines de surface. Chez l'être humain, une dérive antigénique est observée pour les 3 types de virus selon des modèles différents (Fig. 7). Par exemple, les virus influenza du type A évoluent rapidement au sein d'un même lignage. Ceci explique que le virus circulant durant un hiver n'est pas totalement neutralisé par les anticorps de la population parce qu'il est différent du virus responsable de l'épidémie de l'hiver précédent. Les virus du types B et C évoluent plus lentement.

Cassure antigénique et émergence d'un virus pandémique. Une cassure antigénique survient quand le changement observé modifie le sous-type de la HA ou de la NA du virus. Généralement, elle est le résultat d'un phénomène de réassortiment génétique suite à l'échange de segments d'ARN génomique lors de la coinfection d'une même cellule par 2 virus influenza A différents (voir chapitre 2). Les 2 génomes issus de chacun des virus influenza sont alors répliqués puis transcrits dans les mêmes compartiments cellulaires (Fig. 5) et vont pouvoir s'associer en fin de cycle pour donner un nouveau virion potentiellement composé d'un mélange de segments d'origines différentes. Lorsque ce nouveau virus arbore une glycoprotéine différente des virus circulant dans la population humaine, il s'agit d'un nouveau sous-type viral potentiellement pandémique.

Ce phénomène de réassortiment génétique peut être observé entre des virus issus d'hôtes différents. Par exemple, le réassortiment entre des virus humains et aviaires est à l'origine des virus pandémiques A(H2N2) de 1957 et A(H3N2) de 1968 tandis que le virus pandémique A(H1N1) de 2009 est issu d'un quadruple réassortiment entre des virus d'origines différentes (porcine, aviaire et humaine) (Fig. 8).

Une cassure antigénique peut également être observée lors de l'apparition de changements majeurs au niveau des HA ou NA d'un virus influenza A à l'origine de l'émergence d'un nouveau virus dans une population immunologiquement naïve vis-à-vis de ce sous-type. En 1918, un virus A(H1N1) aviaire s'est progressivement adapté à l'être humain suite à une modification majeure du site de reconnaissance RBS de son hémagglutinine. Ce virus aviaire a été introduit chez l'être humain par transmission directe depuis le réservoir aviaire provoquant ainsi la pandémie de « grippe espagnole » de 1918 (Fig 1).

Chapitre 39 - Virus influenza

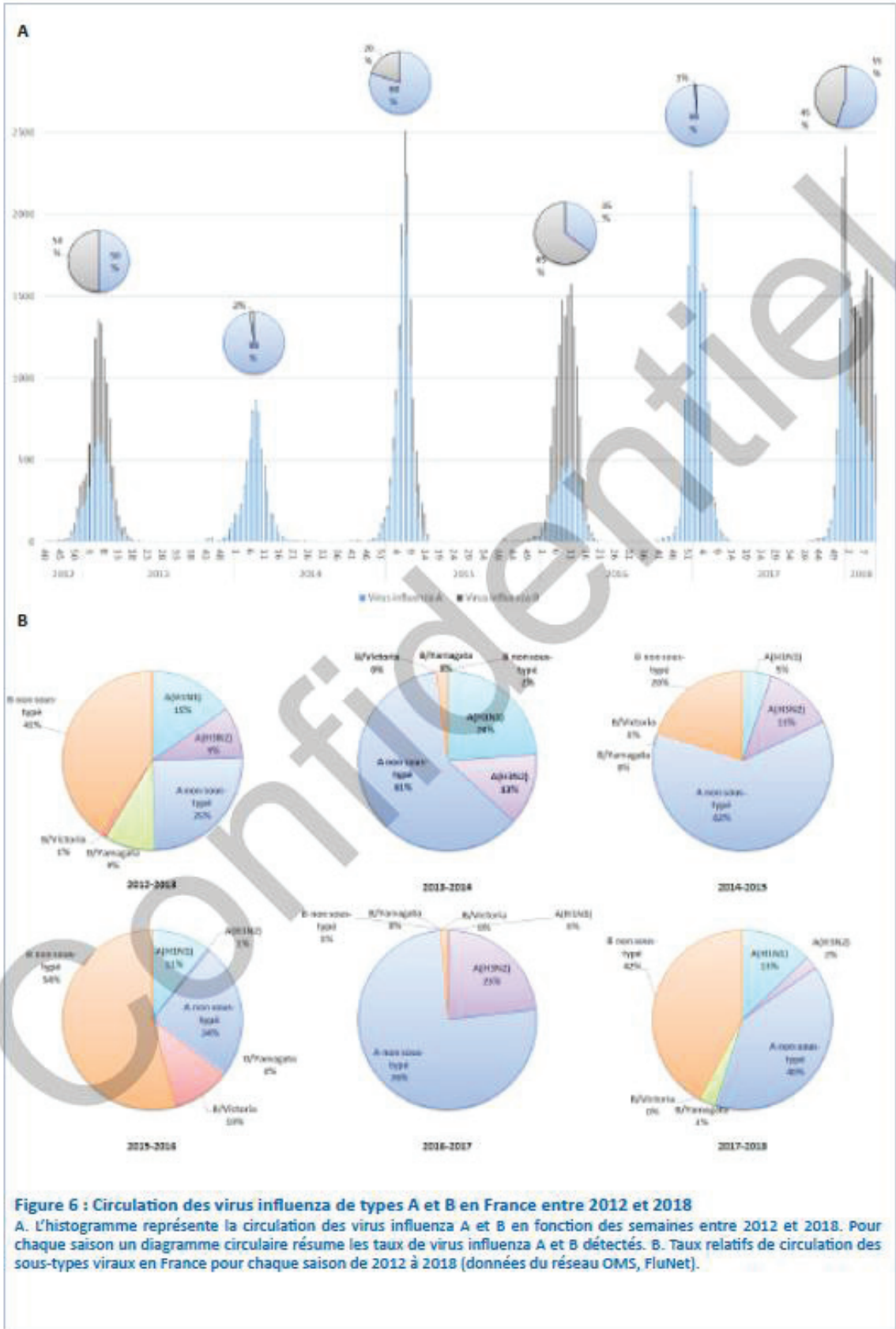
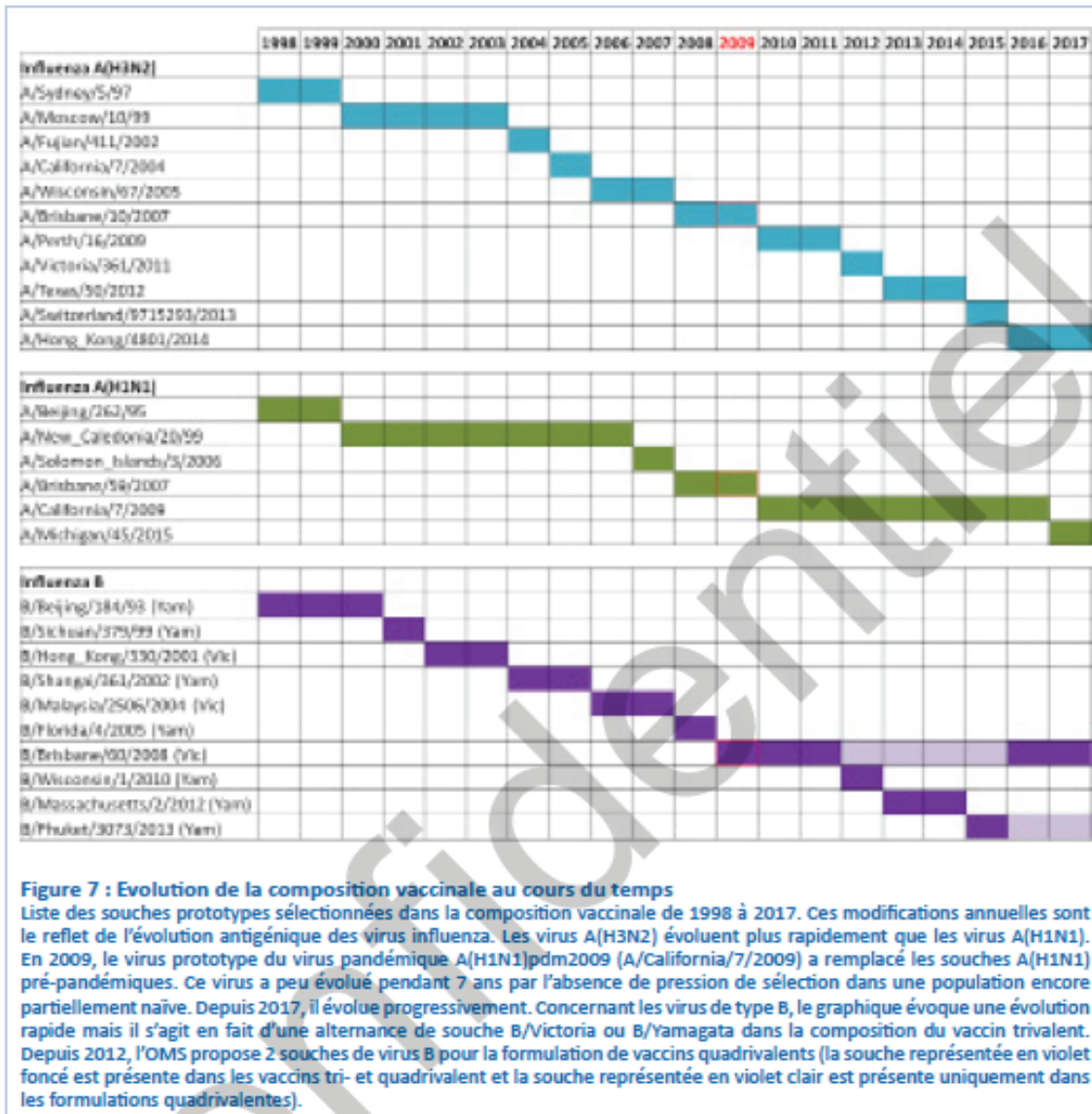


Figure 6 : Circulation des virus influenza de types A et B en France entre 2012 et 2018
 A. L'histogramme représente la circulation des virus influenza A et B en fonction des semaines entre 2012 et 2018. Pour chaque saison un diagramme circulaire résume les taux de virus influenza A et B détectés. B. Taux relatifs de circulation des sous-types viraux en France pour chaque saison de 2012 à 2018 (données du réseau OMS, FluNet).



5.3. Réseaux de surveillance des virus influenza et de la grippe

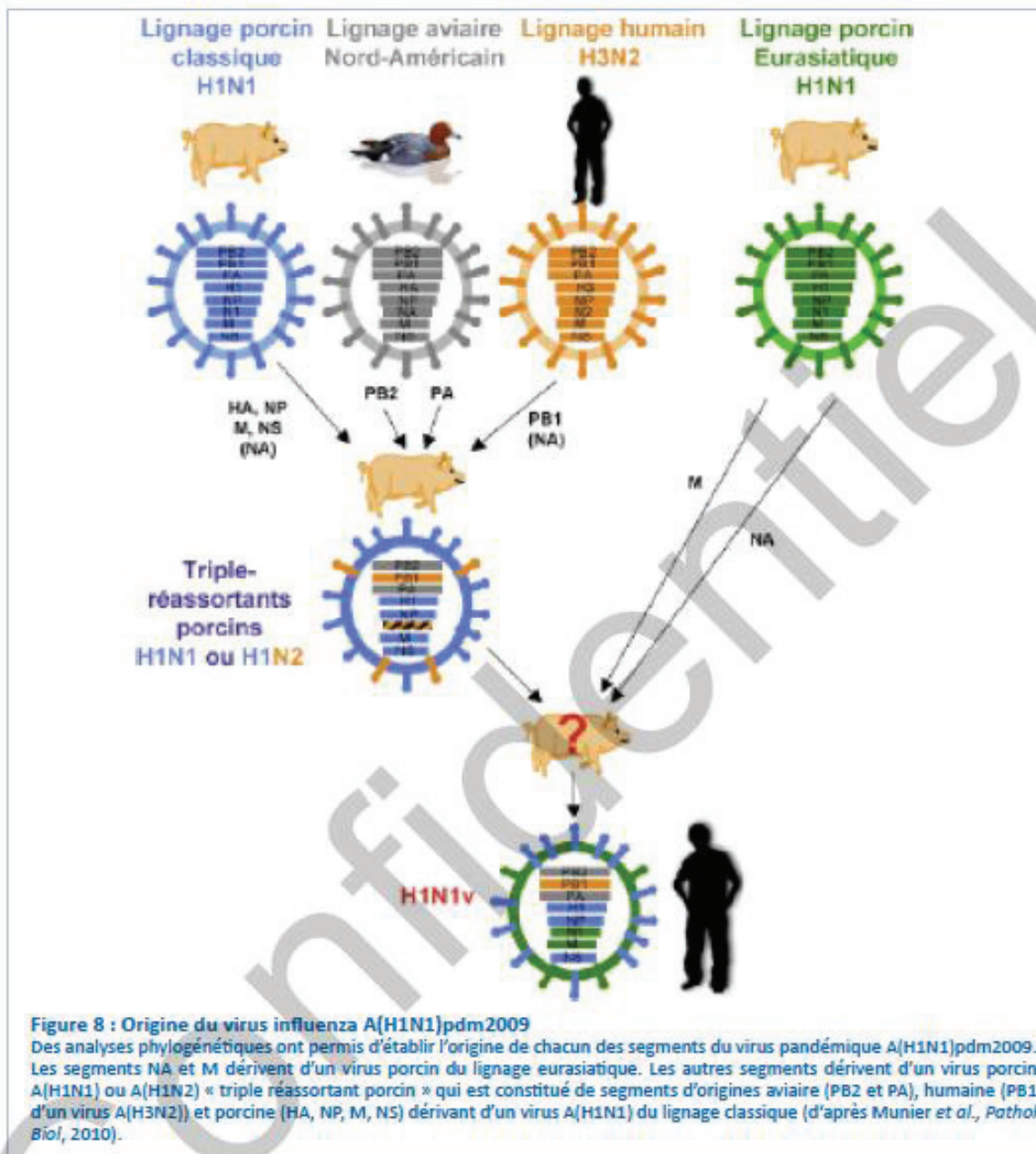
En raison de leur variabilité et du risque d'émergence de nouveaux virus, les virus influenza sont parmi les virus les plus surveillés à l'échelle mondiale. La surveillance virologique des virus influenza a pour objectifs : i) la détection et la caractérisation des 1^{er} virus circulant chaque année, ii) l'identification de la population cible (âge), iii) le suivi hebdomadaire du nombre de cas, et iv) l'évolution des virus influenza circulants sur le territoire ainsi que l'étude des variations antigéniques et génétiques des virus circulants pour évaluer la concordance entre virus circulants et vaccin. Cette dernière mission suppose aussi d'envoyer des souches représentatives de l'épidémie vers les centres de référence mondiaux de l'OMS afin de déterminer la composition vaccinale pour l'hiver suivant. Enfin, les CNR doivent aussi

caractériser des virus émergents (virus zoonotiques isolés chez l'être humain par exemple) et donner l'alerte en cas d'apparition d'un événement inhabituel (comme l'émergence de résistance aux antiviraux, de formes cliniques inhabituelles ou d'émergence et/ou la diffusion d'un virus zoonotique). Les acteurs de la surveillance sont exposés dans l'encadré 1.

6 - Physiopathologie et pouvoir pathogène chez l'être humain

6.1. Pouvoirs infectieux et pathogène

La grippe est une infection des voies aériennes supérieures pouvant évoluer vers une infection des voies aériennes inférieures. Le principal site



de multiplication des virus est l'épithélium de la muqueuse du nasopharynx (Fig. 9). L'infection peut ensuite se propager de proche en proche le long de l'arbre respiratoire jusqu'aux alvéoles pulmonaires et provoquer un tableau de pneumonie virale dont la complication ultime est le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA).

6.2. Mode de transmission

La transmission est principalement aérienne mais elle peut être également manuportée. La transmission se fait par inhalation ou contact au niveau des conjonctives de gouttelettes de salive infectée. Le patient infecté est contagieux durant 5 à 8 j, avec un

maximum d'excrétion virale à 48 h. Il est également contagieux 12 à 24 h avant le début des symptômes (Fig. 10).

Des travaux récents ont montré que le virus pouvait rester infectieux plusieurs jours sur des surfaces inertes (tables, poignées de porte) ainsi que sur des pièces de monnaie et des billets de banque permettant une transmission manuportée.

Le R_0 , indicateur mathématique évaluant la contagiosité d'un virus, est pour le virus influenza estimé entre 1,4 et 2,8 selon les études, il reste donc plus faible que celui d'autres virus comme celui de la rougeole ($R_0 = 18$) ou des oreillons ($R_0 = 10$).

6.3. Pathogénèse

D'une façon générale, les enfants sont plus fréquemment infectés car plus exposés que les adultes avec un taux d'attaque, quel que soit le virus, jusqu'à 10 fois supérieur. Cependant, le nombre de formes graves et de décès est beaucoup plus faible chez l'enfant que chez les individus de plus de 65 ans, ces derniers présentant très souvent des facteurs de risque

cliniques (Tab. 2). Chez certains virus, la plus grande pathogénicité observée s'explique par l'acquisition par ces virus de facteurs de virulence (Tab. 3).

Le pouvoir pathogène des virus influenza est différent en fonction du type et du sous-type viral. Le virus A(H1N1)pdm09 présente des similitudes antigéniques avec les virus A(H1N1) ayant circulé entre 1945 et 1955 (Fig. 1).

Encadré 1 : Réseaux de surveillance des virus influenza et de la grippe

Au niveau mondial, le système global de surveillance et de réponse de l'OMS (*WHO global influenza surveillance and response system*, GISRS) réalise ses missions via des laboratoires de référence. En 2017, le réseau comportait environ 140 CNR (dont 3 en France : à l'Institut Pasteur de Paris, à l'Institut des Agents Infectieux des Hospices Civils de Lyon et à l'Institut Pasteur de Guyane), 6 centres collaborateurs (Melbourne en Australie, Beijing en Chine, Tokyo au Japon, Londres au Royaume-Uni, Atlanta et Memphis aux Etats-Unis) ainsi que 4 Laboratoires de régulation essentiels (Woden en Australie, Tokyo au Japon, Hertfordshire en Angleterre et Silver Spring aux Etats-Unis). Certains outils sont utilisés pour la collecte de données de surveillance en temps réel tel que le réseau FluNet.

En France, la surveillance repose sur les prélèvements réalisés par un réseau de médecins généralistes et de pédiatres (Réseau Sentinelle). Les données virologiques sont associées à des données épidémiologiques de terrain (activité médicale, vente d'antipyrétiques ...). Ces données cumulées permettent d'estimer chaque semaine le nombre de cas de grippe, ainsi que la dynamique de l'épidémie grippale. En complément de cette surveillance communautaire, il existe aussi une surveillance hospitalière basée sur le Réseau National des Laboratoires Hospitaliers (RENAL) qui rapporte chaque semaine le nombre d'analyses réalisées sur des prélèvements respiratoires, ainsi que le nombre d'infections confirmées. Ces données ne comportent pas d'information clinique mais complètent celles de la surveillance communautaire. Enfin, ces informations sont centralisées par Santé publique France et les centres d'interventions en régions. Des données complémentaires (nombre de passages aux urgences pour syndrome grippal via le réseau d'organisation de la surveillance coordonnée des urgences (OSCOUR), nombre de cas de grippe grave hospitalisés en réanimation, et nombre de cas de syndrome grippal vus par SOS Médecins) sont également collectées afin de préciser l'impact de la grippe sur le système de santé lui permettant ainsi d'adapter son organisation en temps réel. Enfin l'ensemble de ces informations sont communiquées sous la forme de bulletins hebdomadaires transmis à l'ECDC et à l'OMS.

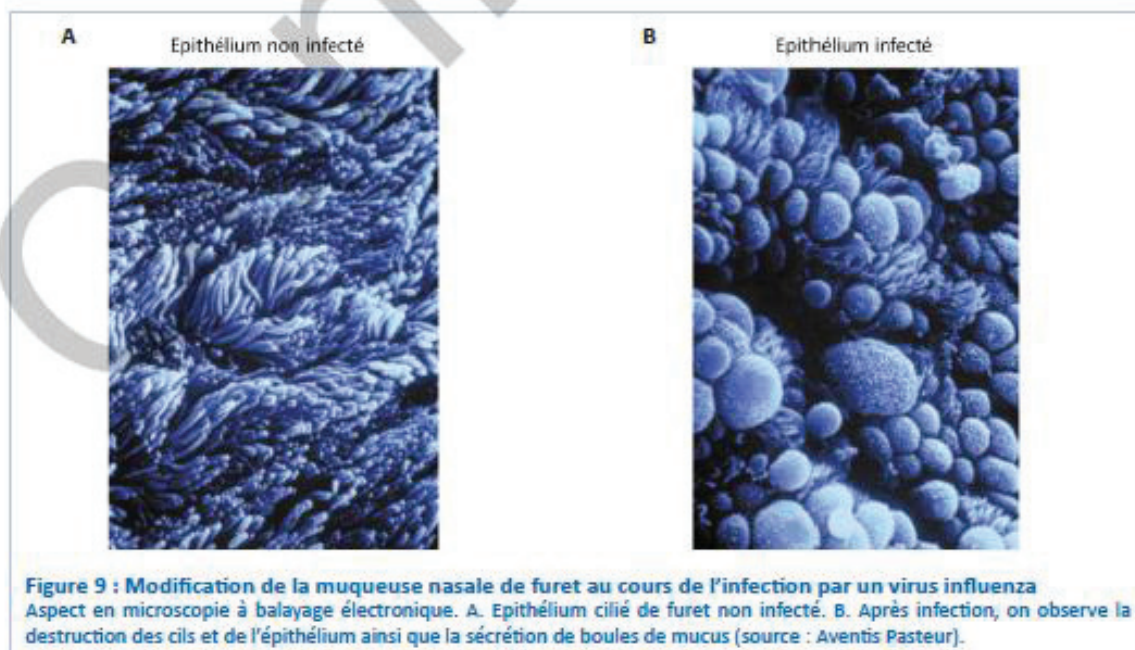
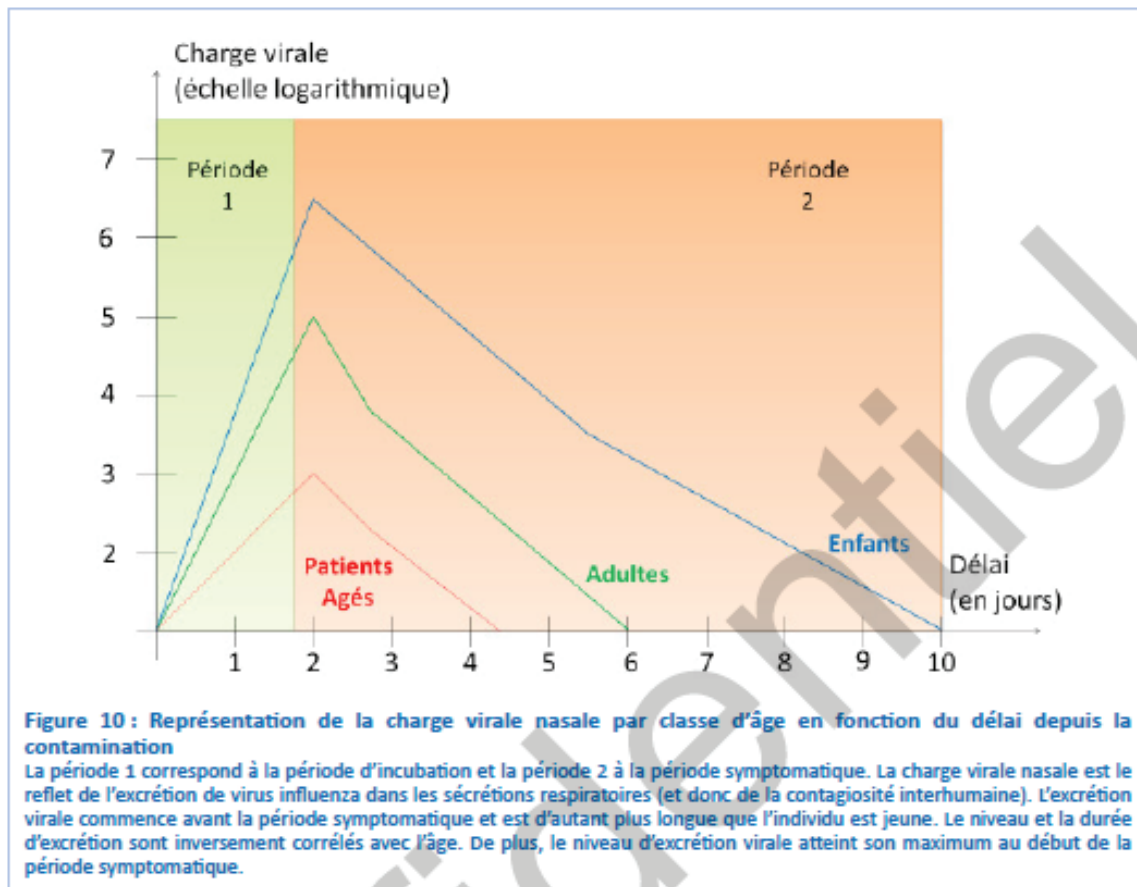


Figure 9 : Modification de la muqueuse nasale de furet au cours de l'infection par un virus influenza
Aspect en microscopie à balayage électronique. A. Epithélium cilié de furet non infecté. B. Après infection, on observe la destruction des cils et de l'épithélium ainsi que la sécrétion de boules de mucus (source : Aventis Pasteur).



Les personnes de plus de 65 ans sont donc moins touchées lorsqu'elles sont exposées à ce sous-type car ils ont une immunité résiduelle qui les protège d'une forme sévère. Le virus A(H1N1)pdm09 continue à toucher essentiellement les adultes jeunes (immunologiquement naïfs) de 40 à 55 ans et c'est dans cette classe d'âge que sont majoritairement observés les SDRA.

Les virus A(H3N2) circulant actuellement sont significativement différents des virus ayant préalablement circulé dans la population. De plus, ils évoluent plus vite sur le plan antigénique (Fig. 7) et sont donc à l'origine d'épidémies de plus grande ampleur avec un impact très important chez les personnes de plus de 65 ans. Au cours des épidémies dues au virus A(H3N2) sont observés de nombreux foyers dans les établissements hospitaliers pour personnes âgées dépendantes (EHPAD) avec des taux d'attaque allant jusqu'à 70% pour une létalité de 5% à 8%.

Les virus influenza de type B, quant à eux, sont à l'origine d'épidémies plus modérées, touchant principalement les enfants d'âge scolaire (entre 5 et 15 ans) sous la forme de tableaux cliniques simples associés à des douleurs abdominales. Ce type d'épidémie épargne relativement, mais pas complètement, les adultes et les personnes âgées.

6.4. Formes cliniques de la grippe

La grippe est une rhinopharyngite polymorphe, ce qui rend impossible la description d'un tableau unique caractéristique de l'infection par le virus influenza. Différentes définitions de cas probables de grippe existent. La définition de l'ECDC repose sur l'association d'au moins un symptôme systémique (fièvre, maux de tête, altération de l'état général ou myalgie) et d'un symptôme respiratoire (toux, pharyngite, dyspnée). La définition de l'OMS considère comme une forme clinique de grippe toute toux fébrile dans les 10 j précédant la consultation. Face à ces hétérogénéités, il est important de comprendre qu'il existe de nombreuses formes cliniques de grippe, d'évolution variable et dont le diagnostic de certitude repose quasi exclusivement sur la confirmation virologique.

La grippe dite « simple » est une infection due au virus influenza qui ne nécessite pas d'hospitalisation. La triade fièvre, toux et fatigue est le plus souvent retrouvée. En fonction de l'âge, la fièvre peut être plus ou moins élevée (faible chez la personne âgée, majeure chez l'enfant). Il est possible de voir une grande variété de symptômes allant de formes symptomatiques majeures à des tableaux cliniques frustrés (Tab. 4). Plus de 30% des personnes infectées restent asymptomatiques, sans que leur participation à la dissémination du virus soit certaine.

Tableau 2 : Principaux facteurs de risques cliniques et biologiques prédisposant à des formes sévères de la maladie grippale

Facteurs de risque	Principales situations
Facteurs cliniques constitutionnels	<ul style="list-style-type: none"> • Age supérieur à 65 ans • Cardiopathies congénitales cyanogènes ou avec HTAP • Valvulopathies graves • Drépanocytose • Thalassémie • Déficit immunitaire primitif • Prématurité jusqu'à l'âge de 1 an
Facteurs cliniques acquis	<ul style="list-style-type: none"> • Pathologie chronique (asthme, BPCO, insuffisance respiratoire chronique, dysplasie bronchopulmonaire, mucoviscidose, valvulopathies graves, troubles du rythme cardiaque, coronaropathies, antécédent d'accident vasculaire cérébral avec ou sans paralysie, affections neuro-musculaires graves, néphropathies chroniques graves, diabète, déficit immunitaire ...) • Vie dans un établissement de soins de suite ainsi que dans un établissement médico-social d'hébergement (quel que soit l'âge) • Obésité (IMC \geq 40) • Grossesse
Facteurs génétiques	<p>De nombreuses mutations touchant les gènes suivants ont été décrites comme facteurs de risque dans la maladie grippale :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Voie des ATPases et GTPases (ATP6VOD1, Rab5-Rab7 ...) • Complexe d'internalisation des vésicules de clathrine • Complexe NuP (NuP98 et NuP153) • Protéine de choc thermique (HSP90 ...) • ADN polymérase (ADN pol III ...) • Protéines de la cascade du phosphatidyl-inositol • Cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, IL-17, TNF ...)
Facteurs environnementaux	<ul style="list-style-type: none"> • Microbiome altéré par prise d'antibiotique préalable • Surinfection bactérienne

BPCO : bronchopneumopathie chronique obstructive ; HTAP : hypertension artérielle pulmonaire ; IMC : indice de masse corporelle ; NuP : nucléoprotéine.

Bien que polymorphe, le syndrome grippal est classiquement un tableau d'asthénie fébrile douloureuse à début brutal. D'autres signes sont généralement associés : des signes respiratoires (de gravité variable en fonction du terrain), des signes généraux et une ré-ascension de la fièvre assez évocatrice entre le 2^e et le 3^e j (« V grippal »). Le virus est présent dans les voies aériennes supérieures quelques heures avant le début des symptômes et jusqu'à 3 à 5 j après, chez l'adulte, contre 7 à 10 j chez l'enfant (Fig. 10). Le risque de transmission à partir d'un patient infecté est directement corrélé à la quantité de virus excrétée (maximum à 48 h puis faible après 5 à 7 j). En revanche, les symptômes, reflets de la réponse immunitaire dirigée contre le virus, peuvent être encore présents à distance, notamment la fatigue, les myalgies et les arthralgies. Ce tableau clinique, spontanément régressif, ne nécessite généralement que repos et traitement symptomatique.

Certaines personnes, parce qu'elles présentent des facteurs de risque (âge ou pathologie chronique sous-jacente) sont susceptibles de développer des

complications au décours de la grippe (Tab. 2). Les surinfections bactériennes sont les complications les plus fréquentes (25% à 50% des complications). Elles sont observées à tout âge mais surtout aux âges extrêmes de la vie. Chez la personne de plus de 65 ans, ces surinfections sont principalement dues à des bactéries à Gram positif : *Streptococcus pneumoniae* surtout, ou *pyogenes* dans une moindre mesure), *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae* (en régression depuis la vaccination). Des surinfections des voies aériennes supérieures sont également observées chez l'enfant, principalement ceux ayant des antécédents d'otites moyennes aiguës à *Streptococcus pneumoniae* ou *Moraxella catharralis*, ou les enfants âgés de 6 mois à 1 an. Souvent bénignes, elles entraînent une persistance de la fièvre au-delà d'1 semaine et nécessitent le recours à une antibiothérapie adaptée.

Les individus présentant des pathologies cardio-respiratoires (telles que asthme, bronchopneumopathie obstructive ou insuffisance cardiaque) ont un risque important de voir leurs pathologies sous-jacentes se

Chapitre 39 - Virus influenza

Tableau 3 : Principaux facteurs modifiant la virulence du virus influenza et/ou sa résistance aux inhibiteurs de neuraminidase

Segment concerné	Mutation décrite dans la littérature	Impact sur la pathogénie virale
HA	Modification du site de clivage	Si disparition : défaut de fusion des membranes (diminution de virulence) Si présence d'un site polybasique : clivage par des enzymes ubiquitaires favorisant la diffusion des virus dans l'organisme (augmentation de virulence)
	D190E - D225G	Défaut d'attachement aux acides sialiques (diminution de virulence)
PB2	E627K	Amélioration de la multiplication virale notamment à 33°C (adaptation à l'être humain)
	D701N	Amélioration de la liaison à l'importine des mammifères (adaptation à l'être humain)
	R591-G590S	Amélioration de la multiplication virale (augmentation de virulence)
	E158G	Amélioration de la multiplication virale (augmentation de virulence)
PB1	S66N	Diminution de la virulence des souches virales Augmentation de la survenue des infections secondaires
	Del 11 AA	Abolition des facteurs de transcription
	E92D	Amélioration de la multiplication virale en présence d'IFN (augmentation de virulence)
NA	H275Y - I223R/V - S247N - N295S	Résistance de niveau variable aux INA : A(H1N1) (augmentation de virulence)
	R292K - N294S - E119V	Résistance de niveau variable aux INA : A(H3N2) (augmentation de virulence)
	R150K - D197N/E/Y - I222T/L - S249G - N294S - R374K	Résistance de niveau variable aux INA : virus influenza B (augmentation de virulence)
M	L26F - V27A - A30T - S31N	Mutation canal à proton - Résistance constante aux adamantanes (augmentation de virulence)
NS2	M16I	Amélioration de la multiplication virale (augmentation de virulence)

AA : acides aminés ; Del : délétion ; INA : inhibiteurs de neuraminidase.

décompenser au cours de la grippe. Les individus atteints de pathologies métaboliques (diabète, obésité morbide), d'affections associées à une immunodépression (cancer, infections virales chroniques) et les femmes enceintes sont identifiés comme à risque de développer des formes graves (Tab. 2).

Des manifestations neurologiques peuvent être observées. Elles sont dues à une réponse pro-inflammatoire excessive lors de la réponse immunitaire à l'infection (« orage cytokinique »), expliquant que la recherche du virus dans le LCS reste très souvent négative (50% à 90% suivant les études) et que dans 75% des cas les signes neurologiques sont absents au début des symptômes respiratoires. Les complications les plus fréquentes chez le jeune enfant sont les convulsions simples, d'évolution favorable,

expliquées par la forte hyperthermie. Des formes neurologiques plus sévères telles que des encéphalites ou des tableaux d'encéphalopathie sont rapportés associant des convulsions généralisées, des troubles du comportement ou un coma pouvant entraîner le décès. Des formes familiales d'encéphalopathies, et une plus forte prévalence de complications neurologiques (encéphalites) observées dans les populations asiatiques (japonaise et taïwanaise), suggèrent l'existence d'une prédisposition génétique au développement de ces formes neurologiques.

Des syndromes de Reye peuvent survenir en cas de prise d'acide acétylsalicylique chez l'enfant au cours d'une grippe (contre-indication formelle). Ce syndrome associe des atteintes hépatiques (stéatose) et neurologiques (encéphalopathie).

Tableau 4 : Fréquence des signes cliniques d'une grippe simple

Signe clinique	% des cas présentant cette symptomatologie
Asthénie	85
Fièvre - Frisson	85
Céphalée	70
Myalgie	65
Toux	60
Rhinorrhée	80
Expectoration	60
Mal de gorge	45
Nausée - Vomissement	55
Douleur abdominale	10
Diarrhée	5

Des myosites, parfois très invalidantes, sont observées lors d'infection chez l'enfant par un virus influenza de type B. Ces myosites aiguës sont souvent rapidement régressives, sans séquelles.

La grippe est également l'une des étiologies fréquentes du syndrome de Guillain-Barré (réaction auto-immune contre le système nerveux périphérique entraînant des paralysies progressives).

Enfin, des complications réno-vasculaires ont été rapportées mais restent rares : rhabdomyolyses sévères, syndromes hémolytiques et urémiques, coagulations intravasculaires disséminées, insuffisances rénales aiguës, glomérulonéphrites aiguës, tubulopathies interstitielles et syndromes de Goodpasture. De rares cas de myocardites ont également été rapportés.

Exceptionnellement, certaines formes de grippe évoluent en « grippe maligne » avec un tableau d'atteinte pulmonaire extrêmement sévère de type SDRA. Ce tableau clinique nécessite des manœuvres de réanimation complexes telles que l'ECMO (méthode d'oxygénation extracorporelle). Ces formes cliniques peuvent survenir chez tous les individus bien que les femmes enceintes soient particulièrement à risque du fait d'une modification des volumes sanguins et des conditions cardiovasculaires durant la grossesse. Au décours d'une grippe banale, le patient se plaint d'un essoufflement plus ou moins prononcé. Cette notion de dyspnée doit être considérée comme un signal d'alarme devant motiver l'hospitalisation rapide du

patient. En effet, l'évolution en SDRA est très brusque avec une dégradation des fonctions respiratoires, un œdème pulmonaire aigu et une défaillance multi-viscérale. Malgré une prise en charge adaptée en réanimation, avec ventilation mécanique ou parfois la mise sous ECMO, le taux de mortalité reste très élevé (plus de 30%). En cas de guérison, elle est complète et sans séquelles pulmonaires.

7 - Virus zoonotiques

Les virus influenza de type A peuvent infecter un grand nombre d'espèces animales différentes : les mammifères dont l'être humain, la volaille domestique (poules, oies ...) mais leur réservoir est constitué par les oiseaux sauvages aquatiques (canards, cygnes ...). Chez les mammifères, il existe une spécificité d'espèce en fonction des sous-types viraux. Par exemple, les virus A(H3N8) infectent les phoques, les chiens et les chevaux tandis que les virus A(H3N2), plutôt les chats, les chiens, les porcs et l'être humain. En revanche, parmi les 198 combinaisons HxNx possibles, seuls 117 sous-types viraux ont été décrits dont 115 ont été observés dans le réservoir aviaire et 2 uniquement chez la chauve-souris (Fig. 11). Ces derniers semblent très éloignés des autres virus influenza, notamment du fait d'une HA qui ne se fixe pas au même type de récepteur et d'une NA qui ne possède pas d'activité sialidasique.

Les virus de type B, principalement humains, ont également été décrits chez les phoques suite à un transfert d'une souche humaine en 1995. Expérimentalement, ces virus sont également capables d'infecter les porcs et les furets.

7.1. La restriction d'hôte et la barrière d'espèce

La pathogénicité et la restriction d'hôtes des virus influenza de type A dépendent en grande partie des spécificités de fixation des HA aux acides sialiques et de la répartition anatomique des acides sialiques en fonction des espèces (Fig. 12). Les HA des virus humains reconnaissent préférentiellement les acides sialiques α 2,6 présents au niveau de l'épithélium respiratoire supérieur chez l'être humain et seront donc principalement responsables d'infections respiratoires hautes (gripes saisonnières). A l'opposé, les HA des virus aviaires fixent avec une meilleure affinité les acides sialiques α 2,3 présents au niveau de l'intestin et au niveau supérieur des voies aériennes chez l'oiseau, mais au niveau inférieur des voies aériennes chez l'être humain. Les virus aviaires seront donc plus facilement responsables chez l'être humain d'infections respiratoires basses (pneumonies virales). Le porc possède autant de récepteurs α 2,3 que α 2,6 au niveau de son tractus respiratoire, il peut donc être infecté aussi bien par des virus influenza d'origine aviaire, humaine et porcine. Le porc est donc un maillon important de la chaîne de transmission et

Chapitre 39 - Virus influenza

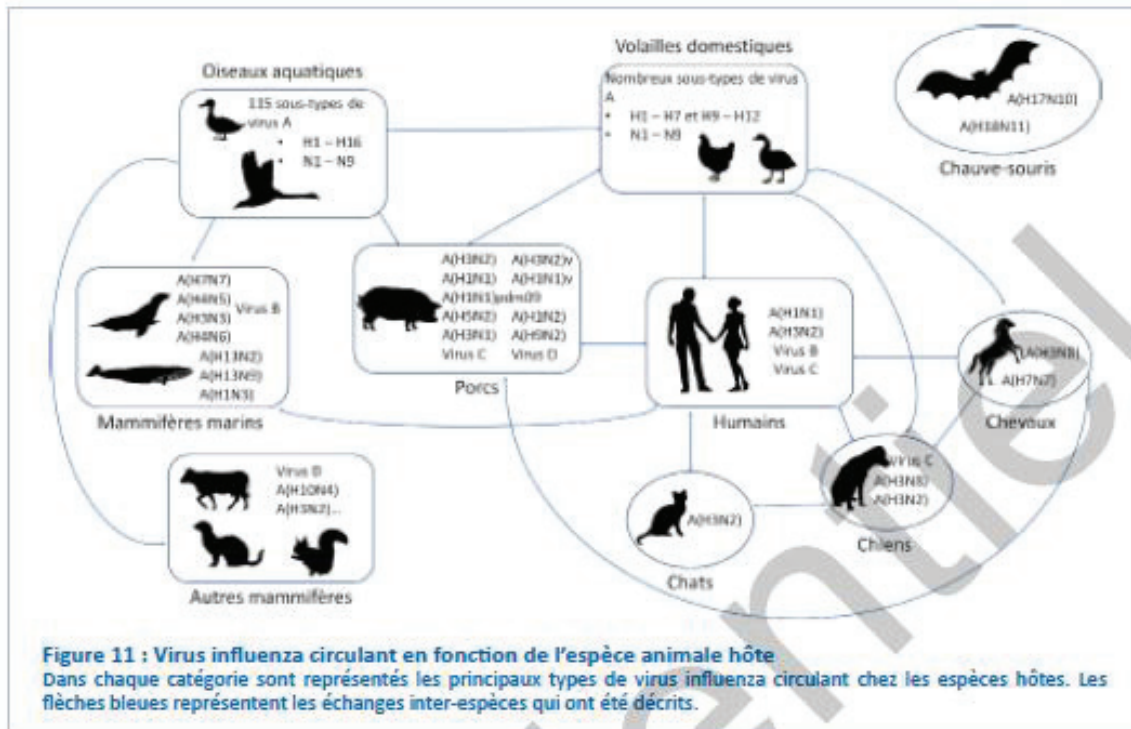


Figure 11 : Virus influenza circulant en fonction de l'espèce animale hôte
Dans chaque catégorie sont représentés les principaux types de virus influenza circulant chez les espèces hôtes. Les flèches bleues représentent les échanges inter-espèces qui ont été décrits.

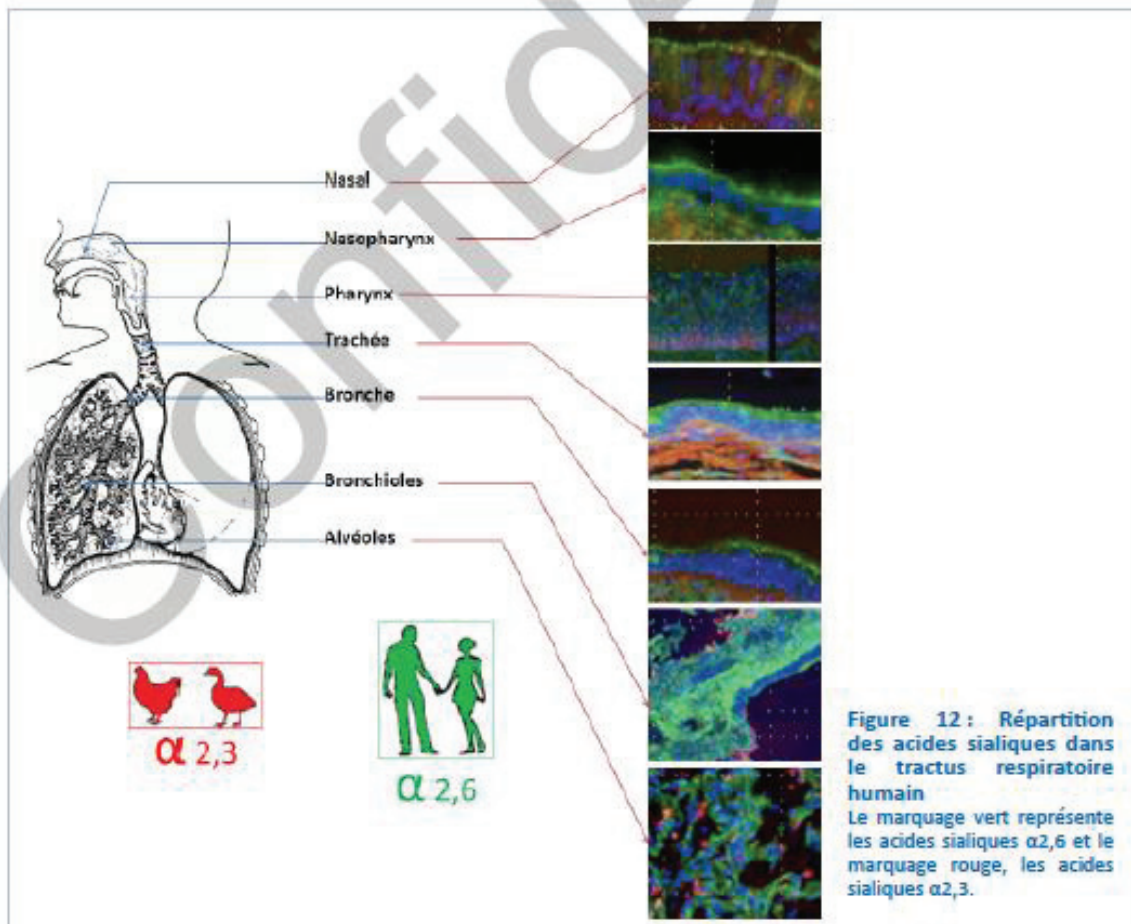


Figure 12 : Répartition des acides sialiques dans le tractus respiratoire humain
Le marquage vert représente les acides sialiques $\alpha 2,6$ et le marquage rouge, les acides sialiques $\alpha 2,3$.

d'adaptation des virus zoonotiques, facilitant à la fois l'adaptation des virus aviaires aux mammifères et les échanges de gènes entre différents sous-types. Cette espèce joue donc un rôle majeur dans l'émergence de virus potentiellement pandémiques (exemple du virus A(H1N1)pdm09).

La spécificité de reconnaissance des acides sialiques par les HA ne suffit pas à expliquer la spécificité d'espèce des virus influenza, la NA joue un rôle également. Les NA fixent à la fois les acides sialiques $\alpha 2,3$ et $\alpha 2,6$ mais elles clivent les acides sialiques $\alpha 2,3$ avec une meilleure efficacité, cette efficacité variant en fonction de l'adaptation du virus à son hôte. C'est la balance entre la HA et la NA qui est fondamentale pour permettre au virus d'avoir un bon « fitness », c'est-à-dire de réaliser une infection, une multiplication et une transmission efficaces (Fig. 13).

Les autres segments d'ARN génomique jouent aussi un rôle important dans la spécificité d'hôte, notamment les sous-unités du complexe polymérase qui doivent être fonctionnelles dans le nouvel hôte. Par exemple, le résidu 627 de la protéine PB2 est un acide aminé important qui serait impliqué dans la virulence et la restriction d'hôte. Les virus aviaires qui possèdent une protéine PB2 avec une lysine en position 627 sont plus virulents et se répliquent à des températures plus basses favorisant l'infection des voies aériennes supérieures chez l'être humain.

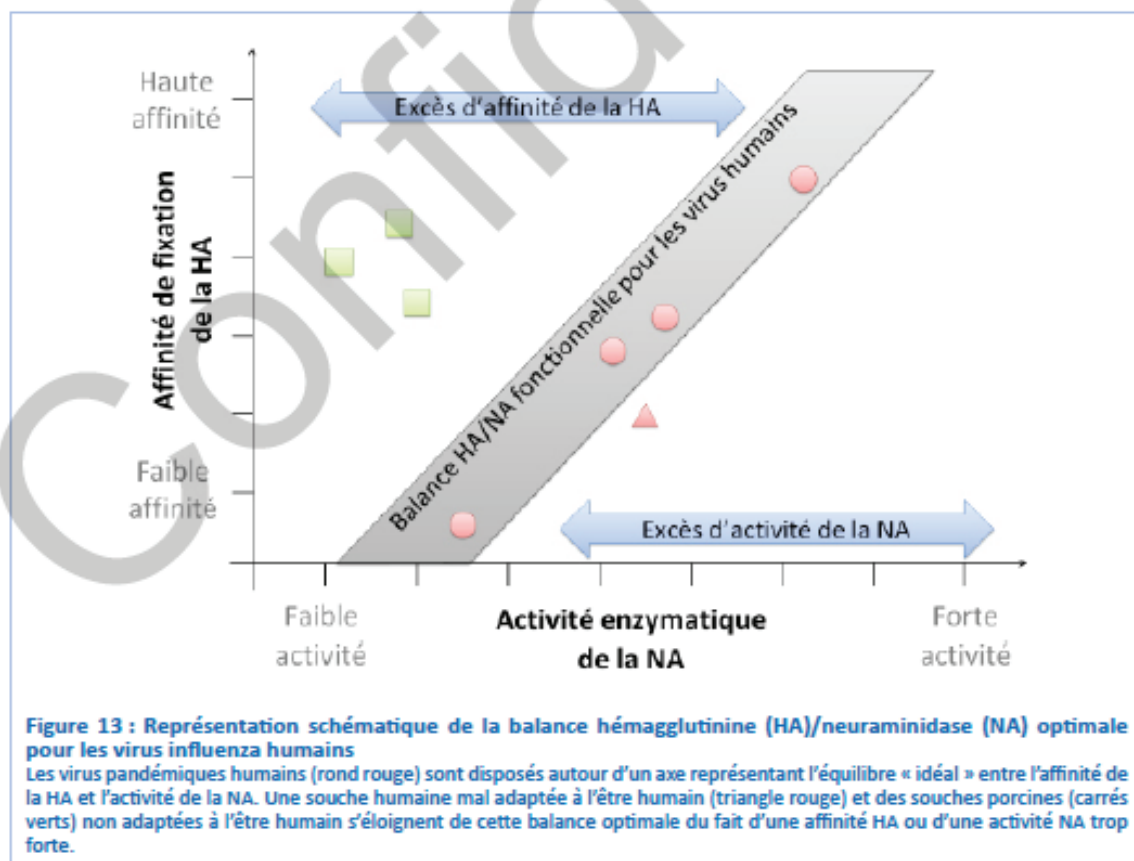
Les infections occasionnelles d'une espèce par un virus influenza de type A d'une autre espèce peuvent entraîner l'adaptation et la circulation de ce virus dans son nouvel hôte. Cette adaptation nécessite le franchissement d'un certain nombre d'obstacles (dits « barrière d'espèce »). Trois étapes fondamentales doivent être franchies avant qu'un virus Influenza ne puisse s'adapter à un nouvel hôte : i) la transmission entre 2 espèces nécessite des contacts étroits entre l'espèce infectée et l'espèce réceptrice, ii) la réalisation de cycles de multiplication complets chez le nouvel hôte, et iii) la transmission entre individus de la nouvelle espèce. Les 2 dernières étapes peuvent se faire par mutations ou réassortiments successifs, directement dans le nouvel hôte ou dans un hôte intermédiaire (porc par exemple).

7.2. Epizooties par les virus aviaires et porcins

Les virus influenza de type A sont responsables d'épizooties (infections chez les animaux) chez les oiseaux (Encadré 2) ou les porcs (Encadré 3).

7.3. Infections humaines par des virus aviaires et porcins

Chez l'être humain, la grippe aviaire et les autres gripes zoonotiques entraînent des manifestations diverses allant de la conjonctivite bénigne à la pneumopathie sévère pouvant être mortelle. Les caractéristiques



Chapitre 39 - Virus influenza

Encadré 2 : Epizootie due au virus influenza A chez les oiseaux

Chez les oiseaux, on distingue 2 types de souches virales circulantes de pathogénicité différente : les virus influenza aviaires faiblement (IAFP) ou hautement (IAHP) pathogènes. Un virus devient hautement pathogène s'il possède un site de clivage polybasique dans la HA et/ou s'il provoque une surmortalité au cours d'infections expérimentales chez la poule. Indispensable, le site de clivage polybasique n'est pas suffisant pour expliquer la pathogénicité dans d'autres espèces, notamment chez l'être humain.

La majorité des virus influenza retrouvés chez les oiseaux sauvages sont des IAFP qui se multiplient au niveau du système digestif et sont excrétés dans les fientes ce qui facilite leur dissémination par contamination fécale-orale. Ces virus sont généralement responsables d'infections asymptomatiques, d'où leur sous-estimation, ou de tableaux associant de légers signes respiratoires à une diminution du taux de ponte des volailles d'élevage. A l'opposé, les infections par des virus IAHP sont plus rares mais s'accompagnent d'une mortalité quasi-systématique par diffusion systémique du virus dans tous les organes des volailles domestiques. En revanche, les oiseaux sauvages présentent une mortalité plus faible lors d'une infection par un virus IAHP et participent donc à la dissémination de ces virus.

L'infection de la volaille domestique se fait soit par contact direct avec des fientes infectées provenant des oiseaux sauvages (d'où l'importance des élevages couverts), soit par transmission à bas bruit entre exploitations (mouvement de personnel, de matériels ou d'animaux). Les épidémies détectées dans les exploitations commerciales ont des répercussions économiques du fait de l'abattage nécessaire de tout l'élevage et sanitaires pour les exploitants et leur entourage.

Depuis 2014, 77 pays ont rapporté la détection de 13 sous-types de virus aviaires. Actuellement, différentes souches, A(H5N1), A(H5N2), A(H5N6), A(H5N8), A(H7N8), A(H7N9), sont à l'origine, régulièrement, de foyers d'infections aviaires sous haute surveillance des autorités de santé publique. En France, les hivers 2015-2016 et 2016-2017 ont été marqués par des épizooties majeures dues à la circulation de virus IAHP dans de nombreuses exploitations du Sud-Ouest. En 2015-2016, une grande diversité de souches, A(H5N1), A(H5N2) et A(H5N9) ne provenant pas de la faune sauvage, ont été responsables d'infections dans plus de 80 exploitations. Ces virus, apparentés à des virus influenza identifiés comme faiblement pathogènes, avaient acquis un site de clivage polybasique par accumulation de mutations. Le virus possédant cette H5 devenue hautement pathogène fut, *a priori*, l'ancêtre commun des différents sous-types détectés qui ont émergé progressivement après réassortiments génétiques successifs. En 2016-2017, l'épizootie de plus de 450 foyers d'infection fut déclenchée par l'introduction et la circulation d'un virus A(H5N8) hautement pathogène provenant de la faune sauvage. Les virus A(H5N8) ont été détectés pour la 1^{re} fois en 2010 et diffusent depuis dans le monde entier et particulièrement en Europe. Ces 2 exemples d'épizootie d'origines différentes illustrent la complexité des moyens à mettre en œuvre pour la surveillance et le contrôle de la circulation des virus aviaires.

Encadré 3 : Epizootie due au virus influenza A chez les porcs

Chez le porc, les infections par le virus influenza A sont responsables d'une symptomatologie souvent frustrée. Elles se manifestent majoritairement par des écoulements nasaux, une toux, des difficultés respiratoires et parfois des conjonctivites.

Le très grand nombre de sous-types différents de virus porcins est le résultat de nombreux événements d'introduction de virus humains ou aviaires et de réassortiment entre virus chez ce mammifère facilement infecté par des virus d'origines diverses. Les réassortiments étudiés sont nombreux ces dernières années, probablement à cause des pratiques d'élevage mais aussi de l'intensification de la surveillance de ces animaux. À l'opposé, le glissement antigénique est plus lent que chez l'être humain car leur durée de vie est beaucoup plus courte. Les virus A(H1N1), A(H1N2) et A(H3N2) sont devenus panzootiques chez le porc et cocirculent actuellement dans le monde. Ces sous-types viraux sont subdivisés en lignées génétiques dépendantes de leur région de circulation (Amérique, Europe et Asie).

L'épidémiologie des virus porcins est de plus en plus complexe. Entre 2009 et 2013, 14 lignages de virus différents issus de réassortiments ont été identifiés dans des exploitations porcines en Europe.

de la maladie (période d'incubation, sévérité des symptômes et pronostic clinique) dépendent du sous-type de virus responsable de l'infection. L'ensemble des infections humaines par des sous-types aviaires rapportées est résumé dans le tableau 5. Les infections liées aux virus A(H5N6), A(H5N1) et A(H7N9) ont été responsables d'un tableau clinique sévère avec une évolution très rapide en pneumonie virale associée dans certains cas à un SDRA ou une défaillance multiviscérale. Les infections par les virus A(H5N6) sont graves mais très peu nombreuses. Les infections les plus fréquentes sont dues aux virus A(H5N1) et A(H7N9) (Encadré 4).

Les virus porcins sont responsables de zoonoses généralement asymptomatiques ou bénignes. Dans

de rares cas, les infections sont plus sévères voire mortelles. Elles touchent environ 75% des personnes en contact avec des porcs. Depuis 2010, le virus A(H3N2) variant (noté A(H3N2)v) ayant acquis le gène M du virus A(H1N1)pdm09 est devenu le principal responsable d'infections humaines en Amérique du Nord. Plus de 370 cas d'infections par ce virus ont été recensés avec un pic en 2012 (296 cas). Depuis, le nombre de cas a nettement diminué et reste stable autour d'une dizaine de déclarations par an grâce à la mise en place de recommandations d'hygiène clairement expliquées aux usagers de parcs d'attractions, très répandus aux Etats-Unis, dont toutes les activités sont en lien avec des porcs et de contrôles de ces installations.

Encadré 4 : Point sur les infections humaines par les virus A(H5N1) et A(H7N9)

Virus A(H5N1)

Les 1^{ers} foyers d'infection par le virus A(H5N1) ont été rapportés en 1997 à Hong Kong avec 18 cas humains dont 6 décès. Le virus avait déjà été isolé dans des fermes du Sud de la Chine avant le 1^{er} cas humain rapporté. C'est en 2003 que de nombreux cas humains ont été de nouveaux diagnostiqués ; depuis, un total de 860 cas ont été signalés dans 16 pays avec un taux de mortalité supérieur à 50%. En 2006, le virus se répand en Europe de l'Ouest et en Afrique. Cette extension sensibilise les autorités sanitaires de nombreux pays qui s'organisent pour élaborer des plans de préparation à une éventuelle pandémie. C'est en Egypte, en 2015, qu'a été observé le plus grand nombre de cas d'infections humaines par ce virus (136 cas). Depuis, le nombre de cas ne fait que diminuer chaque année.

Depuis 2003, la plupart des cas sont de jeunes adultes ou des enfants, tous exposés à des oiseaux contaminés sur des marchés d'animaux vivants ou hébergés à leur domicile, après des opérations de plumage ou de jeux. Seuls un contact étroit et une exposition à une très forte quantité de virus rendent possible la contamination et aucune transmission interhumaine de ce virus n'a pour l'instant été démontrée. Ces individus ont présenté, en plus du tableau respiratoire, des symptômes extra-pulmonaires (conjonctivites, troubles gastro-intestinaux et/ou cytolysse hépatique). La mortalité, fortement liée à l'âge, dépend également de la précocité de la prise en charge.

Virus A(H7N9)

Depuis 2013, le virus A(H7N9), apparu en Chine, cause des vagues épidémiques au cours de chaque saison hivernale. Il est le virus aviaire responsable du plus grand nombre d'infections humaines et tous les cas rapportés ont un lien avec la Chine. Le virus A(H7N9) est un virus faiblement pathogène chez l'oiseau, alors que chez l'être humain il cause des infections respiratoires sévères avec un taux de mortalité d'environ 40%. Au cours de l'hiver 2016-2017, la vague épidémique a été particulièrement importante, représentant à elle seule plus d'1/3 des 1 565 cas décrits depuis 2013.

Le virus A(H7N9) a émergé *via* le réassortiment d'au moins 4 virus aviaires : A(H7N3) pour le gène HA, A(H2N9) et/ou A(H11N9) pour le gène NA, et 2 sous-groupes génétiquement distincts de virus A(H9N2) pour les 6 autres gènes. Les virus A(H9N2) sont très surveillés car ils possèdent un fond génétique stable capable de se réassortir avec d'autres gènes de HA et de NA, soutenant l'émergence de nouveaux virus ; ainsi les virus A(H5N1) et A(H10N8) ont, comme A(H7N9), des gènes issus du réassortiment avec A(H9N2). Le réassortiment avec les gènes internes des virus A(H9N2) a donc favorisé l'expansion du virus A(H7N9) portant des glycoprotéines de surface originaires d'oiseaux aquatiques.

Contrairement aux virus A(H5N1), la plupart des cas humains infectés par le virus A(H7N9) sont des adultes de plus de 40 ans. Ces infections surviennent principalement chez des individus en contact avec les volailles. Il a par ailleurs été rapporté une possible transmission interhumaine entre individus hospitalisés. De façon préoccupante, des évolutions génétiques du virus A(H7N9) ont été décrites, avec notamment l'apparition d'un site de clivage polybasique dans la H7, classant ces souches en virus hautement pathogènes pour les oiseaux. L'impact de ce changement sur la pathogénicité humaine n'est pour l'instant pas connu. De par sa capacité à infecter l'être humain, sa possible transmissibilité et son évolution rapide, le virus A(H7N9) est un virus classé comme à fort potentiel pandémique.

Chapitre 39 - Virus influenza

Tableau 5 : Nombre de cas humains et de décès dus à des infections par des virus aviaires de 1959 à 2018

Virus influenza A aviaires	Années de circulation des virus	Nombre d'infections humaines	Nombre de décès
A(H5N1)	1997, 2003 - 2017	860	454
A(H6N1)	2013	1	0
A(H7N2)	2002 - 2017	6	0
A(H9N2)	1998 - 2017	40	1
A(H7N3)	2002 – 2006, 2012	12	0
A(H5N6)	2014 - 2017	17	11
A(H7N7)	2003, 2013	99	1
A(H10N7)	2010	4	0
A(H10N8)	2013	3	2
A(H7N9)	2013 - 2018	1565	612

Les virus notés en gras sont classés comme à risque pandémique ; leur épidémiologie est détaillée dans l'encadré 4.

Les virus influenza d'origine porcine ou aviaire doivent absolument être l'objet d'une surveillance étroite car ils peuvent participer à l'émergence de nouvelles souches potentiellement pandémiques. Le meilleur exemple reste à ce jour le virus A(H1N1)pdm09 responsable de la pandémie de 2009 (Fig. 8). Des précautions sont prises telles que la vaccination obligatoire contre la grippe des personnels au contact de porcs afin de réduire le risque de coinfection par un virus humain et un virus porcine qui pourrait être à l'origine de l'émergence d'un nouveau virus réassortant.

8 - Diagnostic au laboratoire

8.1. Prélèvements

Malgré un tableau clinique évocateur de grippe, le diagnostic de certitude ne peut être fait que par la détection du virus dans un prélèvement respiratoire. D'autres agents respiratoires viraux (virus respiratoire syncytial, métagpneumovirus, rhinovirus ...) ou bactériens (*Mycoplasma pneumoniae* par exemple) peuvent donner un syndrome d'allure grippale. Le virus se multipliant dans un 1^{er} temps dans les voies aériennes supérieures, le prélèvement respiratoire peut se faire

par écouvillonnage (de préférence avec un système constitué d'un écouvillon floqué et d'un milieu de transport adapté) du nasopharynx, ou après instillation nasale puis aspiration de sérum physiologique. Le recueil efficace de cellules du nasopharynx (riches en virus) est la condition indispensable pour un diagnostic fiable. Ce prélèvement doit être fait rapidement après le début des symptômes, idéalement dans les 48 premières heures, en tout cas jamais au-delà de 7 j. Chez l'individu immunodéprimé, l'excrétion virale peut être plus longue.

En cas d'infection respiratoire basse, il est important d'associer un prélèvement profond de type aspiration trachéale, crachat induit ou lavage broncho-alvéolaire.

La grippe est une infection aiguë de courte durée. De ce fait, la recherche du virus ne peut se faire que pendant la courte période de multiplication du virus dans les voies aériennes de l'individu. Chez un individu immunodéprimé, l'excrétion virale peut durer plusieurs semaines. La sérologie n'a aucun intérêt pour le diagnostic d'une infection grippale aiguë.

En cas de risque d'infection par un virus zoonotique, les prélèvements doivent être acheminés directement au CNR. En effet, les outils de diagnostic orientés vers les virus humains ne sont pas adaptés pour

la détection de tels virus, risquant de donner des résultats faussement négatifs. Par ailleurs, ces virus et ces prélèvements doivent être manipulés *a priori* en niveau de confinement de type 3.

8.2. Les différents outils du diagnostic

Le diagnostic de la grippe bénéficie d'outils de détection de 1^{re} intention, couramment utilisés dans les laboratoires de microbiologie ou les laboratoires d'urgence (*point of care* ou POC) tels que les tests rapides d'orientation diagnostique (TROD), tests de biologie moléculaire (RT-PCR en temps réel, outils multiplex syndromiques). Des techniques plus anciennes de détection directe du virus par immunofluorescence ou par ELISA dans les cellules du patient sont encore utilisées par certains laboratoires. Ces techniques nécessitent 30 min à 2 h de manipulation et des qualifications techniques approfondies du personnel. Progressivement, elles disparaissent au profit des techniques moléculaires de type RT-PCR. Il existe également des d'outils de 2^e intention, permettant la caractérisation d'un virus isolé chez un patient. Ces outils (isolement viral en culture cellulaire, sous-typage par RT-PCR, séquençage, caractérisation antigénique ...) sont utilisés dans les laboratoires spécialisés de CHU ou les CNR.

• Tests de diagnostic de 1^{re} intention

Tests diagnostiques rapides ou TROD. Ces tests unitaires peuvent être réalisés directement au lit du malade ou en 1^{re} intention au laboratoire. Il s'agit de tests immunochromatographiques sur membrane, développés pour détecter la nucléoprotéine virale NP, conservée pour les virus de type A comme B, exprimée en abondance dans le virus et dans la cellule infectée. Ces tests donnent un résultat en 15 à 20 min, spécifiques mais significativement moins sensibles que les tests de biologie moléculaire. Une grippe ne peut donc pas être exclue sur un TROD négatif. Certains TROD, sur le même principe, sont associés à un système d'amplification du signal détecté par un lecteur, améliorant très nettement les performances de sensibilité.

RT-PCR en temps réel. La biologie moléculaire est devenue la référence dans le domaine du diagnostic des infections respiratoires. Les tests de RT-PCR en temps réel sont rapides, fiables, spécifiques et sensibles. Ils ciblent essentiellement le gène M dont la séquence est très stable, les trousse diagnostiques permettant ensuite de faire la distinction entre virus influenza A et B. Une approche semi-quantitative, donnant une estimation de la charge virale dans le prélèvement est possible. D'autres outils ont été développés pour des analyses au coup par coup. Ces automates font, en une étape, l'extraction et l'amplification et sont particulièrement utilisés dans les POC. Les trousse actuellement disponibles permettent en plus d'identifier le type de virus de type A ou B, de déterminer le sous-type de virus de type A par détection spécifique de la HA (H1 ou H3).

Pour ces trousse, comme pour celles réalisant la détection générique (gène M), une évaluation de leur sensibilité doit être réalisée régulièrement du fait du risque de mutation sur la cible moléculaire.

Approches syndromiques. Ces tests permettent simultanément la détection des virus de types A et B, le sous-typage des virus de type A et la détection de 10 à 20 autres agents pathogènes viraux ou bactériens en moins de 2 h. Aujourd'hui, cette approche syndromique est en plein essor avec la mise à disposition des laboratoires et des POC d'automates très simplifiés. Ce type d'outil permet le diagnostic étiologique rapide de l'épisode infectieux en cours (voir chapitre 52). Généralement faciles à mettre en œuvre, ces outils ont encore un coût très élevé en comparaison avec les outils utilisés en routine au laboratoire.

• Tests spécialisés de 2^{de} intention (laboratoires spécialisés)

L'isolement des virus en culture de cellules. Cette technique n'est pas utile pour la prise en charge du patient en 1^{re} intention. Après inoculation du prélèvement sur des lignées cellulaires adaptées (majoritairement MDCK ou éventuellement LLC-MK2), l'obtention de la souche virale nécessite en moyenne entre 3 et 5 j. L'ECP est peu visible et la présence de virus influenza est détectée soit par immunofluorescence soit par mesure de l'activité de l'HA. L'isolement de la souche en culture permet de réaliser des analyses complémentaires :

- La caractérisation antigénique par inhibition de l'hémagglutination permet de détecter une dérive antigénique du virus circulant par rapport à un virus de référence, généralement le virus présent dans la composition du vaccin de l'hiver en cours (Fig. 14). Cette technique est utilisée également pour la caractérisation des lots de souches vaccinales issues de l'industrie pharmaceutique avant la production des vaccins. L'évolution récente des virus A(H3N2) vers des souches faiblement hémagglutinantes complique l'identification de ces souches, justifiant l'utilisation d'analyses phylogénétiques.

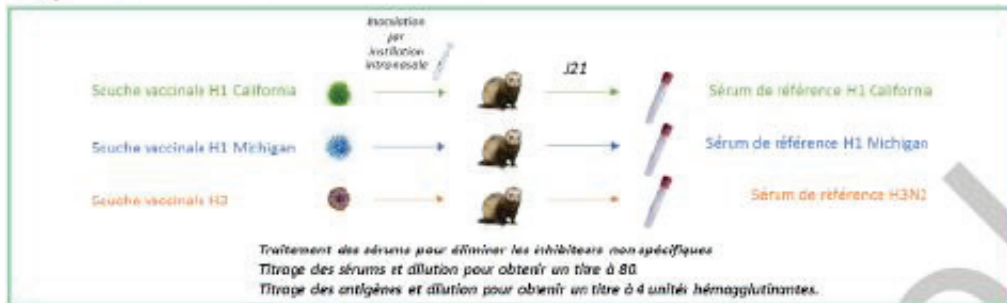
- La caractérisation antigénique de la neuraminidase, dont les objectifs sont les mêmes que pour l'hémagglutinine (mesure de la dérive antigénique de la NA). A noter que cette caractérisation peut aussi être faite, comme pour l'hémagglutinine, à l'aide d'analyses phylogénétiques.

- La sensibilité phénotypique aux antiviraux (voir chapitre 10). Un test reposant sur la capacité de la NA virale à lyser un substrat dont le produit émet de la fluorescence est souvent utilisé, en présence et en absence de l'antiviral testé.

- L'évaluation de l'immunité humorale d'un patient vis-à-vis d'un virus influenza (statut sérologique du patient ou évaluation de l'efficacité vaccinale). Cette évaluation se fait par des tests d'inhibition de l'hémagglutination ou par des tests de séroneutralisation (voir chapitre 8).

Chapitre 39 - Virus influenza

1 PRÉPARATION DES SÉRUMS ET DES ANTIGÈNES



2 PRINCIPE DE RÉALISATION DE LA RÉACTION DE CARACTÉRISATION ANTIGÉNIQUE

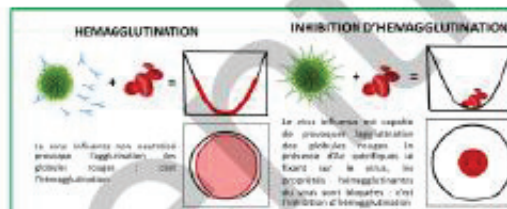
Étape 1 : Dilutions en série des 3 sérums de référence

Étape 2 : Ajout d'une concentration 4U de virus A/H1 California

Étape 3 : Incubation 2h à température ambiante

Étape 4 : Ajout d'une quantité fixe de globules rouges

Titre final du sérum	80	200	320	640	1280	2560
California homologue	●	●	●	●	●	●
Michigan homologue	●	●	●	●	●	●
H3N2 hétérologue	●	●	●	●	●	●



3 INTERPRÉTATION DES RÉACTIONS VIS-À-VIS DES 2 SOUCHES A/H1N1 DE RÉFÉRENCE

Titre final du sérum	RÉACTIVITÉ VIS-À-VIS DE l'A ₁ CALIFORNIA							RÉACTIVITÉ VIS-À-VIS DE l'A ₁ MICHIGAN							RÉACTIVITÉ VIS-À-VIS DU VIRUS À CARACTÉRISER							
	80	200	320	640	1280	2560	5120	80	200	320	640	1280	2560	5120	80	200	320	640	1280	2560	5120	
California homologue	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Michigan homologue	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
H3N2 hétérologue	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

Souches virales	Sérums de référence		
	A/California/2009	A/Michigan/2015	H3N2
A/California/2009	1280	320	< 80
A/Michigan/2015	320	640	< 80
Virus à caractériser	640	160	< 80

Conclusion : le virus à caractériser est un virus influenza A/H1N1 apparenté A/California/2009

Figure 14 : Caractérisation antigénique d'un virus influenza par inhibition d'hémagglutination

Le virus A(H1N1) à caractériser est mis en contact avec des sérums de référence vaccinaux homologues anti-A(H1N1) et un sérum hétérologue anti-A(H3N2) pendant 1 h à température ambiante. Sont ensuite ajoutés des globules rouges de cobaye (à noter que pour la caractérisation des virus grippaux d'origine aviaire, on ajoute des globules rouges de poule). L'hémagglutinine du virus influenza provoque alors l'agglutination des globules rouges (hémagglutination) sauf lorsqu'il est neutralisé par des anticorps. Pour chaque souche (vaccinale ou à caractériser), une réaction d'inhibition d'hémagglutination (IHA) est donc réalisée avec les sérums de référence. Un profil d'IHA, déterminé par la dernière dilution de sérum permettant l'inhibition, met en évidence l'adéquation entre antigènes viraux et sérums de référence. Ainsi, par comparaison des profils obtenus, il est possible de définir de quel virus de référence le virus à analyser est le plus proche sur le plan antigénique.

Le séquençage. Quelle que soit la technologie utilisée (Sanger ou équençage haut-débit, voir chapitre 8), l'analyse des séquences de la HA et de la NA ont plusieurs applications, notamment la recherche des mutations conférant une résistance aux INA et la recherche de facteurs de virulence (Tab. 3). A chaque épisode d'introduction d'un nouveau virus dans la population humaine (A(H1N1)pdm09, A(H3N2)v porcins en 2013 ...), le séquençage rapide du virus émergent a permis de déterminer la cartographie de ses segments d'ARN génomique et d'anticiper sa virulence et sa capacité à être reconnu par les anticorps de la population générale et donc son potentiel pandémique. Ces analyses *in silico* sont possibles par comparaison des séquences obtenues avec les séquences de référence des virus d'origine animale ou des virus ayant circulé chez l'être humain les années précédentes.

8.3. Objectif et indications du diagnostic virologique

La demande de diagnostic de grippe au laboratoire a pour principaux objectifs de déterminer l'étiologie d'un tableau respiratoire et d'améliorer la prévention des infections nosocomiales. En effet, mettre en évidence l'étiologie grippale de l'infection aiguë en cours permet de mettre en place un traitement antiviral spécifique pour raccourcir la durée de la maladie et diminuer le risque de complications, surtout chez les individus présentant des facteurs de risque (Tab. 2). Il permet également la mise en place de mesures d'isolement de type « air », en plus des précautions standard afin d'éviter la transmission à l'entourage et de limiter la transmission nosocomiale. Il permet également de mettre en évidence un échec vaccinal chez les individus vaccinés. Pour le cas particulier des individus immunodéprimés, le diagnostic initial pourra être complété par un suivi de l'excrétion virale afin de s'assurer que le traitement est efficace. Enfin la notion d'une infection grippale permet de réagir de manière adaptée en cas de survenue de complications (pneumonie virale, surinfection bactérienne). En pratique, le diagnostic virologique d'une infection par le virus influenza devra être proposé à tout patient hospitalisé pour un syndrome grippal, notamment pendant la période hivernale, ou s'il revient d'un voyage dans une zone potentiellement contaminée (hémisphère Sud pendant l'été par exemple). Il devra aussi être proposé aux patients connus pour avoir des facteurs de risque s'ils sont suspects d'une infection, qu'ils soient vaccinés ou non. Enfin, lors de la survenue de cas groupés d'infections respiratoires dans une structure hospitalière, ou dans une EHPAD, quelle que soit la situation épidémiologique, le diagnostic virologique doit être réalisé sur les 1^{er} cas identifiés.

8.4. Suspicion d'infection par un virus aviaire ou porcine

Les consignes sont, en cas d'apparition de signes respiratoires ou d'une conjonctivite chez des personnes au contact d'animaux connus pour être infectés par

des virus aviaires zoonotiques, d'adresser le patient à la structure hospitalière la plus proche afin d'y réaliser des prélèvements adaptés (crachat induit, écouvillon de nez, écouvillon conjonctival en cas de conjonctivite) en protégeant le préleveur (port de gants, masque et lunettes pour le préleveur). Ces prélèvements devront être acheminés en urgence au CNR pour confirmer ou infirmer rapidement la présence par un virus zoonotique.

9 - Traitement

9.1. Traitement symptomatique

La prise en charge d'une grippe simple, chez un patient ne présentant aucun facteur de risque, repose sur un traitement symptomatique associant du paracétamol, une bonne hydratation et du repos. Un arrêt de travail de quelques jours aura, de plus, l'effet bénéfique de limiter la transmission du virus.

9.2. Traitement spécifique

Pour les individus présentant des facteurs de risque, ou une forme grave, un traitement antiviral spécifique doit être proposé en complément du traitement symptomatique et des mesures d'hygiène. Les traitements historiques de la classe des adamantanes (amantadine ou rimantadine) sont des inhibiteurs de la protéine M2 des virus influenza de type A. En raison de la résistance de la majorité des souches virales, ces molécules ne sont plus disponibles en France.

Depuis 2010, les INA sont la seule classe d'antiviraux recommandée par l'OMS dans le traitement et la prophylaxie des infections par les virus de types A et/ou B. Actuellement, seuls 2 INA sont autorisés dans le monde entier : l'oseltamivir et le zanamivir. Deux nouveaux INA, le laninamivir et le péramivir, sont en cours d'évaluation clinique, mais sont déjà autorisés dans certains pays. Le laninamivir est utilisé dans le traitement des infections grippales simples sans complications. Le péramivir et le zanamivir peuvent être utilisés par voie intraveineuse (IV) dans les gripes sévères ou lors d'excrétion prolongée du virus avec résistance à l'oseltamivir. En France, le seul traitement antiviral actuellement disponible est l'oseltamivir. Administré par voie orale, l'efficacité maximale est obtenue si le traitement est administré dans les 48 premières heures suivant l'apparition des symptômes. Le traitement classique dure 5 j et peut être administré à tous les âges. En cas de développement de résistance, la seule alternative thérapeutique est le zanamivir IV, en ATU (autorisation temporaire d'utilisation). Le zanamivir inhalé qui avait été proposé de 1999 à 2009 n'est actuellement plus commercialisé en France.

Devant cet arsenal thérapeutique restreint, de nouvelles stratégies thérapeutiques sont en cours de test, avec de nouvelles cibles et des mécanismes

Chapitre 39 - Virus influenza

d'action originaux. Certaines molécules ont un effet contre les sous-unités du complexe polymérase : inhibiteurs de PB2 comme le pimodivir (VX-787) ou le baloxavir marboxil (S-033188), et les inhibiteurs de PA (L-742,001). Le favipiravir (T-705), antiviral prometteur à large spectre, actif contre tous les virus à ARN de polarité positive ou négative, est un inhibiteur de l'ARN polymérase qui va entraîner l'apparition de nombreuses mutations au cours de la multiplication virale, ce qui favorise la formation d'une large proportion de virus non viables. Cet antiviral est déjà autorisé au Japon dans le traitement des infections par les virus influenza après échec des INA.

Parmi les nouvelles stratégies thérapeutiques, l'association de plusieurs molécules antivirales possédant des mécanismes d'actions et/ou des profils de résistances différents pourrait limiter l'apparition de virus résistants et agir de façon synergique. L'association amantadine/ribavirine/oseltamivir pour le traitement de la grippe chez l'adulte à risque de complications est en cours d'évaluation. D'autres associations sont envisagées : oseltamivir/ribavirine, favipiravir/oseltamivir, ribavirine/péramivir ou encore antiviraux/immunomodulateurs. Il faut rester vigilant concernant les associations d'antiviraux ; par exemple, l'association oseltamivir *per os* et zanamivir inhalé est à proscrire, ces 2 molécules ayant des effets antagonistes en raison d'une compétition au niveau de leur cible d'action commune et ce malgré leur voie d'administration différente.

9.3. Les résistances aux traitements spécifiques

Pour les adamantanes, les virus influenza de type B sont naturellement résistants, et 30% des virus de type A sensibles développent une résistance empêchant la fixation des adamantanes sur la protéine M2 après 3 j de traitement. Depuis 2009, les virus A(H1N1)pdm09 circulant sont tous résistants aux adamantanes, de même que l'ensemble des virus A(H3N2), justifiant la non recommandation de leur prescription.

Les résistances aux INA sont dues à des mutations dans la séquence de la NA entraînant des substitutions d'acides aminés à proximité ou dans le site actif de l'enzyme. Ces substitutions dépendent du sous-type viral, les plus fréquemment observées *in vivo* sont la H275Y dans les N1, la R292K et la E119V dans les N2. Les résistances aux INA ont une faible prévalence variant en fonction du sous-type viral et peuvent dans de rares cas devenir dominantes. En 2007, les virus saisonniers A(H1N1) se sont séparés en 2 clades : l'un sensible et l'autre résistant à l'oseltamivir. Ces derniers sont apparus en Europe, au cours de l'hiver 2007-2008, et sont devenus majoritaires lors de l'hiver 2008-2009. En 2009, ces virus ont ensuite été remplacés par le virus pandémique A(H1N1)pdm09 qui est sensible à l'oseltamivir.

Dans ce contexte, la surveillance et l'étude des mécanismes de résistance sont des éléments indispensables à la lutte antigrippale.

10 - Prévention

10.1. Mesures d'hygiène

En complément de son traitement, la mise en place de mesures d'hygiène et de mesures barrières simples telles que le port d'un masque chirurgical par le patient, le renouvellement régulier de l'air de sa chambre, et une friction des mains avec une solution hydro-alcoolique (après un mouchage ou éternuement), sera très utile pour limiter la transmission du virus.

10.2. La vaccination actuelle

La vaccination est le meilleur moyen de lutte contre la grippe. Il existe 2 types de vaccins disponibles en France : des vaccins inactivés sans adjuvants administrés par voie injectable (en intramusculaire ou en sous-cutanée) ou des vaccins vivants atténués administrés par aérosol (voie nasale). Ces derniers sont indiqués chez l'enfant de 2 à 18 ans. Le vaccin injectable est une alternative dès l'âge de 3 mois et nécessite en cas de primo-vaccination l'injection de 2 demi-doses à 1 mois d'intervalle. La campagne de vaccination, organisée par la caisse nationale de l'assurance maladie des travailleurs salariés (CNAMTS) tous les ans, à partir de début octobre, vise à réduire la mortalité associée à la grippe, en proposant la vaccination gratuitement à l'ensemble des individus présentant des facteurs de risque (soit environ 10 millions de Français). Outre les individus à risque, cette vaccination est recommandée pour tout individu au contact d'un individu à risque (principe de la prévention par « *cocooning* ») et pour tous les personnels soignants. Cette vaccination est aussi fortement recommandée dans les EHPAD pour les résidents comme pour le personnel. La vaccination permet de réduire significativement la mortalité très élevée dans ces structures. Du fait des variations antigéniques, la composition vaccinale est revue tous les ans. Depuis l'automne 2018, les 2 types vaccins disponibles en France comporteront 4 composantes vaccinales (dit « quadrivalent ») avec un représentant des virus A(H1N1)pdm09, 1 pour les virus A(H3N2) et 1 pour chacun des 2 lignages B (Yamagata et Victoria).

L'efficacité des vaccins dépend de l'adéquation entre les virus de la composition vaccinale et les virus circulants. Lorsque le vaccin comporte des virus vaccinaux antigéniquement identiques aux virus circulants, l'efficacité vaccinale est optimale, de l'ordre de 80% chez la personne de moins de 65 ans et de 60% pour la personne de plus de 65 ans. En cas d'apparition, durant l'épidémie, d'un variant antigéniquement différent du virus vaccinal, l'efficacité vaccinale peut baisser de manière significative voire être nulle comme durant l'hiver 2014-2015.

10.3. Les vaccins du futur

L'utilisation des vaccins contre la grippe est en pleine évolution et personnalisable. Il est démontré que le vaccin atténué est plus efficace chez les enfants, alors

que les vaccins à haute dose antigénique peuvent induire une meilleure protection chez les personnes âgées.

De nouveaux vaccins sont en cours de commercialisation, comme des vaccins protéiques purifiés (disponibles aux Etats-Unis), qui semblent induire une excellente protection post-vaccinale. Des vaccins dits « universels » sont également en cours de développement. Ils devraient permettre d'induire une protection à long terme (plusieurs années) même contre des virus qui présenteraient des variations antigéniques.

11 - Conclusion et perspectives

La grippe est une infection fréquente, peut-être la plus fréquente des infections saisonnières. Son impact est souvent sous-estimé alors que la mortalité et la morbidité induites, maintenant bien mesurées, sont

reconnues comme très importantes. Le développement récent d'outils diagnostiques simples, fiables et largement répandus, a permis aux cliniciens de mieux connaître cette maladie aux multiples facettes. L'apport des technologies de nouvelles générations de séquençage et de protéomique permettront d'améliorer les connaissances sur l'infection grippale.

Les virus influenza sont un parfait exemple du concept « *One Health* » qui illustre l'interdépendance entre la santé humaine et la santé animale. Une amélioration de la surveillance transversale de la circulation de ces virus dans toutes les espèces animales est donc un objectif majeur des prochaines années. Mais les perspectives les plus attendues, apportées par une approche intégrative de cette maladie, permettront la mise à disposition de nouveaux moyens de lutte contre la grippe, actuellement en cours de développement (outils thérapeutiques [antiviraux] et prophylactiques [vaccins]) ainsi qu'une meilleure identification des individus qui en bénéficieront le plus.

Chapitre 39 - Virus influenza

& Messages importants &

- Les virus influenza sont des virus dont le génome à ARN segmenté explique leur capacité d'évolution rapide.
- Les virus influenza humains de type A (A(H3N2) et A(H1N1)) et B (lignages Yamagata et Victoria) sont les virus respiratoires responsables des épidémies annuelles de grippe.
- La surveillance des virus influenza d'origine zoonotique doit être renforcée pour permettre un meilleur suivi des nombreuses souches circulantes dans les différentes espèces animales. Les virus pandémiques ayant touché l'être humain au cours du siècle dernier sont tous issus de virus zoonotiques.
- La grippe se manifeste généralement par un début brutal et une fièvre importante (> 38°C) mais d'autres manifestations sont décrites.
- L'utilisation d'antiviraux adaptés administrés précocement, selon les recommandations de l'OMS, permet d'améliorer l'évolution de la maladie et de réduire le risque de complications.
- Chez les individus présentant des facteurs de risque et le personnel soignant, la vaccination antigrippale saisonnière est prise en charge à 100% en France. La couverture vaccinale reste encore trop faible, et justifie le ciblage des populations à risque et les campagnes de communication effectuées par l'Assurance Maladie. La dérive antigénique des virus circulants justifie la mise à disposition d'un nouveau vaccin chaque année.
- La surveillance des caractéristiques des virus influenza circulants est assurée par un réseau unique associant l'OMS, les laboratoires collaborateurs OMS (CNR Virus des infections respiratoires), des médecins (réseaux sentinelles), les hôpitaux (réseau RENAL). Les bulletins hebdomadaires du réseau donnent des informations en temps réel sur l'évolution de l'épidémie permettant aux structures de soins de s'organiser. Ils informent également sur l'émergence de variants viraux échappant à la vaccination saisonnière ou présentant des résistances aux antiviraux.
- Les nouveaux outils de biologie moléculaire, notamment simplifiés et multiplex, sont désormais disponibles pour améliorer le diagnostic étiologique et la prise en charge des individus.

& Pour en savoir plus ... &

1. Wright PF, Neumann G, Kawakita Y. Orthomyxoviridae. In *Fields Virology, Sixth Edition*, DM Knipe and PM Howley (Eds), Wolters Kluwer / Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013, p.1186-1243.
2. Gaymard A, Frobert E, Lina B, Escuret V. Infections humaines par les virus influenza A(H7N9) : émergence des virus, évolution et risque pandémique. *Virologie* 2017; 21: 255-65.
3. Biquand E, Demeret C. Résolution de la structure de l'ARN polymérase dépendante de l'ARN trimérique des virus influenza : son impact sur notre compréhension des interactions de la polymérase avec les facteurs viraux et cellulaires. *Virologie* 2016; 20: 302-20.
4. Le Briand N, Casalegno JS, Escuret V, Gaymard A, Lina B, Ottmann M, Frobert E. La balance HA-NA des virus influenza A(H1N1). *Virologie* 2016; 20: 47-60.
5. Pichon M, Pelissier R, Valette M, Lina B, Josset L. Diversité génomique virale : évaluation et conséquences sur la virulence des infections respiratoires. *Virologie* 2018; 22: 173-82.

Annexe B. PICHON M., Lina B., Josset L. [Caractérisations et impact du microbiome bactérien respiratoire sur les maladies virales] *Virologie* 2018, 22 (3) : 161-72

Caractérisation et impact du microbiote bactérien respiratoire sur les maladies virales

Maxime Pichon
Bruno Lina
Laurence Josset

Centre hospitalier universitaire de Lyon,
Laboratoire de virologie, Institut
des agents infectieux (IAI) de Lyon,
Centre national de référence des virus
respiratoires France Sud, Centre
de biologie et de pathologie Nord,
Groupement hospitalier Nord
F-69317, Lyon cedex 04, France
Université Claude Bernard Lyon 1,
Faculté de médecine Lyon Est,
CIRI, ENS, Inserm U1111
CNRS UMR5308, équipe Virpath,
F-69372, Lyon cedex 08, France
<maxime.pichon01@chu-lyon.fr>

Résumé. Longtemps considéré comme stérile, le tractus respiratoire est maintenant reconnu comme un espace comportant un microbiome à fort potentiel évolutif. L'amélioration des technologies de séquençage permet désormais l'étude de la physiopathologie du microbiome bactérien respiratoire et de ses liens avec la sévérité des infections virales respiratoires. Après une revue des méthodes de caractérisation du microbiote bactérien, en général, et respiratoire, en particulier, cette revue s'attachera à décrire l'impact de ce microbiote sur l'immunité innée et acquise de l'hôte infecté. Nous verrons comment l'exposition virale, survenant dans un contexte d'altération ou de déplétion totale du microbiote respiratoire après antibiothérapie, influence fortement l'évolution clinique de l'hôte infecté. La prise en charge des patients infectés, à risque de complications, pourrait bénéficier de ces nouvelles connaissances. En effet, des études récentes démontrent que de nombreuses voies de réponse de l'hôte à l'infection sont perturbées lorsque le microbiote bactérien est altéré. Son rééquilibrage, par administration de probiotiques ou de molécules innovantes modifiant sa composition, pourrait améliorer le pronostic de l'infection.

Mots clés : microbiome respiratoire, infections virales, NGS, ADN16S, méta-génomique

Abstract. Considered for years as sterile, respiratory tract contains very variable bacterial microbiome. Driven by next generation sequencing techniques, microbiome analyses allow a better understanding of viral infection pathophysiology, in terms of incidence and lethality. After a short reminder of microbiome characterization methods, this review will describe its impact on adaptive and innate immunity of the infected host. Studied by viral challenges after antibiotic administration, microbiome depletion has an important impact on clinical outcome of the host. Patient's management and therapeutic choices could exploit results of this field of research, using microbiome characteristics as prognostic biomarkers. Numerous immunologic pathways are impacted by modification of the microbiome and its restoration, using probiotic or innovative molecules could confer better clinical prognostic of viral respiratory diseases.

Key words: respiratory microbiome, viral infections, NGS, 16S DNA, metagenomic

Introduction

Le microbiote est l'ensemble des micro-organismes présents dans un environnement (ou « niche écologique ») donné, recoupant ainsi la notion, historique, de flore bactérienne. Le microbiome, au sens large, correspond à

l'ensemble de la niche écologique considérée. Celle-ci inclut à la fois les micro-organismes résidents (bactéries, virus, parasites et champignons) et les facteurs pouvant influencer l'environnement (cellules de l'immunité, protéases cellulaires, etc.). Les méthodes traditionnelles pour détecter le microbiote bactérien reposaient initialement sur des méthodes de culture, faiblement sensibles et fortement chronophages. Au cours des dix dernières années, l'amplification suivie du séquençage de l'ADN codant

Tirés à part : M. Pichon

revue

l'ARN16S bactérien a permis d'étudier le microbiote bactérien cutané, des tractus ou des organes, autant quantitativement que qualitativement, et de définir, grâce à la sensibilité de détection ainsi obtenue, comparée aux méthodes de culture, le microbiome [1].

Avec l'émergence de technologies de séquençage à haut débit, ou séquençage dit de « nouvelle génération » (*Next Generation Sequencing* [NGS]), capables de produire une quantité considérable de données par échantillon, des études de grande ampleur comme celle du Projet microbiome humain (*Human Microbiome Project* [HMP]) ont permis une avancée importante dans la description des différents microbiomes de l'homme. De nombreuses questions restent néanmoins posées quant à ces microbiomes, notamment sur leur potentielle richesse. Certains auteurs considèrent qu'il y a jusqu'à 10^{14} bactéries à la surface ou dans notre organisme, soit dix fois plus que le nombre de nos propres cellules. Ces données restent néanmoins discutées, allant jusqu'à diminuer d'un facteur 10, selon les analyses les plus récentes [2].

À l'instar de l'ensemble des microbiotes décrits chez l'humain, la composition du microbiote du tractus respiratoire est de mieux en mieux définie, ainsi que son rôle physiologique. Notamment, il est fait l'hypothèse qu'il participe aux défenses de l'hôte [3]. Le microbiome des voies aériennes, supérieures ou inférieures, pourrait ainsi agir comme une véritable barrière biologique, participant au maintien de fonctions respiratoires normales et protégeant l'individu de la colonisation ou de l'invasion par des pathogènes extérieurs.

Dans cette revue, nous décrivons les connaissances actuelles sur le microbiome respiratoire dans le cadre des infections respiratoires virales. Nous nous focaliserons sur les données correspondant au microbiome bactérien, du fait du faible nombre d'études réalisées sur le virome et le mycobiome respiratoire (microbiomes viral et fongique, respectivement).

Méthodes d'étude et de caractérisation du microbiome bactérien respiratoire

Contrairement aux niches écologiques, comme le tractus digestif, depuis longtemps identifiées comme porteuses d'une véritable flore bactérienne, le tractus respiratoire a longtemps été considéré comme stérile, les méthodes de culture dites « classiques » ne permettant pas toujours d'isoler les bactéries anaérobies ou difficiles à cultiver. Depuis l'apparition des technologies de biologie moléculaire, indépendantes d'une étape de culture, le tractus respiratoire inférieur (dont le poumon) est maintenant reconnu comme une niche écologique à part entière, au

même titre que la peau ou le tube digestif. Les méthodes d'étude des communautés bactériennes ont considérablement évolué au cours des dernières années, du fait de l'identification d'un gène bactérien universel (codant l'ARN ribosomal 16S) et de l'amélioration progressive des techniques de séquençage, ainsi que l'obtention de puissances de calcul bio-informatique permettant de produire des millions de séquences par échantillon [4].

Le gène codant l'ARN16S est un gène universellement présent chez les procaryotes. Il est d'une longueur d'environ 1,5 kilobases et comporte neuf régions hypervariables (V1 à V9) entourées de dix régions hautement conservées (C1 à C10) (*figure 1*). Dans un premier temps, il a été analysé et comparé par clonage, par électrophorèse sur gel à gradient de dénaturation (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* [DGGE]) ou par l'étude des polymorphismes par restriction de taille (*Restriction Fragment Length Polymorphism* [RFLP]). Rapidement, ces techniques ont été remplacées par les technologies de séquençage à haut débit [5, 6]. L'équipe de Carl Woese a utilisé cette stratégie pour classer les bactéries selon leur appartenance à des groupes taxonomiques distincts (*Operative Taxonomic Unit* [OTU]) révolutionnant ainsi la recherche en écologie microbienne, animale comme environnementale [7]. En effet, la structure du gène codant l'ARN16S autorise la production d'amorces universelles dans des zones conservées, permettant de séquencer certaines parties hypervariables de ce gène (*tableau 1* et *figure 1*). Spécifiques de la plateforme utilisée et d'une longueur de quatre à 12 nucléotides, ces amorces permettent l'attribution (« démultiplexage ») des séquences produites à leur échantillon d'origine, puis le classement en OTU des *reads* (ou séquences courtes) produits. De nombreux logiciels permettent l'analyse, plus ou moins ouverte, de ces OTU, comme mothur, QIIME ou UPARSE, qui sont les plus utilisés [8-10]. Toutes les étapes du processus de séquençage, comme les différents protocoles d'extraction ou le choix de la polymérase, des amorces et de la région amplifiée, ont un impact sur la qualité des résultats obtenus [11, 12]. De nombreux protocoles et logiciels existent donc pour traiter et vérifier la qualité des séquences produites, sans pour autant qu'une approche consensuelle n'ait encore été admise à ce jour [9, 10, 13].

Cette description de la population bactérienne, pouvant aller jusqu'au genre ou à l'espèce, *via* la caractérisation des OTU présents dans un échantillon, ne permet néanmoins pas d'obtenir les informations relatives à l'état physiologique de ces bactéries, élément important pour comprendre le fonctionnement du microbiome. Leung *et al.*, analysant les microbiomes bactériens de l'oropharynx de 22 patients infectés ou non par le virus grippal, ont généré, par métagénomique du génome bactérien (analyse du contenu en ARN), des données complètes sur les gènes de régulation bactériens (gènes impliqués dans la mobilité, la

revue

Tableau 1 Exemples d'amorces ciblant les régions hypervariables du gène codant l'ARN16S bactérien (adapté de Baker *et al.* [59]).

Séquences des boucles hypervariables (coordonnées nucléotidiques)	Amorce sens (<i>forward</i>)	Amorce antisens (<i>reverse</i>)
Région V1 [67-100] GGTAACAGG AAG AAGCTTGCT TCT TTG CTG ACG	E8F TCT CAA ACT AGT ACC GAG TC	E341R CTGCGTCCCGTAGGAGTCTGG
Région V2 [207-296] TGATGGAGGGGGATAACTACTGAAACGGTAGCTAATACC GCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCT CTTGCCATCG		
Région V3 [440-497] CAG CGG GGA GGA AGG GGA GTA AAG TTA ATA CCT TTG CTC ATT GAC GTT ACC CGC AGA A	E334F GGT CTG AGG ATG CCC TGC GTC	U534R TATTACCGCGGCTGCTGGCTCG GAGTTAG
Région V4 [660-722] TTGTTAAGT CAGATGTGA AAT CCCC GG GCT CAA CCTGGAACTGCATCTGATAC TGGCAAGC	E519F TCG TCG GCG CCA TTA T	E804R ACT ACC AGG GTA TCT AAT C
Région V5 [899-927] TGGAGGTTGTGCCCTGAGGCGTGGCTTC	E786F CTA ATC TAT GGG ACC ATC A	E939R CTT GTG CGG GCC CCC GTC AAT TCA ATT CAT TTG AGT TTT T
Région V6 [1009-1035] ACGGAAGTTTTCA GAGATGAGAAATGTCCTCGGGAA	E905F TTT TGA TTT ACT TAA CTG CCC CCG GGC GTG TTC	U1053R CTG ACG ACA GCC ATG CA
Région V7 [1119-1157] CCT TTG TTG CCA GCG GTC CGG CCG GGA ACT CAA AGG AG	U1115F GGG CGT TGC TCG CGT TGG GA	U1406R GAC GGG CGG TGT GTA CA
Région V8 [1242-1295] CGC ATA CAA AGA GAA GCG ACC TCG CGA GAG CAA GCG GAC CTC ATA AAG TGC GT		
Région V9 [1434-1465] GTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTA	U1406F ACA TGT GTG GCG GGC AG	U1510R CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT

Les séquences données à titre indicatif, basées sur l'ADN16S d'*E. coli*, correspondent aux coordonnées nucléotidiques indiquées entre crochets. Les amorces, sens et antisens, sont toujours indiquées dans le sens 5'-3' et nommées selon leur dénomination usuelle. Les nucléotides en rouge correspondent aux nucléotides constants des régions variables (les verts correspondant aux nucléotides hypervariables).

revue

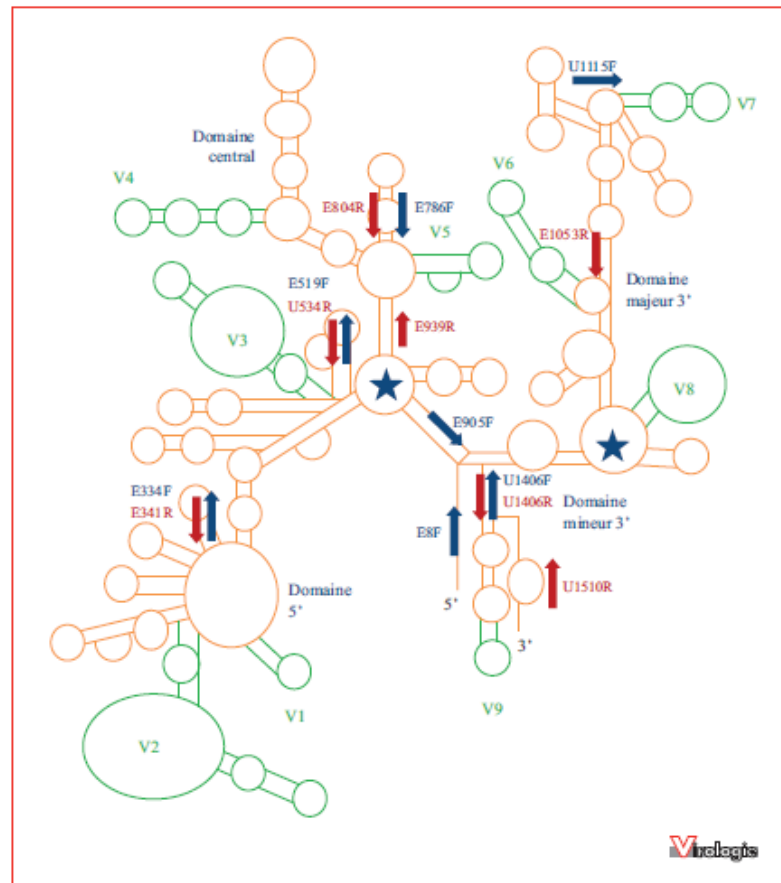


Figure 1. Représentation schématique de la structure secondaire de l'ARN16S bactérien d'*E. coli*. Vx : régions variables (en vert) permettant la classification des espèces bactériennes présentes dans le microbiome ; Cx : régions constantes (en orange), incluant les amorces de séquençage. Les domaines constants indiqués par l'étoile permettent la distinction entre le domaine 5', le domaine central et les domaines mineurs et majeurs 3'. Les flèches représentent quelques amorces sens (en bleu) et antisens (en orange) utilisables pour les protocoles de séquençage. Les flèches représentent les régions nucléotidiques (en prenant *E. coli* comme génome de référence) correspondant aux amorces (indiquées dans le tableau 1) (bleu : amorces sens et rouge : amorces antisens).

transduction du signal ainsi que le transport ionique et le métabolisme). Il a ainsi été prouvé que les bactéries présentes pouvaient différer non seulement par leur présence ou abondance mais par une activation différentielle de gènes de voies de régulation. Cette différence importante entre bactéries d'un même microbiome pourrait donc permettre d'expliquer leur éventuelle pathogénicité respective [14]. En résumé, si les techniques de NGS permettent d'analyser finement le microbiome des voies aériennes, il est important de garder à l'esprit que l'analyse des séquences de

l'ARN16S ne permet que la détection des génomes (OTU). À moins de combiner ce séquençage génomique à celui des ARNm bactériens, le séquençage des OTU ne permet pas de distinguer les micro-organismes viables ou non [15]. De plus, certaines études pan-microbiennes montrent que la diversité obtenue par séquençage de l'ARN16S est sous-estimée comparativement aux approches non ciblées [16]. Il est donc important de distinguer la métagénomique dite « *shotgun* » (permettant de séquencer l'ensemble des gènes présents dans un échantillon), la métagénomique ciblée (se

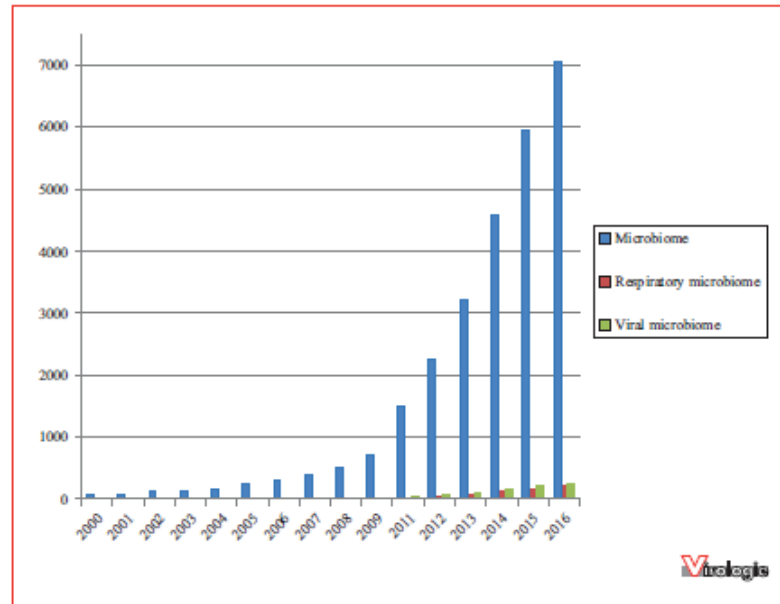


Figure 2. Évolution des données bibliométriques portant sur le microbiome respiratoire de 2000 à 2016. L'échelle verticale représente le total cumulé d'études correspondant aux mots-clés recherchés et l'échelle horizontale, l'année de publication. Les données en bleu représentent le nombre de publications correspondant au mot-clé « *microbiome* », les données en rouge représentent le nombre de publications correspondant au mot-clé « *respiratory microbiome* » et les données en vert correspondent au nombre de publications correspondant au mot-clé « *viral microbiome* ». Le nombre de publications présente une augmentation notable entre les années 2003 et 2016, correspondant à l'émergence de nouvelles technologies de séquençage. Il est intéressant de constater la différence notable de publications, pouvant s'expliquer par la différence d'intérêt de la communauté scientifique, portant sur les microbiomes respiratoires et non respiratoires (digestif principalement). Cette différence ne diminue pas avec l'explosion du nombre de publications sur le sujet.

limitant à l'étude d'un marqueur, le plus souvent l'ARN ribosomal 16S) et la métatranscriptomique (séquençage de l'ensemble des gènes transcrits ou activés présents dans l'échantillon).

Caractéristiques du microbiome respiratoire sain

Des études de grande ampleur ont permis d'obtenir des informations importantes quant à la structure et la composition du microbiome du sujet sain au niveau de différentes niches écologiques (figure 2 et tableau 2).

Ces études, conduites aussi sur le microbiome respiratoire, ont permis de distinguer deux microbiomes : « central » et « satellite ». Le microbiome respiratoire central (dit *core microbiome*) est constitué des espèces bactériennes présentes de façon constante dans plus de 95 % des sites prélevés et partagées entre individus sains. Celui-ci comporte

les gènes microbiens et les voies métaboliques microbiennes permettant une physiologie stable. À noter qu'il diffère de façon constitutive en fonction de l'âge, du sexe, de l'origine sociale et/ou ethnique des patients, mais qu'il reste dépendant de facteurs environnementaux et/ou extrinsèques tels que la prise de traitements (traitement au long cours ou substitutif) ou l'alimentation [17, 18]. Le mode d'accouchement est un facteur fondamental de variation (quantitative et qualitative) de ce microbiome respiratoire à la naissance [19]. Les enfants nés par césarienne présentent plus longtemps des profils de microbiomes respiratoires centraux dominés par *Staphylococcus aureus* à la différence des enfants nés par voie basse dont le microbiome respiratoire central évolue plus rapidement vers un profil plus complexe comprenant les genres *Moraxella*, *Corynebacterium* ou *Dolosigranulum*. Ce profil mature permet une meilleure protection contre les infections respiratoires virales [20, 21]. Il est, en outre, renforcé par la mise en place d'une alimentation au lait maternel. De même, il apparaît que le microbiome nasopharyngé des enfants prématurés

revue

Tableau 2 Espèces bactériennes dominant les microbiomes bactériens respiratoires indépendamment du statut pathologique ou non de l'hôte.

Localisation anatomique	Tractus respiratoire supérieur			Tractus respiratoire inférieur		
	Cavité buccale	Nasopharynx	Oropharynx	Trachée	Poumon	
Mode de prélèvement privilégié	Écouvillonnage nez-gorge	Aspiration nasopharyngée			Aspiration trachéo-bronchique	Lavage broncho-alvéolaire (biopsie)
Bactéries généralement retrouvées	<i>Prevotella</i> <i>Streptococcus</i> ^a <i>Veillonella</i> ^a <i>Haemophilus</i>	<i>Corynebacterium</i> <i>Streptococcus</i> ^a <i>Veillonella</i> ^a <i>Propionibacterium</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Moraxella</i>	<i>Prevotella</i> <i>Streptococcus</i> ^a <i>Veillonella</i> ^a <i>Haemophilus</i> <i>Fusobacterium</i>	<i>Prevotella</i> <i>Streptococcus</i> ^a <i>Veillonella</i> ^a <i>Cloacibacterium</i> <i>Helicobacter</i>	<i>Prevotella</i> <i>Streptococcus</i> ^a <i>Veillonella</i> ^a <i>Pseudomonas</i> <i>Fusobacterium</i>	

^a Espèces présentes de façon constante quelle que soit la région de prélèvement. Il est intéressant de constater que les espèces retrouvées sont variables en fonction du site de prélèvement.

est plus hétérogène que celui des enfants nés à terme [22]. Même si la composition du microbiome varie considérablement au cours de la première année de vie, les profils bactériens centraux convergent progressivement, mais très précocement, vers un profil mature, dès l'âge de deux mois, qui reste stable par la suite. Par opposition au microbiome central, le microbiome périphérique, dit « satellite » correspond aux 5 % restants et est sujet à des variations rapides et réversibles au cours des différentes altérations physiopathologiques. Ces altérations sont très diverses comme des maladies aiguës ou chroniques, une grossesse, la sénescence ou le développement de l'enfant. Le microbiome respiratoire périphérique (plus que le microbiome central) semble donc être le reflet de l'exposition de l'individu aux situations extérieures pouvant modifier son microbiome, comme une prise ponctuelle d'antibiotiques, une infection, mais aussi une modification du mode d'alimentation ou des habitudes de vie [19, 21-23]. Ces quelques pourcents de variation du microbiome pour sa portion « satellite » étant soumis à changement rapide, un profil de microbiome périphérique d'un individu est donc difficilement comparable à celui d'un autre, justifiant de réaliser pour cela des études appariées et/ou longitudinales pour en étudier les modifications.

Impact du microbiote respiratoire bactérien dans la pathogenèse des maladies virales respiratoires

Le tractus respiratoire est en contact constant avec l'environnement extérieur [23]. Historiquement, les études portant sur les micro-organismes détectés dans l'appareil

respiratoire ont analysé les prélèvements à la recherche d'agents pathogènes. L'avènement des technologies de séquençage à haut débit a progressivement permis de décrire, puis de caractériser, la flore bactérienne résidente commensale afin d'en étudier l'impact sur les réponses immunitaires acquises ou innées le long de l'arbre respiratoire [24]. En 2016, parmi plus de 7000 articles répondant au mot-clé « microbiome », une faible proportion d'entre eux traitait du microbiome respiratoire, en particulier, ou de l'évolution du microbiome, en général, au cours des infections virales (figure 2). Il n'existe que peu de données dans ce domaine de recherche et elles concernent principalement le microbiome bactérien à l'exception de rares publications (1 à 2 %) qui ont étudié les composantes virales (virome) et fongiques (mycobiome) du microbiome (figure 3B).

Après un premier temps de caractérisation de la composition et des variations physiologiques du microbiome respiratoire « sain », les études les plus récentes se sont focalisées sur les modifications rencontrées dans des situations dites « pathologiques », qu'il s'agisse d'une infection ou non (figure 3A). Les infections respiratoires aiguës sont majoritairement causées par des virus. En effet, moins de 30 % des causes retrouvées dans les infections respiratoires basses (atteintes des bronches ou des poumons) de l'adulte ne sont pas virales [25]. Cette revue est donc limitée aux descriptions des altérations entraînées par les infections virales sur le tractus respiratoire.

Leung *et al.* ont étudié, par séquençage complet des génomes bactériens, le microbiome pulmonaire des patients infectés par le virus grippal, le comparant aux microbiomes de patients non infectés possédant les mêmes caractéristiques démographiques [14]. Cette analyse montre que les patients infectés ont un microbiome pulmonaire

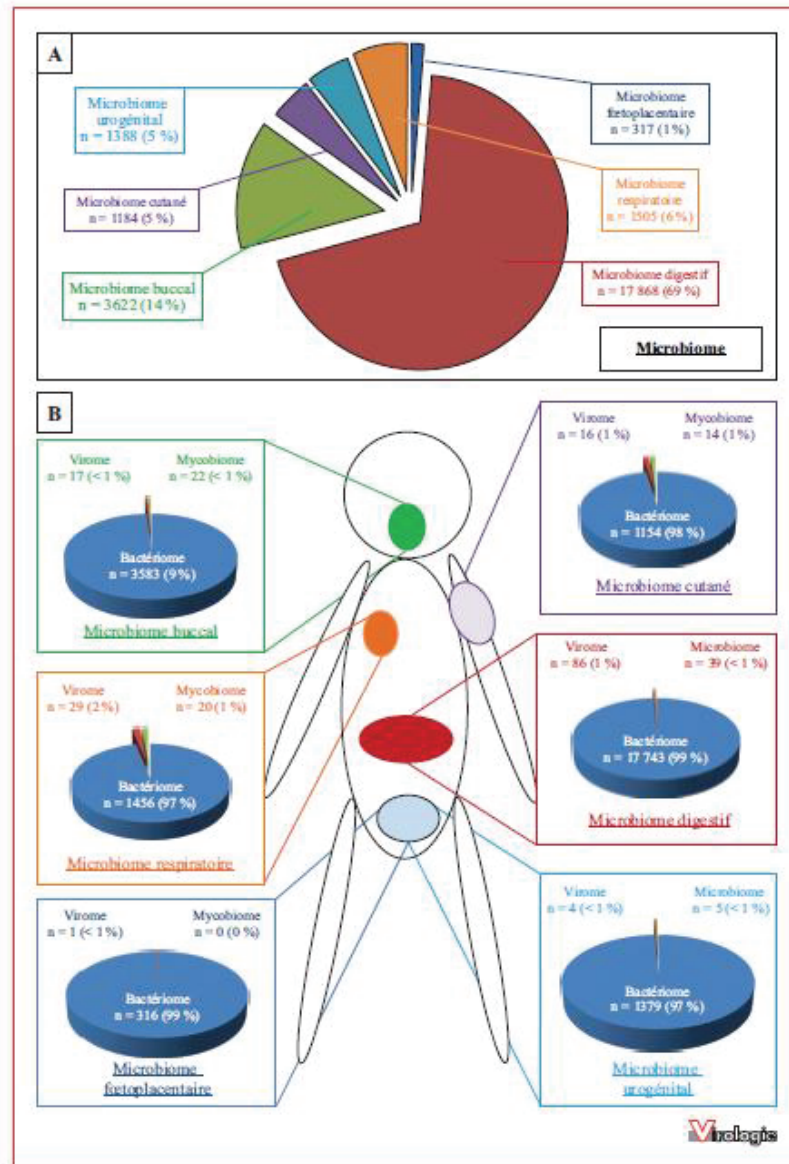


Figure 3. Répartition des publications scientifiques concernant les microbiomes par site anatomique. A) Répartition des publications en fonction de la niche écologique. B) Répartition des publications en fonction des différentes composantes bactériennes, virales et mycotiques du microbiome. À noter que les recherches à propos du microbiome buccal correspondaient aux mots-clés « *microbiome* » et « *oral* » ; du microbiome respiratoire à « *microbiome* » et « *respiratory* » ou « *pulmonary* » ; du microbiome fœtoplacentaire à « *microbiome* » et « *fetal* » ou « *placenta* » ; du microbiome cutané à « *microbiome* » et « *skin* » ; du microbiome digestif à « *microbiome* » et « *gut* » ou « *digestive* » ; du microbiome urogénital à « *microbiome* » et « *urinary* » ou « *genital* » ou « *penis* » ou « *vaginal* ».

revue

constitué de bactéries exprimant plus de gènes améliorant leurs mobilités (chimiotactisme, flagelles) et leurs capacités de régulation du métabolisme ou de transcription que les bactéries du microbiome des patients « sains ». Ces données de métatranscriptomique comparative confortent l'idée de l'existence d'un processus de sélection des micro-organismes métaboliquement capables de s'adapter à un écosystème changeant au sein d'un microbiome ouvert. Ces espèces bactériennes, notamment par l'altération du tapis mucociliaire, seraient capables de se déplacer dans les voies aériennes inférieures et de produire des métabolites immunomodulateurs limitant la réponse de l'hôte à l'infection virale. Ces bactéries pourraient donc impacter fortement le devenir clinique, péjoratif ou non, des hôtes infectés.

L'inflammation excessive suivant l'infection virale contribuant au désordre respiratoire observé, un microbiome capable de favoriser une certaine tolérance immunitaire pourrait potentiellement aider à limiter les dégâts tissulaires dus à l'exacerbation de la réponse inflammatoire. Grâce à un modèle murin, Wang *et al.* ont pu démontrer l'importance d'un microbiome respiratoire intègre sur la tolérance d'un organisme au virus grippal [24]. Pour cela, ils ont utilisé des souris SPF (*Specific Pathogen Free*) connues pour être plus sensibles aux infections grippales (amaigrissement plus important, taux de survie inférieur...) que les souris sauvages du même génotype élevées dans un environnement naturel non stérile. Dans le modèle de souris SPF, la colonisation du tractus respiratoire supérieur par des bactéries commensales permettait de réduire considérablement les altérations pulmonaires liées à l'infection par le virus influenza. Cette colonisation diminuait la létalité de l'infection grippale *via* la modification du phénotype de réponse monocyttaire, induisant un phénotype d'activation macrophagique moins destructeur [26]. Abt *et al.* ont également montré que les souris sauvages prétraitées par un cocktail d'antibiotiques, dénaturant ainsi leur microbiome « naturel », présentaient une morbidité accrue lors d'une infection par le virus pandémique A (H1N1) apparu en 2009 (A (H1N1)_{pdm09}), avec une perte de poids et une désaturation en oxygène importantes [27]. La sévérité de ces atteintes était associée à deux facteurs qui étaient :

- une diminution de la capacité de migration des cellules dendritiques, indispensable pour une réponse immunitaire efficace ;
- une diminution de la concentration en cellules lymphocytaires T spécifiques au niveau tissulaire, contribuant à terme à maintenir une charge virale locale élevée.

Toujours dans un modèle murin, Wu *et al.* ont montré que l'administration *per os* d'un traitement probiotique restaurait significativement la réponse immunitaire de souris traitées aux antibiotiques en permettant une meilleure activation des voies TLR-7 et NFκB [26]. Cette voie de signalisation, impliquée dans la reconnaissance des

ARN viraux simple brin, favorise en effet la clairance virale.

L'ensemble de ces données recueillies chez l'animal suggère que la pathogenèse d'une infection par le virus grippal chez un hôte au microbiome altéré est en partie liée à une réponse immunitaire locale moins efficace. Réciproquement, la présence d'un microbiome « intègre » permet de maintenir une réponse innée efficace ainsi qu'une réponse adaptative appropriée contre le virus influenza. La viabilité des micro-organismes composant ce microbiome « bénéfique » ne semble néanmoins pas indispensable. En effet, il a été possible de restaurer expérimentalement, dans un modèle murin, une réponse immunitaire adaptative efficace après administration de lipopolysaccharides (LPS) chez un hôte sain au microbiome « altéré » [29]. L'hypothèse mécanistique est que le microbiome déclenche l'activation de nombreux récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires exprimés par les pathogènes (*Pathogen-Associated Molecular Patterns* [PAMPS]), stimulant les leucocytes au niveau local comme systémique.

Comme indiqué précédemment, il est maintenant admis que la diversité bactérienne composant le microbiome respiratoire se stabilise à l'approche de la première année de vie. Ce microbiome, par la diversité des micro-organismes qui le constituent, impacte la physiologie de l'hôte ainsi que son immunité [30-34]. La présence de bactéries du genre *Moraxella* dans ce microbiome semble associée au risque d'une plus grande sévérité de l'infection par le virus respiratoire syncytial (VRS). En retour, le VRS est lui-même capable d'altérer fortement le microbiome respiratoire de l'hôte [21, 35-37]. Durant l'hiver, les co-infections VRS/*Moraxella* ne sont pas rares, ces deux pathogènes co-circulant durant la période la plus froide de l'année. La bronchiolite à VRS se complique fréquemment d'une otite moyenne d'étiologie bactérienne, suggérant que l'infection virale puisse faire le lit de la surinfection bactérienne. Ce type d'interaction « virus-bactérie » a aussi été démontré de longue date pour les surinfections pneumococciques de la maladie grippale [38]. De nombreux mécanismes d'interaction entre bactéries (principalement le pneumocoque) et virus influenza ont ainsi été mis en évidence depuis leur première description au cours de la pandémie de 1918 (revus dans [39, 40]). Ceux-ci vont de l'interaction directe virus-bactérie, *via* une activité sialidase du pneumocoque aidant à la libération des virions néoformés, à l'impact anatomique, par destruction de la barrière épithéliale et altération de la structure du surfactant et de l'arbre bronchiolaire, ou immunitaire lié à une dysfonction des réponses innées et adaptatives. De manière générale, il a été montré que les microbiomes nasopharyngés à forte dominance d'*Haemophilus influenzae* et de *Streptococcus*, par opposition aux microbiomes riches en *S. aureus*, étaient associés à des réponses immunitaires

exacerbées de l'hôte lors des infections respiratoires. Cette exacerbation est à l'origine d'une augmentation du taux d'hospitalisation, du fait d'une plus grande sévérité de la maladie au niveau respiratoire, confortant l'hypothèse de l'implication du microbiome dans la réponse inflammatoire aux infections virales [41]. Toutefois, pour l'instant, les études réalisées n'ont fait qu'entrevoir une partie des mécanismes complexes associant le microbiome et la réponse immunitaire.

Impact clinique du microbiome respiratoire

Utilisation thérapeutique dans le cadre de la prise en charge des infections virales

L'impact du microbiome dans la pathogenèse des infections respiratoires virales est donc fortement suspecté. Par analogie avec des thérapies du tractus gastro-intestinal, il semble envisageable de moduler le microbiome respiratoire. Nembrini *et al.* ont, par exemple, développé un modèle murin d'administration directe d'*Escherichia coli* dans les voies aériennes [42]. Ces inoculations ont montré un effet bénéfique sur l'inflammation locale, fortement impliquée dans la pathogenèse des infections respiratoires, limitant ainsi la symptomatologie clinique. De même, un essai clinique dirigé par Bruzzese *et al.* a montré l'influence positive de l'administration de *Lactobacillus rhamnosus* (à distance de la sphère respiratoire car administré oralement) sur le nombre et la sévérité des exacerbations de mucoviscidose [43]. Bien que nécessitant d'être validée par des études de cohorte de taille suffisante, le bénéfice de la modification thérapeutique du microbiome respiratoire dans le cadre de maladies respiratoires chroniques semble fortement suggéré par ces études. Néanmoins, peu d'études se sont intéressées à la modification du microbiome respiratoire dans le cadre des infections virales aiguës.

Certains auteurs ont néanmoins montré que l'augmentation temporaire de l'inflammation des voies aériennes par administration d'antigènes bactériens pourrait être une approche thérapeutique des infections à virus influenza [29]. Dans un modèle murin, il a été aussi montré que des animaux prétraités par des aérosols de lysats bactériens (contenant du LPS) présentaient une réponse inflammatoire plus rapide et plus performante quant à l'obtention de la clairance virale au cours d'une infection virale ultérieure. La réponse induite par le LPS diminuait l'altération tissulaire liée à l'infection virale améliorant la survie des animaux infectés [44]. Ces données restent encore contestées dans le cadre spécifique de l'infection par les virus influenza. En effet, il est admis que l'inflammation générée par l'infection virale est responsable de la majorité des manifestations cliniques observées ;

or l'utilisation de traitements immunomodulateurs n'a pas montré d'efficacité dans le cadre d'essais cliniques. La situation semble donc plus complexe. À l'instar de ce qui a déjà été étudié pour la prise en charge des sepsis sévères, la maîtrise de la réponse inflammatoire n'a d'intérêt que lors de la phase précoce de la maladie. Une large part de la difficulté du contrôle de l'inflammation au cours de l'infection grippale est ainsi liée au fait qu'elle varie en fonction au cours du temps, des étapes précoces aux phases tardives de la maladie [45].

De façon similaire, l'activation des TLR-2, 6 et 9, au moyen d'un prétraitement par des agonistes synthétiques, permettait de réduire le titre viral mesuré dans les infections par les virus parainfluenza dans les prélèvements respiratoires, sans pour autant permettre de réduire la symptomatologie d'hyperréactivité bronchique [46]. Enfin, l'administration de toxines inactivées d'*E. coli* a démontré son efficacité pour constituer une protection contre l'infection par VRS et les virus grippaux, tout comme l'administration de *L. rhamnosus* avant la mise en contact avec le VRS [47, 48]. Ces lactobacilles permettraient de protéger contre l'excès d'inflammation au cours de l'infection, modifiant à la fois la production de nombreux médiateurs pro-inflammatoires (interférons et interleukines) et l'activation des cellules dendritiques via l'expression de CD103 et CD11b [49].

Plusieurs études cliniques ont tenté de démontrer l'intérêt de l'utilisation des prébiotiques (composés non digestibles favorisant la croissance ou l'activité des bactéries commensales) et/ou des probiotiques (administration directe de bactéries de la flore), modifiant le microbiome respiratoire en présence, pour la prise en charge des infections virales [28, 50-54]. Dans un essai clinique randomisé en double insu sur une cohorte de nourrissons finlandais, Luoto *et al.* ont exploré l'effet de l'administration de *L. rhamnosus* (probiotique) ou d'un mélange de galacto-oligosaccharide polydextrose (prébiotique connu pour favoriser la croissance des lactobacilles et des bifidobactéries) sur la survenue d'infections virales. Ces deux stratégies préventives ont permis de réduire l'incidence des infections respiratoires virales symptomatiques. L'effet observé était très net sur les infections à rhinovirus mais non détectable pour celles à VRS.

Bien que ces premières études soient très encourageantes, le chemin à parcourir est encore long avant de pouvoir utiliser ces approches « d'enrichissement bactérien » du microbiome respiratoire, en vue de prévenir ou de traiter une infection virale respiratoire, et nécessitera encore de nombreuses études impliquant des cohortes de taille importante.

Utilisation en biomarqueurs

Très rapidement, il a été imaginé d'utiliser le microbiome comme un marqueur de risque pour la survenue d'une

revue

infection respiratoire sévère. En effet, avant même la description du concept de microbiome, il avait été observé que la détection puis l'augmentation de la proportion de certaines espèces bactériennes (*Pseudomonas aeruginosa*, par exemple) dans le tractus respiratoire signaient un tournant péjoratif dans l'évolution de la maladie chez les patients atteints de mucoviscidose [55].

La connaissance du microbiome d'un individu pourrait permettre de prédire le niveau de risque de celui-ci vis-à-vis des agressions respiratoires bactériennes ou virales. Même si les données sont encore limitées, il a récemment été décrit que le portage nasal de pneumocoque était statistiquement positivement corrélé à la séropositivité au Métapneumovirus chez l'enfant [56]. Les auteurs concluent ainsi, après vérification dans un modèle cellulaire, à l'implication de cette bactérie dans la susceptibilité d'un organisme, ici un enfant, à l'infection par le Métapneumovirus.

Dans une étude publiée en 2017, notre équipe a étudié les microbiomes des enfants présentant des infections grippales de sévérité variable. Nous avons pu mettre en évidence, chez des enfants infectés par le virus influenza A ou B, que plusieurs OTU (*S. aureus*, *Prevotella*, *Lachnospiraceae incertae sedis*, *Streptobacillus*, *Porphyromonas*, *Granulicatella*, *Veillonella*, *Fusobacterium* et *Haemophilus* spp.) étaient présentes, dès le début de la maladie, dans des proportions différentes et que cela avait des conséquences sur le devenir clinique du patient infecté. À l'exception de *S. aureus*, toutes ces OTU étaient retrouvées en quantités plus abondantes chez les patients évoluant vers des formes sévères de grippe, et ce dès le prélèvement initial [57]. La détection de ces OTU conjointement à celle du virus grippal pourrait conduire à proposer une prise en charge adaptée dès le début de l'infection. L'orientation initiale des patients, optimisée du fait de l'existence ou non d'un risque identifié de complications respiratoires, permettrait d'améliorer leur prise en charge. Une étude multicentrique, débutée en 2017, permettra de confirmer la réalité de cette différence et surtout l'utilité d'un tel biomarqueur pour la prise en charge des enfants grippés. Le microbiome pourrait donc servir, à terme, de marqueur pronostique en aidant à la prise en charge précoce de patients à risque.

Bien qu'aucune relation causale entre les caractéristiques du microbiome nasopharyngé et la réponse aux infections virales ne puisse être déduite de ces études, les données actuellement disponibles suggèrent néanmoins que l'étude du microbiome pourrait permettre d'obtenir un facteur prédictif des conséquences cliniques de cette infection. L'utilisation des caractéristiques du microbiome dans le cadre la prise en charge des patients infectés pourrait donc être envisagée. Réciproquement, une modification du microbiome bactérien, par vaccination ou administration, pourrait avoir des conséquences sur les maladies

infectieuses, qu'elles relèvent ou non d'une stratégie de prévention vaccinale [58, 59].

Conclusions

Les études réalisées à ce jour semblent montrer que le microbiome bactérien respiratoire régule plusieurs étapes de la réponse immunitaire à l'infection par un virus respiratoire. Le microbiome respiratoire ayant été étudié jusqu'ici dans des modèles *in vitro*, des modèles d'infection chronique ou sur des populations standardisées (populations immunodéprimées ou néonatales), il est difficile d'extrapoler les résultats obtenus à la population générale. Il semble toutefois acquis que les micro-organismes constituant le microbiome humain influencent fortement la physiologie humaine et la physiopathologie des infections virales respiratoires.

Les données physiopathologiques disponibles suggèrent néanmoins une possible utilisation des connaissances sur le microbiome dans le domaine de la santé humaine. En effet, ce microbiome étant à la fois cause et reflet d'une détérioration possible de la maladie, son utilisation comme marqueur ou comme outil thérapeutique semble être possible en clinique humaine. La détermination de biomarqueurs de sévérité, par la démocratisation et l'amélioration continue des techniques de séquençage à haut débit, permettra d'améliorer plus finement la prise en charge des patients, en vue d'une « médecine personnalisée ». De même, la correction du microbiome satellite, variable selon les conditions environnementales, pourrait permettre une amélioration thérapeutique ou pronostique des maladies infectieuses, comme c'est le cas pour les maladies inflammatoires.

Les domaines de recherche sur le microbiome constituent un immense champ d'investigation aussi bien à l'échelle du pathogène isolé qu'en tant que communauté microbienne complexe. Ces études permettront surtout de comprendre les interactions avec les autres composantes, aussi bien virales que fongiques, du microbiome. Les informations disponibles sur ces deux dernières composantes restent en effet très limitées, mais augurent potentiellement de nombreuses avancées scientifiques à court terme.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Iwai S, Fei M, Huang D, et al. Oral and airway microbiota in HIV-infected pneumonia patients. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 2995-3002.
2. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biol* 2016; 14: e1002533.

3. Segal LN, Blaser MJ. A brave new world : the lung microbiota in an era of change. *Ann Am Thorac Soc* 2014 ; 11 Suppl 1 : S21-7.
4. Di Bella JM, Bao Y, Gloor GB, Burton JP, Reid G. High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research. *J Microbiol Methods* 2013 ; 95 : 401-14.
5. Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1998 ; 73 : 127-41.
6. Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 1997 ; 63 : 4516-22.
7. Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain : the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977 ; 74 : 5088-90.
8. Hamady M, Walker JJ, Harris JK, Gold NJ, Knight R. Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. *Nat Methods* 2008 ; 5 : 235-7.
9. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al. Introducing mothur : open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 2009 ; 75 : 7537-41.
10. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010 ; 7 : 335-6.
11. Ahn J-H, Kim B-Y, Song J, Weon H-Y. Effects of PCR cycle number and DNA polymerase type on the 16S rRNA gene pyrosequencing analysis of bacterial communities. *J Microbiol Seoul Korea* 2012 ; 50 : 1071-4.
12. Albertsen M, Karst SM, Ziegler AS, Kirkegaard RH, Nielsen PH. Back to Basics-The Influence of DNA Extraction and Primer Choice on Phylogenetic Analysis of Activated Sludge Communities. *PLoS One* 2015 ; 10 : e0132783.
13. Bakker MG, Tu ZJ, Bradeen JM, Kinkel LL. Implications of pyrosequencing error correction for biological data interpretation. *PLoS One* 2012 ; 7 : e44357.
14. Leung RK-K, Zhou J-W, Guan W, et al. Modulation of potential respiratory pathogens by pH1N1 viral infection. Raoult D, éditeur. *Clin Microbiol Infect* 2013 ; 19 : 930-5.
15. Sze MA, Hogg JC, Sin DD. Bacterial microbiome of lungs in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2014 ; 9 : 229-38.
16. Engel P, Stepanauskas R, Moran NA. Hidden Diversity in Honey Bee Gut Symbionts Detected by Single-Cell Genomics. Richardson PM, éditeur. *PLoS Genet* 2014 ; 10 : e1004596.
17. Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, et al. Analysis of the Lung Microbiome in the « Healthy » Smoker and in COPD. Bereswill S, éditeur. *PLoS ONE* 2011 ; 6 : e16384.
18. Huse SM, Ye Y, Zhou Y, Fodor AA. A core human microbiome as viewed through 16S rRNA sequence clusters. *PLoS One* 2012 ; 7 : e34242.
19. Chu DM, Ma J, Prince AL, et al. Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. *Nat Med* 2017 ; 23 : 314-26.
20. Biesbroek G, Tsivtsivadze E, Sanders EAM, et al. Early respiratory microbiota composition determines bacterial succession patterns and respiratory health in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2014 ; 190 : 1283-92.
21. Teo SM, Mok D, Pham K, et al. The infant nasopharyngeal microbiome impacts severity of lower respiratory infection and risk of asthma development. *Cell Host Microbe* 2015 ; 17 : 704-15.
22. Perez GF, Pérez-Losada M, Isaza N, et al. Nasopharyngeal microbiome in premature infants and stability during rhinovirus infection. *J Investig Med* 2017 ; 65 : 984-90.
23. Lynch SV. Viruses and microbiome alterations. *Ann Am Thorac Soc* 2014 ; 11 Suppl 1 : S57-60.
24. The NIH HMP Working Group, Peterson J, Garges S, Giovanni M, et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res* 2009 ; 19 : 2317-23.
25. Jain P, Jain A, Prakash S, et al. Prevalence and genotypic characterization of human parvovirus B19 in children with hemato-oncological disorders in North India. *J Med Virol* 2015 ; 87 : 303-9.
26. Wang J, Li F, Sun R, et al. Bacterial colonization dampens influenza-mediated acute lung injury via induction of M2 alveolar macrophages. *Nat Commun* 2013 ; 4.
27. Abt MC, Osborne LC, Monticelli LA, et al. Commensal Bacteria Calibrate the Activation Threshold of Innate Antiviral Immunity. *Immunity* 2012 ; 37 : 158-70.
28. Wu S, Jiang Z-Y, Sun Y-F, et al. Microbiota Regulates the TLR7 Signaling Pathway Against Respiratory Tract Influenza A Virus Infection. *Curr Microbiol* 2013 ; 67 : 414-22.
29. Ichinohe T, Pang IK, Kumamoto Y, et al. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *PNAS USA* 2011 ; 108 : 5354-9.
30. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 ; 108 Suppl 1 : 4578-85.
31. Planer JD, Peng Y, Kau AL, et al. Development of the gut microbiota and mucosal IgA responses in twins and gnotobiotic mice. *Nature* 2016 ; 534 : 263-6.
32. Bokulich NA, Chung J, Battaglia T, et al. Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Sci Transl Med* 2016 ; 8 : 343ra82.
33. Yatsunenok T, Rey FE, Manary MJ, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 2012 ; 486 : 222-7.
34. Desai MS, Seekatz AM, Koropatkin NM, et al. A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell* 2016 ; 167 : 1339-53.e21.
35. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 2013 ; 504 : 446-50.
36. Arpaia N, Campbell C, Fan X, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* 2013 ; 504 : 451-5.
37. Beura LK, Hamilton SE, Bi K, et al. Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. *Nature* 2016 ; 532 : 512-6.
38. McCullers JA, Bartmess KC. Role of Neuraminidase in Lethal Synergism between Influenza Virus and *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 2003 ; 187 : 1000-9.
39. McCullers JA. The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. *Nat Rev Microbiol* 2014 ; 12 : 252-62.
40. Pichon M, Lina B, Jossel L. Impact of the Respiratory Microbiome on Host Responses to Respiratory Viral Infection. *Vaccines* 2017 ; 5.
41. de Steenhuijsen Pters WAA, Heinonen S, Hasrat R, et al. Nasopharyngeal Microbiota, Host Transcriptome, and Disease Severity in Children with Respiratory Syncytial Virus Infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2016 ; 194 : 1104-15.
42. Nembrini C, Sichelstiel A, Kisielow J, et al. Bacterial-induced protection against allergic inflammation through a multicomponent immunoregulatory mechanism. *Thorax* 2011 ; 66 : 755-63.
43. Bruzzese E, Raia V, Spagnuolo MI, et al. Effect of Lactobacillus GG supplementation on pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis : a pilot study. *Clin Nutr* 2007 ; 26 : 322-8.
44. Tuvim MJ, Evans SE, Clement CG, et al. Augmented lung inflammation protects against influenza A pneumonia. *PLoS One* 2009 ; 4 : e4176.
45. Monneret G, Venet F. Sepsis-induced immune alterations monitoring by flow cytometry as a promising tool for individualized therapy. *Cytometry B Clin Cytom* 2016 ; 90 : 376-86.

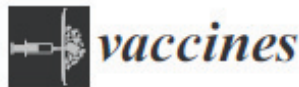
revue

46. Drake MG, Evans SE, Dickey BF, Fryer AD, Jacoby DB. Toll-like receptor-2/6 and Toll-like receptor-9 agonists suppress viral replication but not airway hyperreactivity in guinea pigs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013; 48 : 790-6.
47. Norton EB, Clements JD, Voss TG, Cárdenas-Freytag L. Prophylactic administration of bacterially derived immunomodulators improves the outcome of influenza virus infection in a murine model. *J Virol* 2010; 84 : 2983-95.
48. Williams AE, Edwards L, Humphreys IR, et al. Innate imprinting by the modified heat-labile toxin of *Escherichia coli* (LTk63) provides generic protection against lung infectious disease. *J Immunol* 2004; 173 : 7435-43.
49. Chiba E, Tomosada Y, Vizoso-Pinto MG, et al. Immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* improves resistance of infant mice against respiratory syncytial virus infection. *Int Immunopharmacol* 2013; 17 : 373-82.
50. Arslanoglu S, Moro GE, Boehm G. Early supplementation of prebiotic oligosaccharides protects formula-fed infants against infections during the first 6 months of life. *J Nutr* 2007; 137 : 2420-4.
51. Luoto R, Ruuskanen O, Waris M, et al. Prebiotic and probiotic supplementation prevents rhinovirus infections in preterm infants: a randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133 : 405-13.
52. Rautava S, Salminen S, Isolauri E. Specific probiotics in reducing the risk of acute infections in infancy ? a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr* 2009; 101 : 1722.
53. Taipale T, Pienihelkinen K, Isolauri E, et al. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in reducing the risk of infections in infancy. *Br J Nutr* 2011; 105 : 409-16.
54. Maldonado J, Canabate F, Sempere L, et al. Human milk probiotic *Lactobacillus fermentum* CECT5716 reduces the incidence of gastrointestinal and upper respiratory tract infections in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 54 : 55-61.
55. Mayer-Hamblett N, Rosenfeld M, Gibson RL, et al. *Pseudomonas aeruginosa* in vitro phenotypes distinguish cystic fibrosis infection stages and outcomes. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 190 : 289-97.
56. Verkaik NJ, Nguyen DT, de Vogel CP, et al. *Streptococcus pneumoniae* exposure is associated with human metapneumovirus seroconversion and increased susceptibility to in vitro HMPV infection. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17 : 1840-4.
57. Langevin S, Pichon M, Smith E, et al. Early nasopharyngeal microbial signature associated with severe influenza in children : a retrospective pilot study. *Journal of General Virology* 2017; 98, doi: 10.1099/jgv.0.000920.
58. Biesbroek G, Wang X, Keijser BJJ, et al. Seven-valent pneumococcal conjugate vaccine and nasopharyngeal microbiota in healthy children. *Emerg Infect Dis* 2014; 20 : 201-10.
59. Tarabichi Y, Li K, Hu S, et al. The administration of intranasal live attenuated influenza vaccine induces changes in the nasal microbiota and nasal epithelium gene expression profiles. *Microbiome* 2015; 3 : 74.
60. Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods* 2003; 55 : 541-55.

revue

46. Drake MG, Evans SE, Dickey BF, Fryer AD, Jacoby DB. Toll-like receptor-2/6 and Toll-like receptor-9 agonists suppress viral replication but not airway hyperreactivity in guinea pigs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013; 48 : 790-6.
47. Norton EB, Clements JD, Voss TG, Cárdenas-Freytag L. Prophylactic administration of bacterially derived immunomodulators improves the outcome of influenza virus infection in a murine model. *J Virol* 2010; 84 : 2983-95.
48. Williams AE, Edwards L, Humphreys IR, et al. Innate imprinting by the modified heat-labile toxin of *Escherichia coli* (LTk63) provides generic protection against lung infectious disease. *J Immunol* 2004; 173 : 7435-43.
49. Chiba E, Tomosada Y, Vizoso-Pinto MG, et al. Immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* improves resistance of infant mice against respiratory syncytial virus infection. *Int Immunopharmacol* 2013; 17 : 373-82.
50. Arslanoglu S, Moro GE, Boehm G. Early supplementation of prebiotic oligosaccharides protects formula-fed infants against infections during the first 6 months of life. *J Nutr* 2007; 137 : 2420-4.
51. Luoto R, Ruuskanen O, Waris M, et al. Prebiotic and probiotic supplementation prevents rhinovirus infections in preterm infants : a randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133 : 405-13.
52. Rautava S, Salminen S, Isolauri E. Specific probiotics in reducing the risk of acute infections in infancy ? a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr* 2009; 101 : 1722.
53. Taipale T, Pienihäkkinen K, Isolauri E, et al. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in reducing the risk of infections in infancy. *Br J Nutr* 2011; 105 : 409-16.
54. Maldonado J, Canabate F, Sempere L, et al. Human milk probiotic *Lactobacillus fermentum* CECT5716 reduces the incidence of gastrointestinal and upper respiratory tract infections in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 54 : 55-61.
55. Mayer-Hamblett N, Rosenfeld M, Gibson RL, et al. *Pseudomonas aeruginosa* in vitro phenotypes distinguish cystic fibrosis infection stages and outcomes. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 190 : 289-97.
56. Verkaik NJ, Nguyen DT, de Vogel CP, et al. *Streptococcus pneumoniae* exposure is associated with human metapneumovirus seroconversion and increased susceptibility to in vitro HMPV infection. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17 : 1840-4.
57. Langevin S, Pichon M, Smith E, et al. Early nasopharyngeal microbial signature associated with severe influenza in children : a retrospective pilot study. *Journal of General Virology* 2017; 98, doi: 10.1099/jgv.0.000920.
58. Biesbroek G, Wang X, Keijser BJJ, et al. Seven-valent pneumococcal conjugate vaccine and nasopharyngeal microbiota in healthy children. *Emerg Infect Dis* 2014; 20 : 201-10.
59. Tarabichi Y, Li K, Hu S, et al. The administration of intranasal live attenuated influenza vaccine induces changes in the nasal microbiota and nasal epithelium gene expression profiles. *Microbiome* 2015; 3 : 74.
60. Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods* 2003; 55 : 541-55.

Annexe C. PICHON M., Lina B., Josset L. Impact of the microbiome on host responses to respiratory viral infection. *Vaccines* 5, 40; November 11, 2017



Review

Impact of the Respiratory Microbiome on Host Responses to Respiratory Viral Infection

Maxime Pichon ^{1,2} , Bruno Lina ^{1,2} and Laurence Josset ^{1,2,*}

¹ Hospices Civils de Lyon, Centre National de Référence des virus des Infections Respiratoires France Sud, Laboratoire de Virologie, Institut des Agents Infectieux, Groupement Hospitalier Nord, F-69317 Lyon CEDEX 04, France; maxime.pichon01@chu-lyon.fr (M.P.); bruno.lina@chu-lyon.fr (B.L.)

² Université de Lyon, Faculté de Médecine Lyon Est, Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), Inserm U1111, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR5308, Ecole Nationale Supérieure de Lyon (ENS), équipe Virpath, F-69372 Lyon CEDEX 08, France

* Correspondence: laurence.josset@chu-lyon.fr; Tel.: +33(0)-472-071-022

Academic Editors: Angela L. Rasmussen and Juliet Morrison

Received: 5 September 2017; Accepted: 31 October 2017; Published: 3 November 2017

Abstract: Viruses are responsible for most of both upper and lower acute respiratory infections (ARIs). The microbiome—the ecological community of microorganisms sharing the body space, which has gained considerable interest over the last decade—is modified in health and disease states. Even if most of these disturbances have been previously described in relation to chronic disorders of the gastrointestinal microbiome, after a short reminder of microbiome characteristics and methods of characterization, this review will describe the impact of the microbiome (mainly respiratory) on host responses to viral ARIs. The microbiome has a direct environmental impact on the host cells but also an indirect impact on the immune system, by enhancing innate or adaptive immune responses. In microbial infections, especially in viral infections, these dramatic modifications could lead to a dramatic impact responsible for severe clinical outcomes. Studies focusing on the microbiome associated with transcriptomic analyses of the host response and deep characterization of the pathogen would lead to a better understanding of viral pathogenesis and open avenues for biomarker development and innovative therapeutics.

Keywords: respiratory tract; viral infections; respiratory microbiome; 16S; whole genome sequencing; NGS

1. Introduction

1.1. Burden of Acute Respiratory Infections (ARI)

Acute respiratory infections (ARIs) are the most common type of acute infection worldwide in both adults and children and are mainly caused by viruses, including respiratory syncytial virus (RSV), human rhinovirus (hRV), influenza virus (IV), or metapneumovirus (hMPV). In Europe, lower respiratory tract infection is the eighth leading cause of disease in both adults and children [1]. ARIs account for an estimated 40% of all healthcare-associated infections in pediatric long-term care facilities [2]. Most of these viral infections could lead to very severe forms of respiratory diseases. For example, it is estimated that 33.8 million new episodes of RSV-associated acute respiratory infection occurred worldwide in children younger than 5 years of age, during the 2005 epidemics, with at least 10% of these children necessitating hospital admission [3].

Attempts to prevent respiratory viral infections are currently limited to vulnerable high-risk groups such as immunocompromised patients, the elderly, or young children and include optimized vaccination, reduced exposure and prophylactic treatment. Because of the burden, the clinical

presentation and the difficulties with anticipating clinical complications of respiratory infections, it is necessary to better understand their pathophysiology.

1.2. The Respiratory Microbiome: Still a Lot of Unknowns

The human microbiota comprises all microorganisms (bacteria, viruses, fungi, *archae*) that exist in the human body. Despite numerous studies on the microbiome, the definition of this term is still controversial. From a genomic perspective, the microbiome can be considered the collection of the microbiota genomes [4]. From an ecological perspective, the microbiome corresponds to the whole ecological niche considered (-biome), including both the microbiota and the habitat it colonizes. While most of the studies on the microbiome have only described its bacterial component, the human body is colonized by more viruses than bacteria and also comprises fungi and *archae* [5,6]. Given that no study currently describes the composition and the role of the respiratory virome and mycobiome during ARI, we will focus on the bacterial microbiota only in this review.

Extensive studies in the general population have focused on the characterization of the bacterial microbiota per niche. These studies have obtained important information on the structure and variation of the composition over time of the different microbiomes. It is important to acknowledge that the baseline microbiome varies among normal individuals and that colonization by certain bacteria appears to be conferring either a protective or deleterious effect on subsequent viral infection (described in Table 1). However, contrary to the gastrointestinal tract or skin niches, it is only recently that the respiratory tract microbiome has been studied.

Although more than 7000 articles were associated with the “microbiome” keyword in PubMed, with a slight part focusing on respiratory tract microbiome, only a small proportion focused on microbiome disturbance in viral infections, especially in respiratory tract infections (Figure 1).

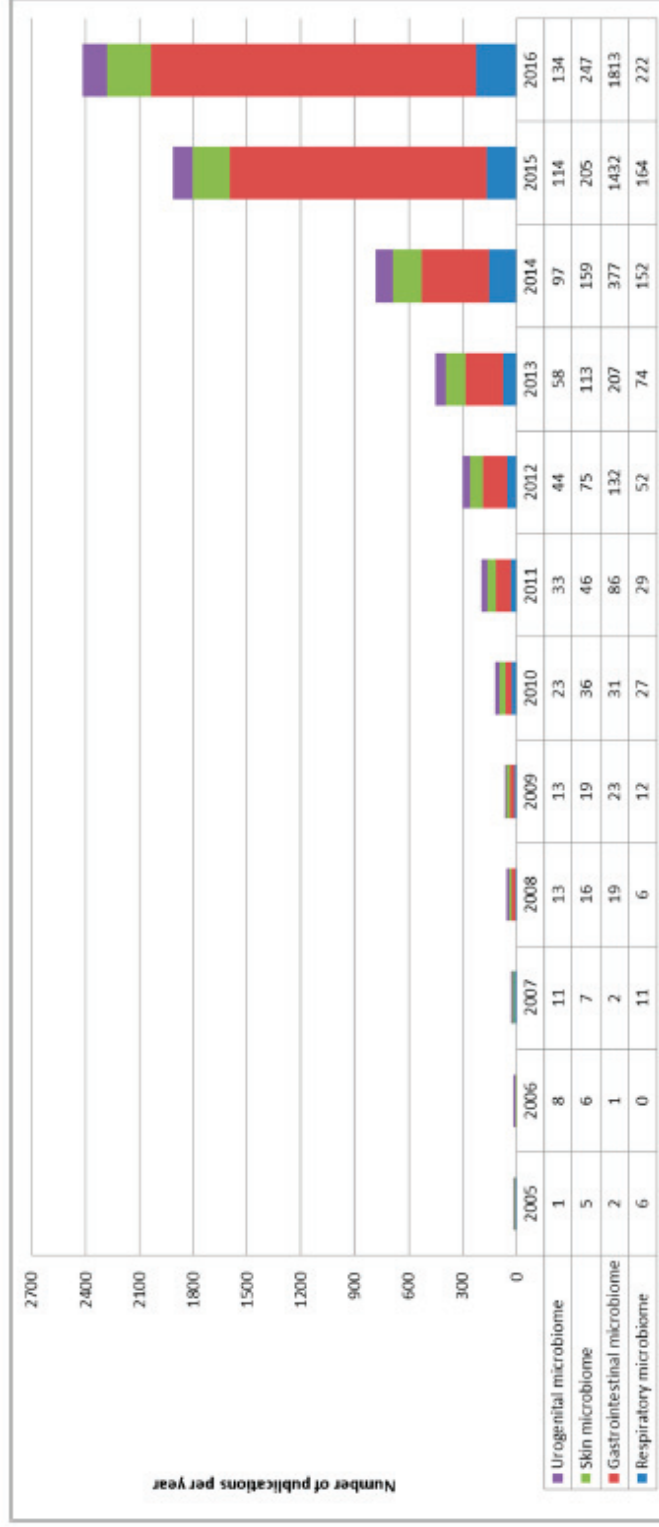


Figure 1. Bibliometric parameters of microbiome studies. Representations were limited to the four most abundant microbiomes (urogenital tract in purple, skin microbiome in green, gastrointestinal tract in red and respiratory microbiome in blue). The number of publication focusing on microbiome increased slightly until 2011, after which Next Generation Sequencing (NGS) technologies became more widely available. Microbiome publications focused mainly on gastrointestinal microbiome; the other three niches being studied in the same proportions.

2. Impact of the Respiratory Microbiota on Viral Infection Pathogenesis

After a first period focusing on the characterization of the composition and the physiological variations of the “healthy” respiratory microbiome, most recent studies have focused on changes induced during a so-called “pathological” situation, infectious or not. Unfortunately, only few studies have compared baseline healthy pre-infection microbiome and post-infection modified microbiome in acute infections as it is very difficult to get human samples before viral infection, except in challenge studies [7,8]. Animal studies provide some insight into the mechanisms, yet their respiratory microbiome is very different to the human microbiome and in addition, while there are lots of studies describing bacteria-virus interactions between defined pathogens, only a few studies have analyzed trans-kingdom interactions within the respiratory microbiota. For example, it has been well established that pneumococcus super infection following IV infection dramatically increases the lethality of influenza in a mouse model and in humans [9,10]. However, how the whole respiratory microbiota is associated with influenza severity is still largely unexplored [11–13]. The respiratory microbiota could impact ARI outcome through bacteriome-bacteriome or bacteriome-virome interactions (Table 1). Interactions between bacteriophages and the bacteriome are increasingly being described in the GI. Bacteriophages could alter the bacteriome composition and function through both lytic and lysogenic infections of their hosts [14]. In addition, bacteriophages binding to the intestinal mucosae might provide some form of acquired immunity to invading pathogens [15]. However, there are currently no data available describing interactions between the prokaryotic virome and the bacterial microbiota in the respiratory tract. Therefore, this review describes only interactions between bacterial microbiota and a single viral pathogen.

2.1. Bacterial Microbiota Direct Impact on the Respiratory Tract Environment

Several studies indicate that the lung bacterial microbiota influences lung morphology, function and mucosal lymphoid tissue development [16,17]. During ARI, the respiratory bacterial microbiota may also directly impact on the respiratory tract environment to influence viral pathogenesis. Using bacterial whole genome sequencing, Leung et al. have studied the respiratory microbiome of patients infected by IV compared to that of uninfected patients with the same demographic characteristics [18]. These metatranscriptomic data have shown that IV-infected patients have a modified bacterial microbiome. These bacteria contain more mobility genes, flagella-assembling genes and/or response-to-chemotaxis genes compared to the same bacteria in non-infected patients. The existence of a selection process for metabolically-adapted bacteria could be evoked and may lead to bacteria-induced mucociliary alterations and secretion of immunomodulating metabolites limiting the host response. The presence of these species was associated with severe anatomical consequences, leading to very poor clinical outcomes for the infected hosts (respiratory distress or even death).

Table 1. Microbiome-specific bacteria implicated in or modified during viral infections. IV: Influenza virus; MPV: Metapneumovirus; RV: Rhinovirus; RSV: Respiratory Syncytial Virus. The main viruses responsible for respiratory infections (IV, RSV and RV) are also the most studied. It is interesting to note that the increase in considered bacteria exists independently of the observed virus (*Lactobacillus rhamnosus*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* are protective whatever the viral model; the presence of *Streptococcus pneumoniae* is associated with an increase of the complication rate or seroconversion). Outcome “complication”: disease worsening; outcome “Protection”: indicate a limitation of the disease complications.

Virus	Model	Sample Site	Bacteria	Consequences	Outcome	Reference
	Human clinical samples	Induced sputum	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Bacillus</i> spp. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacteria species increasing during A(H1N1) infection	No modification	Leung et al. [18]
	Human clinical samples	Induced sputum	<i>Neisseria</i> spp. <i>Prevotella</i> spp.	Bacteria species decreasing during A(H1N1) infection	No modification	Leung et al. [18]
	Mouse model	Lung homogenates	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Increased severity	Complication	McCullers et al. [10]
	Human clinical samples	Nasopharyngeal samples	<i>Streptococcus</i> spp. <i>Porphyromonas</i> spp. <i>Granulicatella</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp. <i>Lachnospiraceae</i> spp. <i>Haemophilus</i> spp.	Predict a severe form of influenza in children	Complication	Langevin et al. [13]
IV	Human clinical samples	Nasopharyngeal samples	<i>Staphylococcus aureus</i>	Predict a benign form of influenza in children	Protection	Langevin et al. [13]
	Human clinical samples	Nasal swabs	<i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Bacteroides omnis</i>	Correlated with higher HI IgA antibody response	Protection	Salk et al. [19]
	Human clinical samples	Nasopharyngeal samples Nasal swabs	<i>Veillonella dispar</i>	Predict a severe form of influenza in children Correlated with lower HI IgA antibody response	Protection	Langevin et al. [13] Salk et al. [19]
	Human clinical samples	Nasopharyngeal samples Nasal swabs	<i>Prevotella melaninogenica</i>	Predict a severe form of influenza in children Correlated with Higher HI IgA antibody response	Complication—Protection	Langevin et al. [13] Salk et al. [19]
	Human clinical samples	Nasal swabs	<i>Streptococcus infantis</i>	Correlated with Higher HI IgA antibody response	Complication	Salk et al. [19]

Table 1. Cont.

Virus	Model	Sample Site	Bacteria	Consequents	Outcome	Reference
MPV	Cellular model	Cellular model	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Increased seroconversion rate during challenge	Protection	Verkaik et al. [20]
	Human clinical samples	Nasopharyngeal samples	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus</i> spp.	Increased hospitalization rate	Complication	De Steenhuijsen Peters et al. [21]
RSV	Mice model—Human clinical samples	Nasopharyngeal samples	<i>Moraxella catarrhalis</i>	Increased severity	Complication	Teo et al. [22] Beura et al. [23] Furusawa et al. [24]
	Mice model Human clinical samples	Nasopharyngeal samples Lung homogenates	<i>Staphylococcus aureus</i>	Decreased complications	Protection	De Steenhuijsen Peters et al. [21] Wang et al. [11]
	Cellular model	Cellular model	<i>Escherichia coli</i>	Increased protection against infection	Protection	Cagno et al. [25]
RV	Cellular model	Cellular model	<i>Haemophilus influenzae</i>	Entry point production via ICAM-1 and TLR-3 production	Complication	Sajjan et al. [26]

Bacterial microbiota may also promote viral infection and/or pathogenesis by a direct effect on epithelial cells. For instance, *Haemophilus influenzae* infection can lead to a severe increased expression of ICAM-1 and Toll-like receptors 3 (TLR-3) by the pulmonary epithelial cells. TLR3, as other TLR, is implicated in viral genome detection and immunity and so is responsible for host response to infection via immunological pathways such as the NF- κ B pathway. In addition, overexpression of the main receptor of hRV, ICAM-1, has been associated with enhanced hRV binding and RV-induced chemokine responses, leading to an increased pathogenesis [26].

Finally, bacterial microbiota could also interact directly with viral pathogens. Such an interaction has not been described in the respiratory tract but it is known that some enteric viruses bind bacterial lipopolysaccharides (LPS) to stabilize their entry into the target cells or to induce unresponsiveness to itself [27,28].

2.2. Impact on Innate and Adaptive Immune Responses to Infection

Most symptoms occurring during acute respiratory infection are due to the excessive intensity of the host inflammatory response. Nasal and systemic levels of several pro-inflammatory cytokines have been associated with clinical outcome in influenza for example [29,30]. Increasing evidence suggest that the respiratory microbiome interact with the immune system and therefore modulate clinical outcomes of ARI.

In animal models, Wang et al. reported the impact of the respiratory microbiome on the host resistance to influenza virus [11]. Increased morbidity and lethality was observed in specific-pathogen-free (SPF) mice compared with wild-type mice after infection with IV. Wild-type mice resistance to influenza was shown to be provided by continual TLR-2 stimulation by *Staphylococcus aureus*, stably colonizing the respiratory tract. This in turn would allow lung recruitment of M2 alveolar macrophages inhibiting influenza-mediated lethal inflammation. In addition, using another mouse model, Wu et al. have found that oral administrations of probiotic treatment significantly restored the immune response and enhanced the activation of numerous pathways, mainly TLR-7 and NF- κ B, implicated in single stranded RNA virus recognition [31]. This study demonstrates that modification of the gastrointestinal tract microbiome has an important impact on respiratory tract infections. Even if this modification has not been clearly identified in respiratory infections, these promising data suggested that microbiota modification could lead to development of innovative therapies of respiratory infections. Taken together, data obtained from animal models suggest that influenza pathogenesis on a respiratory tract with modified microbiome is associated with a non-efficient local immune response. Conversely, an unmodified microbiome allows the maintenance of effective innate response needed for the development of an appropriate adaptive response against IV. Microorganism viability does not seem to be necessary as in a mouse model it has been established that LPS administration could be sufficient to restore an adaptive immune response in an altered host [12]. The hypothesis is that the microbiome can trigger many Pattern Recognition Receptors and stimulate leukocytes at the local and systemic level using isolated proteins acting as antigens. In an SPF mouse model, colonization of the upper respiratory tract by commensal bacteria significantly reduced the lung alterations associated with influenza virus infection. This colonization, by decreasing the lethality of influenza infection via modification of the monocyte response phenotype, induces a less destructive macrophage activation phenotype [11].

In another study, Abt et al. have found that wild-type mice pretreated with an antibiotic cocktail, denaturing their "natural" microbiome, exhibited increased morbidity during infection with the A(H1N1)pdm09 virus (greater weight loss and significant desaturation) [32]. The severity of these diseases is associated with two main factors: reduction of the dendritic cell migration rate and reduction in the number of local T-cell lymphocytes. When ineffective, these factors, essential for a functional immune response, contributed to maintain a high viral titer.

In a prospective cohort study of the nasopharyngeal microbiota associated with RSV severity in children less than 2 years of age hospitalized for bronchiolitis, nasopharyngeal bacterial

microbiota dominated by *Haemophilus* and *Streptococcus* have been reported to be associated with an exaggerated systemic response and with increase RSV severity. This exacerbation was associated with overexpression of TLR gene pathways and genes implicated in neutrophil response during RSV infection [21]. In this study, infants with NP microbiota dominated by *Staphylococcus aureus* showed a limited immune response and experienced mild RSV infection. The level of interleukin (especially IL-6, -8 and -17A) was correlated with the bacterial species dominating the NP microbiota. However, this study could only show association and not causation, between NP microbiota and RSV severity. Further studies are needed to decipher whether NP microbiota changes are responsible for increased immune response and RSV severity. Some insights about causation were provided by a large prospective longitudinal study following the NP microbiota of infants at 2, 6 and 12 months and during ARI [22]. The authors were able to show that early NP colonization with *Moraxella* or *Streptococcus* was associated with an earlier first episode of upper or lower respiratory tract infection, respectively.

In addition, there have been numerous studies describing the association between *Moraxella* respiratory tract colonization and increased severity of RSV infection, with RSV being reciprocally able to strongly alter the respiratory microbiome of the host [22–24,33]. During winter, co-infections combining RSV and *Moraxella* are not uncommon because these two pathogens co-circulate during the coldest seasons. Such co-infections are described as being associated with more frequent otitis media and it is suggested that viral infection increases the incidence of bacterial super infection.

For the time being, published studies have only partially explored the complex mechanisms associating the microbiome with the immune response to ARI. Only limited interactions between viral pathogens and commensal bacteria have been described (summarized in Figure 2). According to some authors, these interactions and the description of the respiratory microbiome could be used in clinical practice to optimize management of patients, especially when severe consequences could occur.

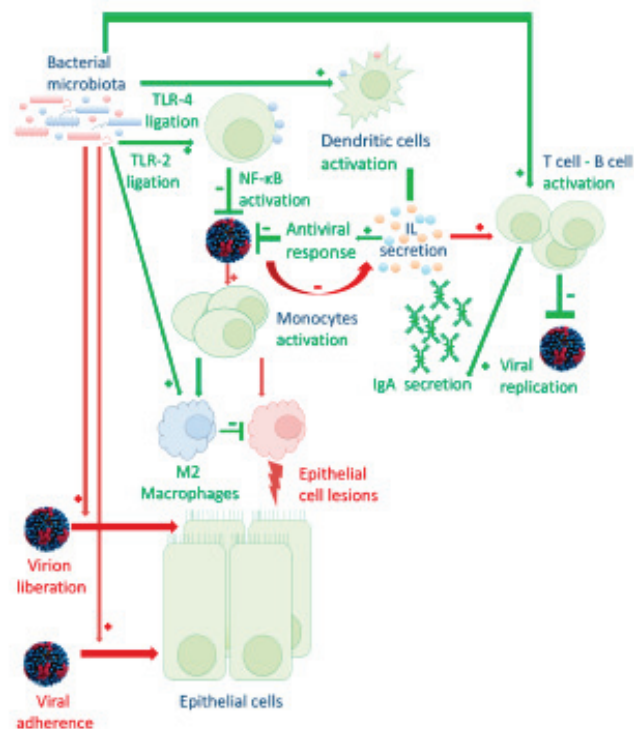


Figure 2. Schematic representations of the host immune system and respiratory microbiome during respiratory viral infections. Red and green arrows and symbol symbolize interactions responsible for severe or mild diseases respectively. Bacterial microbiota could have a direct effect on viral infection (enhancing virion liberation or virion adherence to a new host cell), or an indirect effect on immune response to viral infection (activating Toll-like receptors TLR, leading to cellular activation of dendritic cells B/T lymphocytes and monocytes) via interleukin (IL) secretion. Bacterial microbiota has an impact on both innate (inflammation limited by a less-destructive M2 phenotype of macrophages) or adaptive (immunoglobulin A – IgA – secretion). Viral adherence enhancement by bacterial microbiota has been well-established in gastro-intestinal infections but need to be studied especially in respiratory infections.

3. Clinical Use of the Respiratory Microbiome Impact during Viral Infections

3.1. Respiratory Microbiome Characterization: Usable as a Prognostic Biomarker?

Microbiome-associated biomarkers have been suggested to predict respiratory disease severity even before the description of the microbiome concept. For years, it has been observed in patients with cystic fibrosis that detection and an increase in the proportion of some bacterial species, such as *Pseudomonas aeruginosa* in the respiratory tract marked a negative turning point in the evolution of their disease [34].

Similarly, and even if data are still limited, it has recently been reported in children that nasal carriage of *Streptococcus pneumoniae* was positively associated with seroconversion to hMPV, without any association with lethality or morbidity [20]. In addition, in a large cohort of RSV-infected neonates, Teo et al. found that the microbiome could be used for the early detection of both ARI symptoms and chronic wheezing that are consequences of repetitive or severe bronchiolitis [22]. Interestingly, early NP colonization (before 2 months of age) with *Streptococcus* was associated with increased risk of wheezing at 5 years old. This discovery could lead to the possible use of microbiota characterization as a biomarker of chronic wheezing, many years after the initial infection.

In a recently published study, we characterized the nasopharyngeal bacterial microbiota associated with severe influenza in children. Patients visiting the emergency room for acute influenza (symptom onset ≤ 2 days) were sampled at hospital arrival and we were able to define a microbial signature that distinguished those patients that had developed severe and mild influenza. This signature included *Staphylococcus aureus*, *Prevotella* spp., *Streptobacillus* spp., *Porphyromonas* spp., *Granulicatella* spp., *Veillonella* spp., *Fusobacterium* spp., *Lachnospiracea incertae sedis* and *Haemophilus* spp. [13]. With the exception of *Staphylococcus aureus*, all these bacteria were related to a severe form of the disease. Moreover, in severe forms, *Moraxella catarrhalis* and *Parvimonas micra* seemed more associated with respiratory complications, whereas *Actinomyces* spp., *Corynebacterium* spp., *Dolosigranulum pigrum*, *Chryseobacterium* spp. and *Prevotella* spp. were more associated with the neurological form of the disease. The modification of the satellite microbiome using adapted therapies to restore a less severe microbial signature could lead to a modification of the clinical outcome. Furthermore, such a microbial signature could also be used at the time of influenza diagnosis to improve the identification of patients at risk of severe disease and to allow the development of risk-based strategies for enhanced care management. A French multicenter study launched in 2017 aims to confirm the presence of this microbial signature and its applicability in clinical practice in pediatric cohorts. Doing so, we would prove the benefit of using the microbiome as a prognostic marker of severe forms of viral respiratory diseases.

No causal relation between the nasopharyngeal microbiome and the immune response to viral infections could be deduced from the studies described in this subsection. However, these data suggest that microbiome characterization could be useful for predicting clinical outcomes. We could therefore imagine that therapeutic modification of the microbiome, by treatment administration or vaccination, could be of interest in severe infectious disease management. This approach is very promising, especially in viral infection management, where treatments are very limited [35,36].

3.2. Respiratory Microbiome: A Therapeutic Target?

Several studies suggest that the respiratory microbiome may be a promising target for ARI prophylaxis and treatment. Some authors suggest that bacterial antigens could be used as a therapeutic approach against IV infections [12]. In a mouse model, it has been shown that animals, pretreated with aerosols of bacterial lysates (containing LPS), exhibited faster and more effective inflammatory responses after influenza virus infection. The LPS-induced response reduces tissue damage associated with viral infection and thereby improves the survival of infected animals [37]. However, these data are still debated; while it is well-known that excessive inflammation following influenza virus infection is responsible for the most severe disease (cytokine storm process) immunosuppressive treatments have been found to be ineffective against influenza in clinical trials [38]. Similarly to sepsis, the timing of immunomodulatory intervention is likely to be critical for successful influenza management [39].

Similarly, activation of TLR-2, -6 and -9 by synthetic agonists (nasally administered) reduce *Parainfluenza* virus titers. This activation is not associated with reduction of the symptomatology due to bronchial hyper reactivity [40]. Similarly, the administration of inactivated toxins of *Escherichia coli* has been reported to be effective for protection against RSV and IV and the administration of *Lactobacillus rhamnosus*, prior to an RSV challenge, is reported to limit pulmonary destruction due to the virus [41,42]. These *Lactobacilli* were useful to protect against excessive inflammation during infection by altering both the production of many mediators (interferons and interleukins) and activation of dendritic cells via expression of CD103 and CD11b [43]. Conversely, an indirect antiviral effect of antibiotic administration (erythromycin) during rhinovirus infections could be explained by a disturbance of bacteria-virus interactions. Reduction of the expression of ICAM by the epithelial cells induced by the antibiotic, limit the binding of rhinovirus. Moreover, the decrease of TLR-3 expression, responsible for most of the rhinovirus-induced damages, limit the viral-induced lung destruction [44].

Although these studies have demonstrated very promising results, there is still a long way to go before using respiratory microbiome modification or enrichment to prevent or treat respiratory viral

infections. To develop these therapies, future studies have to be carried out on large cohorts before the routine use of these technologies.

4. Conclusions

The development of Next Generation Sequencing (NGS) technologies has led to a dramatic increase in microbiome understanding in physiological and pathological situations. Unlike the previous approach to infectious diseases, which focused on the pathogen, this approach takes into account all the actors (target cells response, immune system activation, therapeutic molecules administration . . .) and human body organization as a niche. Because most diseases are caused by an imbalance of these actors, it becomes necessary to standardize studies of any ecological niches. Using a global approach, especially in viral diseases studies, provides more valid data, even though no consensual approach is currently accepted in the scientific community as a whole.

From the earliest paradigms of infectious diseases studies, it has been noteworthy that optimization in the clinical management of infected patients will need to best characterize the pathogen involved. The development of high-throughput NGS technologies makes it possible to finely study the pathogen genome, be this in terms of consensus or minority variant sequence analyses. As we have demonstrated in this review, the microbiome, whether respiratory or not, could be strongly implicated in viral pathogenicity and could be finely studied, using these technologies, to understand its implications. Furthermore, due to the implication of host immunity in the protection against but also in the development of infectious viral disease, the study of the cellular response to the transcriptomic infection is not to be neglected. This integrative approach is essential for the overall understanding of viral infections, particularly in respiratory diseases and is described in Figure 3. Only after consolidation of the mechanistic understanding, using animal experimentation, will it be possible to consider microbiome applications to clinical pathologies management. The understanding of the microbiome will open a new field of clinical management and therapeutic approaches, with the development of new diagnosis tests or therapeutic molecules.

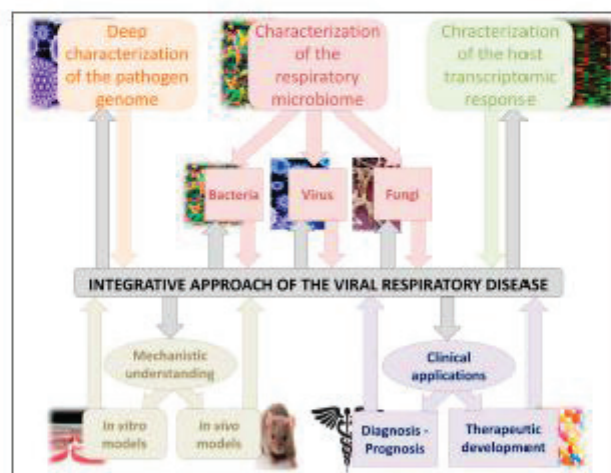


Figure 3. Integrative scheme of studies focusing on respiratory virus infections. All three actors of the viral disease need to first be completely characterized (microbiome characterization for the environment, viral genome to study the pathogen itself and transcriptomic analyses for the host response). These interactions between host, its microbiome and the pathogen are very important in viral infections pathogenesis. After a complete characterization of these parameters, mechanistic understanding, using animal models, is needed before using these data in clinical diagnosis optimization or for the development of new therapies.

Acknowledgments: The authors thank Philip Robinson (DRCI—Hospices Civils de Lyon) for valuable feedback on the manuscript. This project was funded in part by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Research Grant 20170223 (L.J.).

Author Contributions: M.P. wrote and reviewed the paper and made tables and figures. B.L. and L.J. reviewed the paper. M.P. and L.J. submitted the paper.

Conflicts of Interest: M.P., B.L. and L.J. declare no conflict of interest.

References

1. WHO Report Prepared for the WHO Annual Consultation on the Composition of Influenza Vaccine for the Northern Hemisphere 2017/18 2 March 2017. Available online: http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2017_18_north/en/ (accessed on 1 November 2017).
2. Harris, J.-A.S. Infection Control in Pediatric Extended Care Facilities. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2006**, *27*, 598–603. [CrossRef] [PubMed]
3. Nair, H.; Nokes, D.J.; Gessner, B.D.; Dherani, M.; Madhi, S.A.; Singleton, R.J.; O'Brien, K.L.; Roca, A.; Wright, P.F.; Bruce, N.; et al. Global Burden of Acute Lower Respiratory Infections due to Respiratory Syncytial Virus in Young Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Lancet* **2010**, *375*, 1545–1555. [CrossRef]
4. Lederberg, J. 'Ome Sweet' Omics—A Genealogical Treasury of Words. *Scientist* **2001**, *15*, 8.
5. Moustafa, A.; Xie, C.; Kirkness, E.; Biggs, W.; Wong, E.; Turpaz, Y.; Bloom, K.; Delwart, E.; Nelson, K.E.; Venter, J.C.; et al. The Blood DNA Virome in 8,000 Humans. *PLoS Pathog.* **2017**, *13*, e1006292. [CrossRef] [PubMed]
6. Sender, R.; Fuchs, S.; Milo, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* **2016**, *14*, e1002533. [CrossRef] [PubMed]
7. Luoto, R.; Ruuskanen, O.; Waris, M.; Kalliomäki, M.; Salminen, S.; Isolauri, E. Prebiotic and Probiotic Supplementation Prevents rhinovirus Infections in Preterm infants: A Randomized, Placebo-Controlled Trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2014**, *133*, 405–413. [CrossRef] [PubMed]
8. Tapiavaara, L.; Kumpu, M.; Mäkiyuokko, H.; Waris, M.; Korpela, R.; Pitkäranta, A.; Winther, B. Human Rhinovirus in Experimental Infection after Peroral Lactobacillus Rhamnosus GG Consumption, a Pilot Study. *Int. Forum Allergy Rhinol.* **2016**, *6*, 848–853. [CrossRef] [PubMed]
9. Chertow, D.S.; Memoli, M.J. Bacterial Coinfection in Influenza: A Grand Rounds Review. *JAMA* **2013**, *309*, 275–282. [CrossRef] [PubMed]
10. McCullers, J.A.; Bartmess, K.C. Role of Neuraminidase in Lethal Synergism between Influenza Virus and *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* **2003**, *187*, 1000–1009. [CrossRef] [PubMed]
11. Wang, J.; Li, E.; Sun, R.; Gao, X.; Wei, H.; Li, L.-J.; Tian, Z. Bacterial Colonization Dampens Influenza-Mediated Acute Lung Injury via Induction of M2 Alveolar Macrophages. *Nat. Commun.* **2013**, *4*. [CrossRef] [PubMed]
12. Ichinohe, T.; Pang, I.K.; Kumamoto, Y.; Peaper, D.R.; Ho, J.H.; Murray, T.S.; Iwasaki, A. Microbiota Regulates Immune Defense against Respiratory Tract Influenza A Virus Infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 5354–5359. [CrossRef] [PubMed]
13. Langevin, S.; Pichon, M.; Smith, E.; Morrison, J.; Bent, Z.; Green, R.; Baker, K.; Solberg, O.; Gillet, Y.; Javouhey, E.; et al. Early Nasopharyngeal Microbial Signature Associated with Severe Influenza in Children: A Retrospective Pilot Study. *J. Gen. Virol.* **2017**. [CrossRef] [PubMed]
14. De Paepe, M.; Leclerc, M.; Tinsley, C.R.; Petit, M.-A. Bacteriophages: An Underestimated Role in Human and Animal Health? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2014**, *4*, 39. [CrossRef] [PubMed]
15. Barr, J.J.; Auro, R.; Furlan, M.; Whiteson, K.L.; Erb, M.L.; Pogliano, J.; Stotland, A.; Wolkowicz, R.; Cutting, A.S.; Doran, K.S.; et al. Bacteriophage Adhering to Mucus Provide a Non-Host-Derived Immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 10771–10776. [CrossRef] [PubMed]
16. Yun, Y.; Srinivas, G.; Kuenzel, S.; Linnenbrink, M.; Alnahas, S.; Bruce, K.D.; Steinhoff, U.; Baines, J.F.; Schaible, U.E. Environmentally Determined Differences in the Murine Lung Microbiota and Their Relation to Alveolar Architecture. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e113466. [CrossRef] [PubMed]
17. Marsland, B.J.; Gollwitzer, E.S. Host-Microorganism Interactions in Lung Diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **2014**, *14*, 827–835. [CrossRef] [PubMed]

18. Leung, R.K.-K.; Zhou, J.-W.; Guan, W.; Li, S.-K.; Yang, Z.-E.; Tsui, S.K.-W. Modulation of Potential Respiratory Pathogens by pH1N1 Viral Infection. *Clin. Microbiol. Infect.* **2013**, *19*, 930–935. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Salk, H.M.; Simon, W.L.; Lambert, N.D.; Kennedy, R.B.; Grill, D.E.; Kabat, B.F.; Poland, G.A. Taxa of the Nasal Microbiome are Associated with Influenza-Specific IgA Response to Live Attenuated Influenza Vaccine. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0162803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Verkaik, N.J.; Nguyen, D.T.; de Vogel, C.P.; Moll, H.A.; Verbrugh, H.A.; Jaddoe, V.W.V.; Hofman, A.; van Wamel, W.J.B.; van den Hoogen, B.G.; Buijs-Offerman, R.M.G.B.; et al. Streptococcus Pneumoniae Exposure is Associated with Human Metapneumovirus Seroconversion and Increased Susceptibility to in Vitro HMPV Infection. *Clin. Microbiol. Infect.* **2011**, *17*, 1840–1844. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. De Steenhuijsen Piters, W.A.A.; Heinonen, S.; Hasrat, R.; Bunsow, E.; Smith, B.; Suarez-Arrabal, M.-C.; Chaussabel, D.; Cohen, D.M.; Sanders, E.A.M.; Ramilo, O.; et al. Nasopharyngeal Microbiota, Host Transcriptome and Disease Severity in Children with Respiratory Syncytial Virus Infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2016**, *194*, 1104–1115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Teo, S.M.; Mok, D.; Pham, K.; Kusel, M.; Serralha, M.; Troy, N.; Holt, B.J.; Hales, B.J.; Walker, M.L.; Hollams, E.; et al. The Infant Nasopharyngeal Microbiome Impacts Severity of Lower Respiratory Infection and Risk of Asthma Development. *Cell Host Microbe* **2015**, *17*, 704–715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Beura, L.K.; Hamilton, S.E.; Bi, K.; Schenkel, J.M.; Odumade, O.A.; Casey, K.A.; Thompson, E.A.; Fraser, K.A.; Rosato, P.C.; Filali-Mouhim, A.; et al. Normalizing the Environment Recapitulates Adult Human Immune Traits in Laboratory Mice. *Nature* **2016**, *532*, 512–516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Furusawa, Y.; Obata, Y.; Fukuda, S.; Endo, T.A.; Nakato, G.; Takahashi, D.; Nakanishi, Y.; Uetake, C.; Kato, K.; Kato, T.; et al. Commensal Microbe-Derived Butyrate Induces the Differentiation of Colonic Regulatory T cells. *Nature* **2013**, *504*, 446–450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Cagno, V.; Donalizio, M.; Civra, A.; Volante, M.; Veccelli, E.; Oreste, P.; Rusnati, M.; Lembo, D. Highly Sulfated K5 Escherichia Coli Polysaccharide Derivatives Inhibit Respiratory Syncytial Virus Infectivity in Cell Lines and Human Tracheal-Bronchial Histocultures. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 4782–4794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Sajjan, U.S.; Jia, Y.; Newcomb, D.C.; Bentley, J.K.; Lukacs, N.W.; LiPuma, J.; Hershenson, M.B.H. Influenzae Potentiates Airway Epithelial Cell Responses to Rhinovirus by Increasing ICAM-1 and TLR3 Expression. *FASEB J.* **2006**, *20*, 2121–2123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Pfeiffer, J.K.; Virgin, H.W. Viral Immunity. Transkingdom Control of Viral Infection and Immunity in the Mammalian Intestine. *Science* **2016**, *351*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Kuss, S.K.; Best, G.T.; Etheredge, C.A.; Puijssers, A.J.; Frierson, J.M.; Hooper, L.V.; Dermody, T.S.; Pfeiffer, J.K. Intestinal Microbiota Promote Enteric Virus Replication and Systemic Pathogenesis. *Science* **2011**, *334*, 249–252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Rondina, M.T.; Tatsumi, K.; Bastarache, J.A.; Mackman, N. Microvesicle Tissue Factor Activity and Interleukin-8 Levels are Associated with Mortality in Patients with Influenza A/H1N1 Infection. *Crit. Care Med.* **2016**, *44*, 574–578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Oshansky, C.M.; Gartland, A.J.; Wong, S.-S.; Jeevan, T.; Wang, D.; Roddam, P.L.; Caniza, M.A.; Hertz, T.; DeVincenzo, J.P.; Webby, R.J.; et al. Mucosal Immune Responses Predict Clinical Outcomes during Influenza Infection Independently of Age and Viral Load. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2014**, *189*, 449–462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Wu, S.; Jiang, Z.-Y.; Sun, Y.-F.; Yu, B.; Chen, J.; Dai, C.-Q.; Wu, X.-L.; Tang, X.-L.; Chen, X.-Y. Microbiota Regulates the TLR7 Signaling Pathway Against Respiratory Tract Influenza A Virus Infection. *Curr. Microbiol.* **2013**, *67*, 414–422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Abt, M.C.; Osborne, L.C.; Monticelli, L.A.; Doering, T.A.; Alenghat, T.; Sonnenberg, G.F.; Paley, M.A.; Antenus, M.; Williams, K.L.; Erikson, J.; et al. Commensal Bacteria Calibrate the Activation Threshold of Innate Antiviral Immunity. *Immunity* **2012**, *37*, 158–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Arpaia, N.; Campbell, C.; Fan, X.; Dikiy, S.; van der Veecken, J.; deRoos, P.; Liu, H.; Cross, J.R.; Pfeiffer, K.; Coffey, P.J.; et al. Metabolites Produced by Commensal Bacteria Promote Peripheral Regulatory T-cell Generation. *Nature* **2013**, *504*, 451–455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Mayer-Hamblett, N.; Rosenfeld, M.; Gibson, R.L.; Ramsey, B.W.; Kulasekara, H.D.; Retsch-Bogart, G.Z.; Morgan, W.; Wolter, D.J.; Pope, C.E.; Houston, L.S.; et al. *Pseudomonas Aeruginosa* in Vitro Phenotypes Distinguish Cystic Fibrosis Infection Stages and Outcomes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2014**, *190*, 289–297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Biesbroek, G.; Wang, X.; Keijser, B.J.E.; Eijkemans, R.M.; Trzciński, K.; Rots, N.Y.; Veenhoven, R.H.; Sanders, E.A.M.; Bogaert, D. Seven-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine and Nasopharyngeal Microbiota in Healthy Children. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 201–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Tarabichi, Y.; Li, K.; Hu, S.; Nguyen, C.; Wang, X.; Elashoff, D.; Saira, K.; Frank, B.; Bihan, M.; Ghedin, E.; et al. The Administration of Intranasal Live Attenuated Influenza Vaccine Induces Changes in the Nasal Microbiota and Nasal Epithelium Gene Expression Profiles. *Microbiome* **2015**, *3*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Tuvim, M.J.; Evans, S.E.; Clement, C.G.; Dickey, B.E.; Gilbert, B. Augmented Lung Inflammation Protects Against Influenza A Pneumonia. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e4176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Liu, Q.; Zhou, Y.-H.; Yang, Z.-Q. The Cytokine Storm of Severe Influenza and Development of Immunomodulatory Therapy. *Cell. Mol. Immunol.* **2016**, *13*, 3–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Monneret, G.; Venet, F. Sepsis-Induced Immune Alterations Monitoring by Flow Cytometry as a Promising Tool for Individualized Therapy. *Cytom. B Clin. Cytom.* **2016**, *90*, 376–386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Drake, M.G.; Evans, S.E.; Dickey, B.F.; Fryer, A.D.; Jacoby, D.B. Toll-like Receptor-2/6 and Toll-like Receptor-9 Agonists Suppress Viral Replication but not Airway Hyperreactivity in Guinea Pigs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2013**, *48*, 790–796. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Williams, A.E.; Edwards, L.; Humphreys, I.R.; Snelgrove, R.; Rae, A.; Rappuoli, R.; Hussell, T. Innate Imprinting by the Modified Heat-Labile Toxin of *Escherichia Coli* (LTK63) Provides Generic Protection against Lung Infectious Disease. *J. Immunol.* **2004**, *173*, 7435–7443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Norton, E.B.; Clements, J.D.; Voss, T.G.; Cárdenas-Freytag, L. Prophylactic Administration of Bacterially Derived Immunomodulators Improves the Outcome of Influenza Virus Infection in a Murine Model. *J. Virol.* **2010**, *84*, 2983–2995. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Chiba, E.; Tomosada, Y.; Vizoso-Pinto, M.G.; Salva, S.; Takahashi, T.; Tsukida, K.; Kitazawa, H.; Alvarez, S.; Villena, J. Immunobiotic *Lactobacillus Rhamnosus* Improves Resistance of Infant Mice against Respiratory Syncytial Virus Infection. *Int. Immunopharmacol.* **2013**, *17*, 373–382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Suzuki, T.; Yamaya, M.; Sekizawa, K.; Hosoda, M.; Yamada, N.; Ishizuka, S.; Yoshino, A.; Yasuda, H.; Takahashi, H.; Nishimura, H.; et al. Erythromycin Inhibits Rhinovirus Infection in Cultured Human Tracheal Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2002**, *165*, 1113–1118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Annexe D. PICHON M., Pellisier R., Valette M., Lina B., Josset L. [Biodiversité génomique virale : évaluation et conséquences sur la virulence des infections respiratoires.] *Virologie*. 2018, 22 (3): 173-8.

Diversité génomique virale : évaluation et conséquences sur la virulence des infections respiratoires

Maxime Pichon
Rodolphe Pelissier
Martine Valette
Bruno Lina
Laurence Josset

Centre hospitalier universitaire de Lyon,
Laboratoire de virologie, Institut
des agents infectieux (IAI) de Lyon,
Centre national de référence des virus
respiratoires France Sud, Centre
de biologie et de pathologie Nord,
Groupe hospitalier Nord
F-69317, Lyon cedex 04, France
Université Claude Bernard Lyon 1,
Faculté de médecine Lyon Est,
CIRI, ENS, Inserm U1111
CNRS UMR5308, équipe Virpath,
F-69372, Lyon cedex 08, France
<maxime.pichon01@chu-lyon.fr>

Résumé. Au cours de l'infection virale, la réplication d'un virus à ARN génère une population diversifiée par accumulation de mutations ponctuelles dans son génome. L'étude de cette diversité génétique virale au moyen des technologies de séquençage à haut débit (séquençage de nouvelle génération [NGS]) a permis une meilleure compréhension de la pathogenèse de l'infection ainsi que des mécanismes d'action des thérapeutiques antivirales. Cette révolution technologique s'est accompagnée d'un nombre impressionnant de nouvelles études centrées sur la diversité génétique d'une souche virale et ses conséquences sur l'histoire naturelle de l'infection. Dans cette revue, nous aborderons les grands principes de l'évaluation de la diversité génétique virale, avant d'en résumer les principales conséquences physiopathologiques des infections à virus respiratoires. À ce jour, bien qu'aucune étude n'établisse clairement son rôle dans la pathogenèse des formes sévères des infections respiratoires, la diversification virale pourrait avoir un double effet. Elle pourrait être un formidable outil de virulence par production d'un avantage évolutif majeur grâce à la diversification des populations virales, c'est-à-dire les quasi-espèces, présentes chez un hôte ou délétère pour le virus en cas de dépassement d'un seuil d'erreur tolérable de variabilité au niveau de leur séquence, aboutissant à terme à son extinction. Il est donc important de l'étudier dans le cadre d'infections à virus respiratoires, comme les virus influenza, les virus respiratoires syncytiaux (VRS) ou les rhinovirus. La compréhension fine de cette propriété permettra d'en envisager de multiples applications cliniques, que ce soit organisationnelles (orientation précoce des patients vers une unité de soins intensifs), thérapeutiques (par le recours à des molécules mutagènes) ou préventives (stabilisation des souches vaccinales pour une plus grande innocuité).

Mots clés : diversité virale, virulence, infection respiratoire, sévérité clinique

Abstract. During host infection, viral replication generates multiple subpopulations. Studies of viral diversity using high-throughput sequencing technologies provide a better understanding of the therapeutic effects as well as of the viral pathogenesis. This technical evolution led to an impressive number of studies analyzing this viral characteristic. In this review, we will discuss the principles of the evaluation of viral diversity, before summarizing the main physiological consequences for respiratory viruses. To date, although no study clearly established its role in pathogenesis of severe forms, viral diversification can be alternately a formidable virulence advantage or deleterious to the virus, resulting in its extinction (error-threshold). Because of these differences, it is important to study it in the context of respiratory virus infection, such as Influenza, respiratory syncytial virus (RVS) or rhinovirus. The precise understanding of this property allows us to consider multiple clinical applications, *i.e.* therapeutic or preventive.

Key words: viral diversity, virulence, respiratory infection, clinical outcome

Tirés à part : M. Pichon

Virologie, Vol 22, n° 3, mai-juin 2018

Pour citer cet article : Pichon M, Pelissier R, Valette M, Lina B, Josset L. Diversité génomique virale : évaluation et conséquences sur la virulence des infections respiratoires. Virologie 2018, 22(3): 173-82 doi:10.1684/vic.2018.0738

revue

Introduction

Au cours d'une infection respiratoire impliquant un virus à ARN, la réplication virale génère une population génétiquement diversifiée au sein du tractus respiratoire de l'hôte. Cette diversification est fonction de paramètres liés au virus (nombre de génomes en présence, efficacité et fidélité de la polymérase, modalité de transmission interhôte) mais aussi de l'intégrité de l'hôte infecté (efficacité des barrières physiques ou de la pression de sélection immunitaire).

Chez un hôte, les virus sont présents sous forme de nombreuses populations distinctes, bien que proches, aussi bien en termes de séquences génétiques que de propriétés antigéniques [1-4]. Les variations nucléotidiques s'expliquent par un défaut de fidélité des enzymes répliquatives (polymérases) des virus à ARN (10^{-5} à 10^{-6} substitutions par nucléotide par cycle répliquatif) comme des virus à ADN (10^{-7} à 10^{-8} substitutions par nucléotide par cycle répliquatif) [5]. En comparaison, le taux d'erreur d'une polymérase cellulaire est proche de 10^{-8} substitutions par nucléotide par cycle répliquatif, taux limité par le système d'autocorrection de ces enzymes excisant 90 à 99,9 % des anomalies générées par leur activité exonucléase [6]. Le concept de « quasi-espèces », initialement proposé sur des bases purement théoriques par Eigen en 1971, décrit un groupe d'individus différents mais reliés génétiquement au cours de l'apparition de la vie sur terre. Ce concept sous-tend que

les erreurs des polymérases virales, induisant la création de nouveaux mutants isolés ou présents au sein de véritables populations, sont un moteur de l'adaptation des virus à de nouvelles conditions environnementales [7]. Aboutissant parfois à de nombreuses quasi-espèces, ces variants peuvent présenter différents phénotypes pouvant se transmettre d'hôte en hôte au cours de l'étape d'invasion ou être issus de la dissémination de l'infection au sein de différents tissus chez un hôte donné [5, 8-14] (figure 1). La variabilité et la plasticité des génomes sont donc des propriétés évolutives inhérentes aux virus (principalement ceux à ARN). La séquence consensus, à distinguer de la séquence majoritaire, retrouvée par les technologies de séquençage classiques ne peut expliquer, à elle seule, toutes les caractéristiques de cette plasticité. En effet, la séquence consensus, reconstruction parfois artificielle, constituée des bases les plus fréquentes à chaque position nucléotidique, ne préjuge nullement de sa représentativité biologique. Elle est à distinguer de la séquence majoritaire, représentant, comme son nom l'indique, la majorité des séquences retrouvées. Une approche permettant de reconstituer les haplotypes viraux pourrait mettre en évidence les génomes constitués de la même séquence nucléotidique, bien que minoritaires (figure 2).

La diversification génomique, ainsi que les quasi-espèces virales qui en résultent, est une notion théorique étudiée depuis près de 40 ans. La démocratisation des technologies

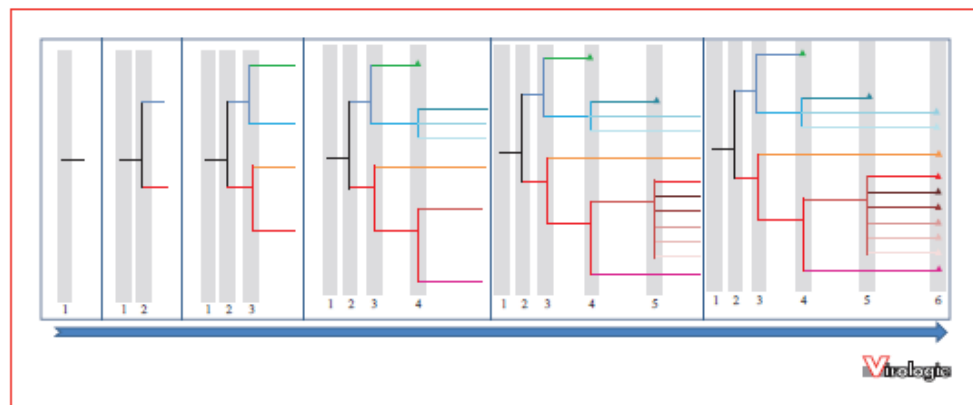


Figure 1. Représentation de la diversification génomique virale au cours des cycles répliquatifs successifs. Les erreurs produites à chaque cycle répliquatif (chaque bande grisée représentant un cycle répliquatif) entraînent la divergence des propriétés antigéniques et nucléotidiques des virus (indiquées par des couleurs différentes selon leur divergence), générés et observés après séquençage créant un « spectre de mutants » appelé également « quasi-espèce ». Les triangles représentent la disparition (possible extinction spontanée) du mutant considéré au cours de la réplication virale. Ainsi, l'ensemble de la population virale générée n'est pas forcément observé, en fonction du délai entre la génération du mutant et le séquençage (l'échelle de temps étant représentée par la flèche bleue). Par exemple, un séquençage ayant lieu après le cycle 6 ne verra pas les deux premiers virus (triangles vert et bleu), étant conduits à l'extinction par génération d'une erreur létale.

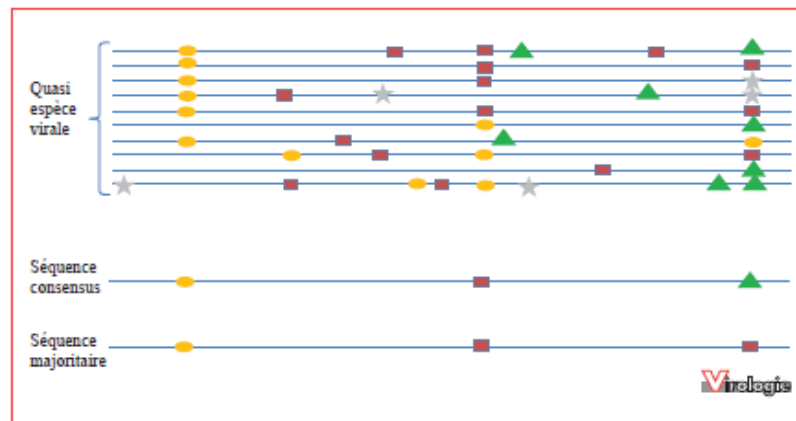


Figure 2. Distinction entre quasi-espèce virale, séquence consensus et séquence majoritaire. Les lignes horizontales ($n = 10$) représentent les génomes des virus présents dans un même échantillon constituant une quasi-espèce. Les ronds, rectangles, triangles ou étoiles représentent des mutations ponctuelles, présentes sur le génome viral du virus séquencé. On constate que la séquence consensus, portant trois mutations (présentes individuellement dans plus de 50 % des virus séquencés) est une reconstruction artificielle n'existant pas parmi la population virale séquencée. La séquence majoritaire correspond à la séquence la plus fréquemment détectée parmi les virus séquencés ($n = 3$, < 50 % des virus séquencés). Les séquences consensus, étudiées par les technologies de séquençage classiques, ne permettent donc pas de visualiser l'intégralité des informations portées par les variants minoritaires (bien que leur détection ait été considérablement améliorée depuis l'émergence des NGS comparativement au séquençage de Sanger).

de séquençage à haut débit permet de générer, à moindre coût, des quantités considérables de données portant sur les génomes viraux. Ces données permettent de faire basculer les études théoriques vers de l'analyse expérimentale, ouvrant de vastes possibilités d'investigation aussi bien au niveau de nouvelles thérapeutiques anti-infectieuses que de méthodes de vaccinations innovantes. Se concentrant initialement dans le domaine des virus des hépatites et du VIH, les données produites par des technologies de séquençage du génome complet à haut débit ont permis les études sur la quasi-espèce virale et la diversité virale, tant de virus à ARN qu'à ADN. Le nombre de publications portant sur la diversité virale (mot-clé : « *viral diversity* ») est passé de 321 publications en 2003, avant l'émergence du NGS, à plus de 1000 en 2015 (figure 3). Le nombre de publications portant sur la diversité virale inter- et intrahôte augmente ainsi de façon quasi exponentielle, leur nombre accompagnant le perfectionnement des technologies de séquençage et d'analyse des séquences obtenues.

L'étude de la diversification génomique reste néanmoins un champ d'étude complexe. Les infections respiratoires – virus grippal, virus respiratoire syncytial (VRS) ou rhinovirus (HRV) – étant principalement aiguës, l'importance de la diversification au cours de l'évolution clinique reste imparfaitement comprise. *A contrario* d'une infection chronique, aucun prélèvement n'est généralement réalisé pour contrôler une infection ou suivre la décroissance de celle-ci. Peu d'études ont donc exploré la diversification génomique

virale au cours de l'infection respiratoire, hormis dans des situations particulières comme chez les patients immunodéprimés à l'origine d'excrétions prolongées [15].

Dans cette revue, nous allons décrire, après en avoir vu les principaux modes d'estimation et méthodes d'analyse informatique, les conséquences cliniques de cette diversification virale dans le cadre de la virulence des infections virales respiratoires chez l'homme.

Mesure de la diversité génomique

De nombreux paramètres ayant un impact sur la diversité génomique virale (ainsi que sur le *fitness* viral correspondant), il est nécessaire de définir l'unité de mesure permettant de la quantifier (tableau 1).

L'analyse de la diversité génomique virale est fortement impactée par chacune des étapes permettant la génération des données de séquençage (wet-lab), depuis la RT-PCR (taux d'erreur : $1,8 \times 10^{-4}$ /cycle de PCR), la constitution de la librairie (fragmentation-réparation et indexation) et le séquençage en lui-même ; le taux d'erreur global étant important avant l'analyse, la correction informatique (par élimination des données de qualité insuffisante) le ramène à 0,11 % pour la plateforme HiSeq (Illumina, CA, États-Unis), 0,5 % pour le Ion PGM (LifeTechnologies, CA, États-Unis) ou 15 % pour le PacBio (Pacific Biosciences,

revue

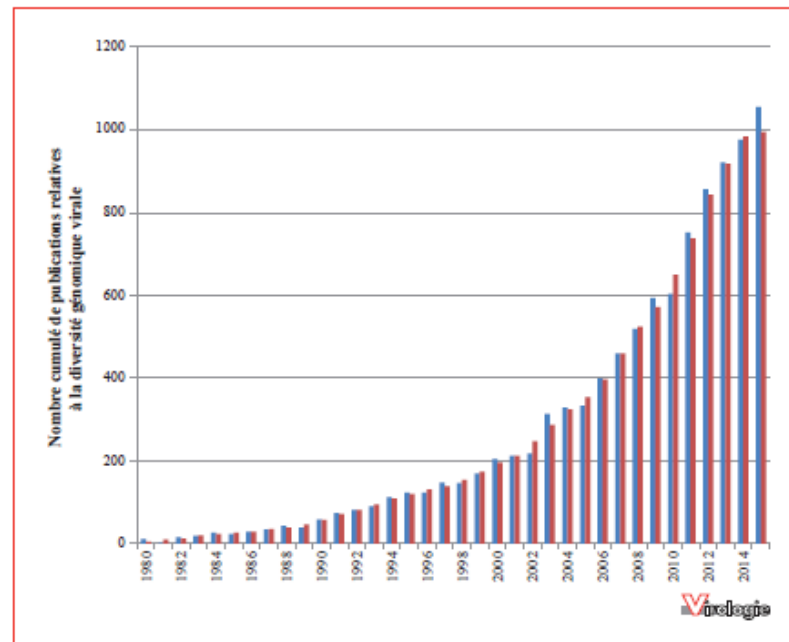


Figure 3. Données bibliométriques relevant les publications portant sur la diversité virale de 1980 à 2015. L'échelle verticale représente le total cumulé d'études, répondant à la recherche sur le moteur de recherche PubMed, portant sur la diversité génomique virale et l'échelle horizontale l'année de publication. Les données en bleu représentent le nombre de publications de l'année n et les données en rouges correspondent à la moyenne du nombre de publications incluant l'année $n-1$ et $n+1$. Le nombre de publications présente une augmentation notable au cours des années 2003 à 2014, correspondant à l'émergence de nouvelles technologies de séquençage.

CA, États-Unis) [16, 17]. Il est donc fondamental de valider le processus analytique par l'utilisation d'un contrôle de qualité adapté à la proportion de diversité artificielle connue. L'utilisation de plasmides, comme ceux utilisés dans les expérimentations de génomique inverse, ou de virus, dits « de plage de lyse », permet de produire des contrôles de qualité satisfaisants [18]. Ceux-ci permettront de valider la fiabilité des étapes de constitution des bibliothèques et des processus analytiques. Les plasmides sont utilisés comme contrôles pour estimer les erreurs de séquençage car ils sont, en principe, strictement identiques avant leur introduction dans le processus analytique. La mise en évidence de variants dans les séquences produites correspondant à ces plasmides permettra donc de mettre en évidence les erreurs de séquençage « artificielles », et ainsi d'estimer la potentielle surestimation de la diversité génomique des virus séquencés au cours de la même expérimentation. Cette manipulation devra néanmoins s'accompagner d'importantes précautions, l'utilisation de plasmides étant parfois source de contamination des zones de laboratoire. Il est important de valider le processus d'interprétation de

données générées de cette manière afin de ne pas introduire de biais de sous- ou de sur-représentation de la diversité génomique [19]. Une surestimation du bruit de fond, à limiter par l'utilisation de standard (échantillon biologique quantifié) ou par l'utilisation de suite logiciel adapté (test des paramètres de filtration au préalable), risque en effet de conduire à une sous-estimation de la diversité des échantillons testés. Réciproquement, l'utilisation de données aux paramètres de qualité non respectés, ainsi que l'utilisation d'un filtre informatique trop peu sévère, peut conduire à une surestimation de la diversité des échantillons testés.

Bien qu'il soit souvent impossible d'identifier toutes les erreurs produites par des étapes précédant le séquençage, que seul un protocole optimisé de réalisation des banques permet de limiter, l'utilisation de logiciels adaptés pour la détection des variants de faible fréquence est nécessaire afin de mesurer finement l'impact des erreurs produites par le séquençage [19]. L'utilisation de ces logiciels permet de s'affranchir des biais *inter-run* plateforme-dépendant en générant des données de qualité satisfaisante même sur les génomes imparfaitement séquencés ou présentant une

Tableau 1 Principaux estimateurs mathématiques utilisés dans l'étude de la diversité génomique.

Nom	Abr.	Formule	Groupe	Avantages	Inconvénients
Fréquences minimales maximales	n	$n = \sum_{k=1}^{S_{obs}} fk$	Abondance fonctionnelle	Simplicité d'utilisation	Population de taille finie
Diversité nucléotidique	π	$\pi = Nu/L$	Abondance fonctionnelle	Simplicité d'utilisation	Population de taille finie
Indice de Simpson (1949)	λ	$\lambda = \sum_{i=1}^S p_i^2$	Abondance relative (indice α)	Donne des valeurs plus intuitives	Donne plus de poids aux espèces abondantes
Indice de Shannon (1949)	H	$H(p) = -\sum_{i=1}^K p_i \log(p_i)$	Abondance relative (indice α)	Insensible à la richesse spécifique	Saturabilité
Indice de Hill (1973)	N_h	$N_h(\alpha) = \left(\sum_{i=1}^S p_i\right)^{1/(1-\alpha)}$	Abondance relative (indice α)	Synthèse des indices de Shannon et de Simpson	Interprétation difficile en l'absence de l'évaluation de l'indice de Shannon ou de Simpson
Indice de Chao 2 (1987)	S	$S = D + \frac{(N-1)(f^2_1)}{2N(f_2)}$	Abondance relative (indice α)	Calcule le nombre d'espèces non observées à partir de celles observées	Suppose que N est grand et probabilité d'observation de chaque espèce est petite. Ne donne qu'un nombre minimum d'espèces

Abr : abréviation ; p : la fréquence relative des espèces ; N_u : nombre moyen de différences nucléotidiques entre paires de séquences ; L : nombre total de sites ; N : nombre d'individus ; D : espèces différentes parmi les S existantes. L'année de publication de l'indice est indiquée entre parenthèses.

importante variabilité comme ceux des virus influenza. La quantification des variants de faible fréquence, constituant la majorité de la diversité génomique virale, est donc une variable pouvant engendrer d'importants biais d'analyse, via une élévation artificielle de la diversité virale [20]. L'analyse des variants de faible fréquence, reflet de la diversité génétique virale, doit donc prendre en compte les biais induits par les analyses informatiques afin de conclure de manière prudente et raisonnée sur leur impact biologique. Une étude récente de Debbink *et al.*, parue en 2017, insiste, par ailleurs, sur l'intérêt d'une standardisation de la charge virale préalablement à la constitution de la librairie. D'importantes variations de charge virale dans l'échantillon influencent la spécificité et la sensibilité de la détection des polymorphismes génomiques et, donc, la quantité de diversité génomique mise en évidence [21]. Enfin, il est important d'insister sur la nécessité d'analyser, autant que possible, les haplotypes viraux, à savoir le

génomme viral dans son intégralité. La reconstitution d'un génomme de plusieurs kilobases, morcelé en inserts de tailles variables (en fonction de la technologie employée), est nécessaire dans le cadre de séquençages réalisés avec les technologies en émulsion (Life Technologies, CA, États-Unis) ou sur phase solide (Illumina, San Diego, États-Unis) [22]. Ces technologies, dites de deuxième génération, permettent le séquençage en grande quantité de courtes séquences, de 75 à 300 bases obtenues après fragmentation (enzymatique ou mécanique). Un assemblage *in silico* des génomes présents dans l'échantillon séquençé est donc nécessaire pour permettre de relier entre elles les mutations observées et d'en connaître précisément les proportions (figure 2). Des solutions informatiques peuvent être appliquées pour les reconstituer. Les logiciels utilisés à cette fin restent néanmoins imparfaits, basés sur des reconstructions probabilistes. Ces algorithmes de travail sont donc parfois à l'origine de diversification artificiellement augmentée ou

revue

diminuée, permettant d'estimer (sans les définir précisément) le nombre d'haplotypes. Pour limiter ces problèmes, l'utilisation d'une technologie de troisième génération comme le PacBio (Pacific Biosciences, CA, États-Unis) ou le MinIon (Nanopore Technologies, Oxford, Royaume-Uni) pourrait être envisagée. Elle permet de séquencer les acides nucléiques en un seul « read », sans avoir besoin préalablement de fragmenter les génomes viraux. Il serait donc possible de connaître la constitution complète des génomes analysés afin de déterminer la proportion réelle de chaque séquence (figure 2). La diversité réelle en serait donc plus finement quantifiée. La limite importante induite par ces technologies, les rendant inutilisables en pratique pour la détermination des quasi-espèces au niveau haplotypique, reste leur taux considérable d'erreur (15 à 20 % d'erreur pour le PacBio avant traitement informatique). Cela doit donc être encore amélioré pour en permettre l'utilisation dans cette problématique [23].

Conséquences phénotypiques de la diversification génomique virale sur la virulence des infections virales

La diversification génomique virale comme facteur de virulence

Deux études reliant diversification génomique virale et virulence ont été réalisées sur les poliovirus [24, 25]. Après avoir mis en évidence une mutation (G64S) conférant une haute fidélité à la polymérase virale sans en altérer l'efficacité répliquative, Vignuzzi *et al.* ont constaté que la réplication virale des virus mutés générait une population à faible diversité génétique et virulence. *In vivo*, une telle population clonale portant cette mutation G64S ne pouvait être létale qu'administrée à très haute concentration et directement dans le système nerveux central (SNC). En effet, les virus mutés G64S ne pouvaient pas passer la barrière hématoencéphalique, le SNC étant le site majeur de réplication de ce virus. Afin de s'assurer que l'absence de virulence constatée n'était pas due à la seule présence de cette mutation, le virus G64S a été artificiellement diversifié, par adjonction de ribavirine et de 5-fluoro-uracile au milieu de culture diminuant ainsi temporairement la fidélité de la polymérase virale [26]. La nouvelle population virale générée présentait une diversité génomique importante et la même dose létale pour la souris que les souches virales sauvages (1,6 millions de plaque forming-unit (PFU) (unité formant plaque). Enfin, les auteurs ont montré que cette différence de létalité n'était pas due à l'émergence d'un clone hautement létal. Moins diversifiés (deux à trois fois moins de mutations), les virions retrouvés par prélèvement au

niveau du SNC ne présentaient pas la virulence de la population virale dans son ensemble. La réinjection à distance du SNC de ces seuls virions à une souris saine ne conduisait pas à une dissémination neuroméningée de ces virus, justifiant leur faible létalité. Cette preuve expérimentale est schématisée par la figure 4.

Ces résultats ont conforté l'idée que les quasi-espèces générées par la diversification génomique étaient nécessaires à la dissémination méningée de ce virus. Les auteurs ont avancé l'hypothèse d'une coopération entre variants viraux au cours du franchissement des multiples barrières rencontrées au cours de l'infection ; certains variants facilitant la colonisation et le franchissement de l'épithélium intestinal, d'autres servant de leurre pour tromper le système immunitaire alors que les derniers, altérant la barrière hématoencéphalique, permettent son franchissement.

La diversification génomique virale limitant la virulence

Comme cela fut prouvé dans le modèle poliovirus, la ribavirine, molécule antivirale efficace contre de nombreuses cibles virales (*Herpesviridae*, *Orthomyxovirus*, *Paramyxovirus*, *Filovirus*...), peut aussi augmenter la fréquence de mutation au-delà d'un seuil tolérable d'erreur. Le franchissement de ce seuil amènerait le virus à une extinction virale [26, 27]. Contrairement aux modèles d'entérovirus et de poliovirus pour lesquels la diversification augmenterait la virulence jusqu'à un certain seuil de tolérance, la ribavirine pourrait donc provoquer une véritable extinction virale du fait d'une importante mutagenèse pour certaines espèces virales telles que le virus de la stomatite vésiculeuse [VSV] et les hantavirus, par exemple [28-32]. Cette notion, symbolisant le dépassement du seuil d'erreur toléré, est appelée *error catastrophe* [33].

La première démonstration de l'aspect délétère de l'accumulation de mutations dans un génome viral a été réalisée par Holland *et al.* dans un modèle animal d'infection à VSV [34]. Ces auteurs ont pu démontrer qu'après exposition à divers mutagènes viraux (5-fluoro-uracile, 5-azacytidine), les virus retrouvés infectieux présentaient un taux de mutation identique à celui des virus sauvages. Ces résultats confortent l'idée d'un seuil de mutations au-delà duquel la réplication virale chute drastiquement, expliquant la disparition des virus comportant un nombre de mutations supérieur à ce seuil.

La présence d'une sous-population virale artificiellement diversifiée par l'action de molécules mutagènes pourrait aussi entraver le pouvoir infectieux de la sous-population virale « naturelle ». Ce phénomène, parfaitement étudié dans le cas du syndrome pied-main-bouche, mais imparfaitement compris dans d'autres infections virales, est dénommé « défection létale » [35, 36]. La principale

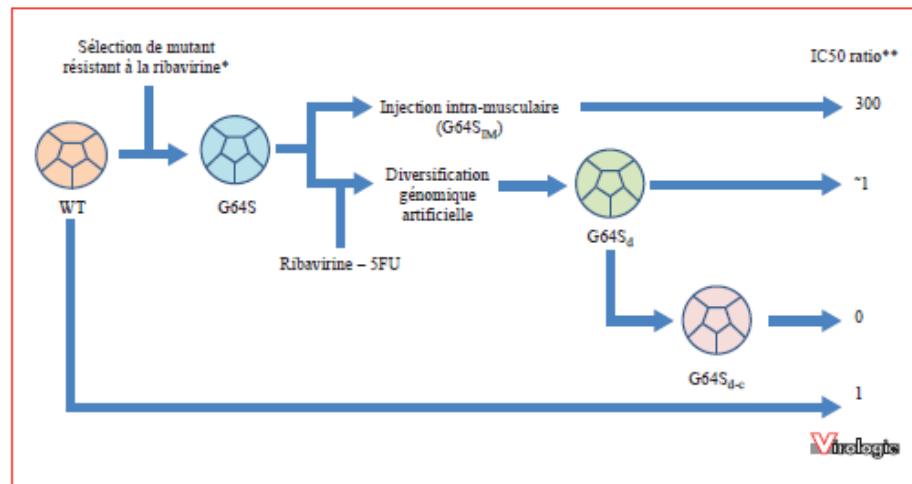


Figure 4. Représentation de l'impact clinique de la diversification génomique virale dans un modèle murin d'infection à Poliovirus (d'après [24]). IC50 : quantité suffisante pour tuer 50 % de la population murine expérimentale ; WT : poliovirus sauvage ; G64S : poliovirus mutant portant la mutation G64S augmentant la fidélité de la polymérase virale ; G64S_{Dd} : population de poliovirus mutant G64S diversifiée artificiellement ; G64S_{d-c} : population de poliovirus mutant G64S diversifié artificiellement injectée puis récupérée dans le liquide cébrospinal murin ; * : sélection de mutant par culture ; ** : ratio déterminé par normalisation de l'IC50 à l'IC50 du virus sauvage.

hypothèse mécanistique se baserait sur la formation de complexes protéiques inefficaces codés par les virus porteurs d'un nombre anormalement élevé de mutations. Ces complexes limiteraient la réplication de la sous-population sauvage entraînant ainsi une diminution de la charge virale globale. Une étude de 2011 a montré, dans un essai clinique portant sur le VIH-1, l'applicabilité clinique des mutagenèses virales létales [37]. Le taux de mutation du VIH-1 étant proche du seuil d'erreur toléré, l'augmentation, même minime, de ce taux de mutation conduit à l'extinction rapide de la population virale. Il reste néanmoins impossible d'extrapoler les résultats de test *in vitro* afin de prédire le délai et l'intensité de l'effet de telles thérapeutiques appliquées aux infections humaines, du fait des réservoirs en présence, des variations dans le *fitness* viral et de l'intensité de la réponse immunitaire de l'hôte infecté.

De même, les molécules habituellement utilisées dans le traitement de certaines néoplasies, comme le 5-fluorouracile, ont prouvé leur efficacité dans les modèles murins d'infection par les arénavirus [38]. Néanmoins, aucune application médicale n'a été validée à ce jour, les niveaux de mutagenèse nécessaires pour une application d'intérêt médical variant énormément entre les virus et les situations cliniques. De plus, ces seuils varient en fonction de la région nucléotidique porteuse de diversité, de la thérapeutique considérée ainsi que de la génétique du patient. La variabilité des cas à étudier est telle que l'utilisation de

ces notions en pratique clinique courante en est impossible pour le moment.

En conclusion, il apparaît que le taux de mutation viral est finement déterminé durant l'évolution d'un virus. Alors qu'une accumulation de mutations peut mener à l'extinction d'une population virale, leur absence ou leur nombre insuffisant limite la « survie » en environnement changeant, en cas de conditions hostiles comme la réponse immunitaire de l'hôte. La « survie » d'un virus donné est donc la résultante d'un équilibre entre la plasticité et la stabilité génomique, facilitant l'adaptation à de nouvelles niches écologiques mais conservant intact le pouvoir répliatif du virus.

La diversification génomique des virus respiratoires

Contrairement aux modèles présentés ci-dessus, aucune étude à ce jour n'a pu mettre en évidence de lien entre la diversité génomique des virus respiratoires et la sévérité clinique de la maladie dont ils sont responsables. Les virus respiratoires, principalement à ARN (influenza, VRS et HRV), ont néanmoins fait l'objet de nombreuses publications récentes.

Avec un taux de mutation estimé entre $7,1 \times 10^{-6}$ à $4,5 \times 10^{-5}$ substitutions par nucléotide par cycle d'infection

revue

cellulaire, la faible fidélité de la polymérase du virus influenza est le moteur de son évolution [5]. De plus, une étude récente a montré que le taux de mutations du virus influenza, évalué par tests de fluctuation, était deux fois supérieur à celui constaté par NGS [39, 40]. Dans cette méthode, un nombre important de cultures en parallèle étaient infectées avec un inoculum faible, permettant l'émergence de mutants résistants après une période de croissance exponentielle. Les mutations étant des événements rares et aléatoires, elles suivent un modèle mathématique dit de « Poisson ». Utilisant la résistance aux anticorps monoclonaux comme mode de sélection, cette méthode permet une estimation fiable du taux de mutation par cycle réplcatif. Ces mutations confirmant la diversité génétique importante des souches de grippe, concernent principalement les transversions de A vers G et de U vers C. Chaque cycle réplcatif induisant deux à trois mutations et 28 à 31 % des mutations ayant une conséquence « létale » sur le virion, la probabilité qu'un génome viral muté se réplique efficacement n'est que de 34 à 49 % [41]. Après génération de 28 à 31 % de mutations directement non viables pour les virions produits, les auteurs estiment que près de 99 % des virions produits sont non infectieux, indépendamment du modèle cellulaire infecté, plaçant les virus influenza proches de la limite du taux d'erreur tolérable par une souche virale pour rester réplcatif [39]. La génération de souches non infectieuses peut présenter un impact important car il a été montré que les particules virales défectives pourraient avoir un impact sur la virulence de l'infection. La production de ces particules au cours de la réplcation virale est ainsi un facteur de limitation potentiel de la virulence de cette infection [42].

L'étude de la diversification intra- et inter-hôte des génomes viraux est donc un élément central de la compréhension de la pathogenèse virale, aussi bien dans sa genèse que dans ses interactions avec le système immunitaire de l'hôte. Cette compréhension est fondamentale pour construire des modèles évolutifs de la grippe [10, 43]. La diversité génomique du virus de la grippe chez l'homme a été surtout étudiée chez les patients immunodéprimés et dans le cadre des résistances aux antiviraux [44]. Il est intéressant de noter que les antiviraux mutagènes ne génèrent pas de résistance, même après de nombreux passages en culture cellulaire [42]. Néanmoins, en l'absence de données cliniques fiables associées, les caractéristiques de la diversité génomique grippale, au temps précoce de la maladie, restent encore inconnues chez les patients au système immunitaire efficace, même si les données disponibles aujourd'hui suggèrent une diversité globalement faible lors d'une infection aiguë.

Pour le VRS, une étude a montré la présence de régions du génome viral hautement (points chauds de mutation) ou faiblement (points froids de mutation) diversifiées au

sein d'une même souche [45]. La région codant la protéine G (protéine de surface fixant les récepteurs cellulaires) étant décrite comme la plus variable du génome des VRS, la diversité virale peut aussi être considérée comme une méthode d'amélioration du *fitness* viral ou de tentative d'échappement au système immunitaire de l'hôte infecté. Par opposition, le gène de la protéine M, protéine structurale au carrefour de nombreuses fonctions virales, est le gène le moins diversifié de l'ensemble du génome du VRS. De façon globale, le nombre important de points froids de mutations conforte l'idée selon laquelle le VRS est un virus restreint dans sa diversification. Cette constatation est cohérente avec la faible diversification épidémiologique décrite au cours des 50 dernières années [46]. Le taux de mutation du VRS reste néanmoins à étayer. Estimé uniquement dans certaines situations épidémiques, ce taux est de $4,95 \times 10^{-3}$ substitutions par nucléotide par cycle d'infection cellulaire, soit cinq fois plus que ce qui est généralement rapporté pour ce virus. Ce taux est surtout 100 à 1000 fois plus important que celui relevé pour le virus influenza, dont l'évolution phylogénique est pourtant plus rapide [47]. Ces données sont néanmoins à mettre en balance avec l'absence de corrélation entre ces variations génétiques et la sévérité clinique de l'infection.

La transmission inter-hôte peut être aussi un facteur impactant la diversité génomique virale, en amont de toute diversification. Dans le cadre d'une infection expérimentale à HRV, il a été montré que la diversité génomique virale initialement retrouvée chez un hôte nouvellement infecté n'est pas limitée par la transmission préférentielle d'une faible proportion des variants minoritaires. La quasi-totalité des variants est en effet secondairement retrouvée chez les hôtes après infection [48]. Il est par ailleurs intéressant de noter que les auteurs ont pu estimer, pour ce virus, un taux de mutations intermédiaire, entre 10^{-4} et 10^{-3} substitutions par cycle d'infection cellulaire. Au contraire, dans une étude analysant la transmission de la diversité génétique des virus influenza, il a pu être mis en évidence l'association entre la sévérité de la maladie grippale (estimé par la température de l'hôte infecté) et la limitation de la diversité transmise d'un hôte à l'autre. Ainsi, une restriction de la diversité génétique de la souche transmise était associée à une plus grande sévérité chez l'hôte nouvellement infecté [49]. Cette information est cohérente avec l'hypothèse de nécessité d'acquisition d'un large panel de mutations et/ou de réassortiments pour permettre l'obtention d'un *fitness* optimisé chez un nouvel hôte [13].

La diversification doit donc se voir comme la résultante de la proportion (et du taux respectif de mutations) de ces régions génomiques chaudes et froides. Cette diversification théorique reste néanmoins à corréler à la possibilité de transmission de ces variants minoritaires [13]. Il faut donc distinguer diversification à court terme et diversification à

long terme. Cette diversité à court terme est toujours supérieure à la diversité à long terme, suggérant la sélection d'une fraction des variants générés [47].

Conclusion

La prodigieuse évolution des techniques de biologie moléculaire, avec, au premier plan, les techniques de séquençage à haut débit dites de « nouvelles générations », ouvre de nouveaux champs d'étude en microbiologie. L'étude du génome viral, initié par le séquençage selon la méthode de Sanger, est ainsi grandement améliorée. De nombreux travaux suggèrent qu'il existe un lien fort entre la diversification génomique du pathogène et la sévérité clinique de l'infection, au stade initial ou au cours de la maladie. Il reste néanmoins difficile d'obtenir des données cliniques fiables dans le cadre des infections respiratoires. En effet, les formes bénignes de ces maladies ne sont pas systématiquement relevées par les études épidémiologiques au contraire des formes sévères qui sont celles principalement étudiées. Il sera donc nécessaire de mettre en place des études prospectives, aux prélèvements itératifs systématiques, pour obtenir des données extrapolables. La compréhension fine du lien entre la diversité génomique virale et l'histoire naturelle de la maladie permettrait d'améliorer la compréhension de la pathophysiologie des maladies infectieuses et d'identifier des biomarqueurs utilisables en routine. Cette amélioration permettrait ainsi d'optimiser la prise en charge en service spécialisé des patients présentant des infections respiratoires aux complications prévisibles. La détermination des espèces virales sensibles au seuil d'*error catastrophe* permettra d'envisager le développement de thérapies innovantes, déstabilisant la polymérase virale, augmentant ainsi son taux d'erreur et conduisant à l'extinction de la souche. Enfin, l'identification des espèces virales aux pathogénicités positivement corrélées au taux de mutation pourrait permettre d'envisager la production de souches vaccinales atténuées présentant une sécurité d'utilisation augmentée car disposant d'une polymérase de fidélité améliorée. L'étude de la diversité a donc des applications cliniques importantes. Néanmoins, les limites de ces études restent principalement organisationnelles et financières. À terme, elles permettront néanmoins de proposer des modifications majeures pour la prise en charge des maladies infectieuses virales.

Liens d'Intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Ghedin E, Fitch A, Boyne A, et al. Mixed infection and the genesis of influenza virus diversity. *J Virol* 2009; 83 : 8832-41.

2. Ghedin E, Laplante J, DePasse J, et al. Deep sequencing reveals mixed infection with 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus strains and the emergence of oseltamivir resistance. *J Infect Dis* 2011; 203 : 168-74.
3. Ghedin E, Holmes EC, DePasse JV, et al. Presence of oseltamivir-resistant pandemic A/H1N1 minor variants before drug therapy with subsequent selection and transmission. *J Infect Dis* 2012; 206 : 1504-11.
4. McCrone JT, Lauring AS. Measurements of Intra-host Viral Diversity Are Extremely Sensitive to Systematic Errors in Variant Calling. *J Virol* 2016; 90 : 6884-95.
5. Sanjuan R, Nebot MR, Chirico N, et al. Viral Mutation Rates. *J Virol* 2010; 84 : 9733-48.
6. Kunkel TA. DNA Replication Fidelity. *J Biol Chem* 2004; 279 : 16895-8.
7. Eigen M. Molecular self-organization and the early stages of evolution. *Experientia* 1971; 27.
8. Domingo E, Sheldon J, Perales C. Viral quasispecies evolution. *Microbiol Mol Biol Rev* 2012; 76 : 159-216.
9. Poon LLM, Song T, Rosenfeld R, et al. Quantifying influenza virus diversity and transmission in humans. *Nat Genet* 2016; 48 : 195-200.
10. Murcia PR, Hughes J, Battista P, et al. Evolution of an Eurasian avian-like influenza virus in naive and vaccinated pigs. *PLoS Pathog* 2012; 8 : 1002730.
11. Hughes J, Allen RC, Baguelin M, et al. Transmission of equine influenza virus during an outbreak is characterized by frequent mixed infections and loose transmission bottlenecks. *PLoS Pathog* 2012; 8 : e1003081.
12. Wilker PR, Dinis JM, Starrett G, et al. Selection on haemagglutinin imposes a bottleneck during mammalian transmission of reassortant H5N1 influenza viruses. *Nat Commun* 2013; 4.
13. Varble A, Albrecht RA, Backes S, et al. Influenza A virus transmission bottlenecks are defined by infection route and recipient host. *Cell Host Microbe* 2014; 16 : 691-700.
14. Parvin JD, Moscona A, Pan WT, Leider JM, Palese P. Measurement of the mutation rates of animal viruses : influenza A virus and poliovirus type 1. *J Virol* 1986; 59.
15. Grad YH, Newman R, Zody M, et al. Within-host whole-genome deep sequencing and diversity analysis of human respiratory syncytial virus infection reveals dynamics of genomic diversity in the absence and presence of immune pressure. *J Virol* 2014; 88 : 7286-93.
16. Zhao C, Liu F, Pyle AM. An ultra-processive, accurate reverse transcriptase encoded by a metazoan group II intron. *RNA* 2018; 24 : 183-95.
17. Song L, Huang W, Kang J, et al. Comparison of error correction algorithms for Ion Torrent PGM data : application to hepatitis B virus. *Sci Rep* 2017; 7 : 8106.
18. Hoffmann E, Krauss S, Perez D, Webby R, Webster RG. Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines. *Vaccine* 2002; 20 : 3165-70.
19. Wilm A, Aw PPK, Bertrand D, et al. LoFreq : a sequence-quality aware, ultra-sensitive variant caller for uncovering cell-population heterogeneity from high-throughput sequencing datasets. *Nucleic Acids Res* 2012; 40 : 11189-201.
20. Acevedo A, Andino R. Library preparation for highly accurate population sequencing of RNA viruses. *Nat Protoc* 2014; 9 : 1760-9.
21. Debbink K, McCrone JT, Petrie JG, Truscon R, Johnson E, Mantlo EK, et al. Vaccination has minimal impact on the intra-host diversity of H3N2 influenza viruses. *PLoS Pathog* 2017; 13 : e1006194.
22. Malhotra R, Prabhakara S, Poss M, et al. *Estimating Viral Haplotypes in a Population Using k-mer Counting*. Berlin : Heidelberg, 2013.
23. Thompson JF, Milos PM. The properties and applications of single-molecule DNA sequencing. *Genome Biol* 2011; 12 : 217.
24. Vignuzzi M, Stone JK, Arnold JJ, Cameron CE, Andino R. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* 2006; 439.

revue

25. Pfeiffer JK, Kirkegaard K. Increased fidelity reduces poliovirus fitness and virulence under selective pressure in mice. *PLoS Pathog* 2005 ; 1 : e11.
26. Crotty S, Maag D, Arnold JJ, et al. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat Med* 2000 ; 6 : 1375-9.
27. Crotty S, Cameron CE, Andino R. RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *PNAS USA* 2001 ; 98 : 6895-900.
28. Airaksinen A, Pariente N, Menéndez-Arias L, Domingo E. Curing of foot-and-mouth disease virus from persistently infected cells by ribavirin involves enhanced mutagenesis. *Virology* 2003 ; 311 : 339-49.
29. Day CW, Smee DF, Julander JG, et al. Error-prone replication of West Nile virus caused by ribavirin. *Antiviral Res* 2005 ; 67 : 38-45.
30. Maag D, Castro C, Hong Z, Cameron CE. Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) as a mediator of the antiviral activity of ribavirin. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 46094-8.
31. Lanford RE, Chavez D, Guerra B, et al. Ribavirin induces error-prone replication of GB virus B in primary tamarin hepatocytes. *J Virol* 2001 ; 75 : 8074-81.
32. Severson WE, Schmaljohn CS, Javadian A, Jonsson CB. Ribavirin causes error catastrophe during Hantaan virus replication. *J Virol* 2003 ; 77 : 481-8.
33. Anderson JP, Daifuku R, Loeb LA. Viral error catastrophe by mutagenic nucleosides. *Annu Rev Microbiol* 2004 ; 58 : 183-205.
34. Holland JJ, Domingo E, de la Torre JC, Steinhauer DA. Mutation frequencies at defined single codon sites in vesicular stomatitis virus and poliovirus can be increased only slightly by chemical mutagenesis. *J Virol* 1990 ; 64 : 3960-2.
35. Grande-Pérez A, Lázaro E, Lowenstein P, Domingo E, Manrubia SC. Suppression of viral infectivity through lethal defection. *PNAS USA* 2005 ; 102 : 4448-52.
36. González-López C, Arias A, Pariente N, Gómez-Mariano G, Domingo E. Preextinction viral RNA can interfere with infectivity. *J Virol* 2004 ; 78 : 3319-24.
37. Mullins JI, Heath L, Hughes JP, et al. Mutation of HIV-1 genomes in a clinical population treated with the mutagenic nucleoside KP1461. *PLoS One* 2011 ; 6 : e15135.
38. Ruiz-Jarabo CM, Ly C, Domingo E, de la Torre JC. Lethal mutagenesis of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV). *Virology* 2003 ; 308 : 37-47.
39. Pauly MD, Procaro MC, Lauring AS. A novel twelve class fluctuation test reveals higher than expected mutation rates for influenza A viruses. *eLife* 2017 ; 6.
40. Luria SE, Delbrück M. Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics* 1943 ; 28 : 491-511.
41. Visher E, Whitefield SE, McCrone JT, Fitzsimmons W, Lauring AS. The Mutational Robustness of Influenza A Virus. *PLoS Pathog* 2016 ; 12 : e1005856.
42. Pauly MD, Lauring AS. Effective lethal mutagenesis of influenza virus by three nucleoside analogs. *J Virol* 2015 ; 89 : 3584-97.
43. Dinis J, Florek NW, Fatola OO, et al. Deep Sequencing Reveals Potential Antigenic Variants at Low Frequencies in Influenza A Virus-Infected Humans. *J Virol* 2016 ; 90 : 3355-65.
44. Rogers MB, Song T, Sebra R, et al. Intrahost dynamics of antiviral resistance in influenza A virus reflect complex patterns of segment linkage, reassortment, and natural selection. *mBio* 2015 ; 6.
45. Do LA, Wilm A, Van Doorn HR, et al. Direct whole-genome deep-sequencing of human respiratory syncytial virus A and B from Vietnamese children identifies distinct patterns of inter- and intra-host evolution. *J Gen Virol* 2015 ; 96 : 3470-83.
46. Tan L, Lemey P, Houspie L, et al. Genetic variability among complete human respiratory syncytial virus subgroup A genomes: bridging molecular evolutionary dynamics and epidemiology. *PLoS One* 2012 ; 7 : e51439.
47. Agoti CN, Munywoki PK, Phan MVT, et al. Transmission patterns and evolution of respiratory syncytial virus in a community outbreak identified by genomic analysis. *Virus Evol* 2017 ; 3.
48. Cordey S, Junier T, Gerlach D, et al. Rhinovirus Genome Evolution during Experimental Human Infection. *Martin DP, éditeur. PLoS ONE* 2010 ; 5 : e10588.
49. Sobel Leonard A, Weissman D, Greenbaum B, Ghedin E, Koelle K. Transmission Bottleneck Size Estimation from Pathogen Deep-Sequencing Data, with an Application to Human Influenza A Virus. *J Virol* 2017 ; JVI.00171-VI.217.

Annexe E. Brevet. Inventeurs: PICHON M., Josset L., Lina B., Katze M., Langevin S.; Université Lyon 1 - HCL; Titre: [Biomarkers for early determination of severity of influenza related disease] Application number: 15306499.3-1405; Date 18.12.2015



Europäisches
Patentamt
European
Patent Office
Office européen
des brevets

European Patent Office
80298 MUNICH
GERMANY

Questions about this communication ?
Contact Customer Services at www.epo.org/contact



PICHON, Maxime
341 Rue Garibaldi
69007 Lyon
FRANCE

Date
03.05.18

Reference	Application No./Patent No. 16777606.1 - 1111
Applicant/Proprietor Université Claude Bernard Lyon 1, et al	

Notification of the data mentioned in Rule 19(3) EPC

In the above-identified patent application you are designated as inventor/co-inventor.
Pursuant to Rule 19(3) EPC the following data are notified herewith:

DATE OF FILING : 23.09.16
 PRIORITY : EP/25.09.15/ EPA 15306499
 TITLE : BIOMARKERS FOR EARLY DETERMINATION OF SEVERITY OF INFLUENZA RELATED DISEASE
 DESIGNATED STATES : AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO RS SE SI SK SM TR

For the Examining Division



Annexe F. Listes des publications acceptés, soumises, des communications orales et affichées et des activités d'expertise au cours des années de thèse du candidat (hors travaux de thèse).

Publications scientifiques

1. **PICHON M.**, Gebeile R., Lina B., Jacquet G., Gaymard A. [*Quel prélèvement pour le transport des mycoplasmes, eSwab® ou écouvillon sec?*] *Ann Biol Clin* 2019 (in press)
2. Bal A., **PICHON M.**, Picard C., Casalegno J.S., Valette M., Schuffenecker I., Billard L., Vallet S., Vilchez G., Cheynet V., Oriol G., Assant S., Gillet Y., Lina B., Brengel-Pesce K., Morfin F., Josset L. *Quality control implementation for universal characterization of DNA and RNA viruses in clinical respiratory samples using single metagenomic next-generation sequencing workflow.* *BMC Infectious Diseases* 2018 18:537.
3. Kramer R., Sabatier M., Wirth T., **PICHON M.**, Lina B., Schuffenecker I., Josset L. *Diversity and biennial circulation of enterovirus D68: a retrospective cohort study in France (2010-2016).* *Euro Surveill.* 2018;23(37).
4. Gaymard A., **PICHON M.**, Bal A. Massoud M., Buenerd A., Massardier J., Combourieu D., Guibeau L., Gaucherand P., Lina B., Mekki Y., Morfin F., Bolze PA. [*Prise en charge diagnostic et clinique d'une varicelle en cours de grossesse autour de cas cliniques.*] *Ann Biol Clin* 2018
5. Gaymard A., Bouscambert-Duchamp M., **PICHON M.**, Frobert E., Vallee J., Lina B., Casalegno J-C., Morfin F. *Genetic characterization of respiratory syncytial virus highlights a new BA genotype and emergence of the ON1 genotype in Lyon, France, between 2010 and 2014.* *Journal of Clinical Virology* 102 (2018) 12–18
6. **PICHON M.**, Gaymard A., Bolze P-A., Gaucherand P., Mekki Y. *Lethal and atypical fetopathy caused by cytomegalovirus recurrence with isolated intra-abdominal complication in an immune woman.* *Med Case Rep and Reviews* 2018. Volume 1(1): 1-4.
7. **PICHON M.**, Gaymard A., Lebaill-Carval K., Frobert E., Beaufils E., Chene G., Tommasino M., Lina B., Gaucherand P., Gautheret-Dejean A., Bonnafous P., Gheit T., Buenerd A., Lamblin G., Mekki Y. *Vaginal neoplasia induced by an unusual papillomavirus genotype in a woman with inherited chromosomally integrated HHV-6* *Gynecol Obstet Invest.* April 6, 2017
8. Mekki Y., Casalegno JS., **PICHON M.**, Bouscambert-Duchamp M., Clamadieu C., Billaud G., Frobert E., Combourieu D., Massoud M., Massardier J., Bolze PA., Guibaud L., Plaisant F., Blanc S., Buenerd A., Claris O., Lina B., Gaucherand P. *Herpès simplex type 1 primo-infection and pregnancy, two cases of intra-uterine infection and revue of the literature.* *Ref Gynecol Obstet* Vol 17, 2016
9. Gaymard A., **PICHON M.**, Degaud M., Tasse J., Dupieux C., Laurent F. *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in environment of public transport: data from metropolitan in Lyon, France.* *Int J Antimicrob Agents.* 2016 Oct;48(4):459-62

10. Gaymard A., **PICHON M.**, Bouscambert-Duchamp M. Lina B. [*Orthomyxoviridae*]. *Traité de Virologie Médicale*, 2nd Edition.
11. Degaud M., Foucher B., **PICHON M.**, Belhabri A., Daniel M., Vila L. *Retrospective study of peripheral blood lymphoagglutination and platelet satellitism in Marginal Zone Lymphomas peripheral blood films*. *Int J Lab Hem.* 2018;1–4.
12. **PICHON M.**, Joly M., Barthelemy D., Lebreton F., Benchaib M., Radenne S., Lina B., Mekki Y., Devouassoux-Shisheboran M. *Evaluation of p16/Ki-67 dual staining and HPV genotyping in anal cytology with diagnosis of ASCUS for detection of high-grade anal intraepithelial lesions*. (In press)

Publications en cours de soumission

1. **PICHON M.**, Labois C., Lebaill-Carval K., Billaud B., Lina B., Gaucherand P., Mekki Y. *Decontamination of intra-vaginal probes infected by human papillomavirus (HPV) by Antigermix*.
2. **PICHON M.**, Simon B., Valette M., Bal A., Picard C., Escuret V., Ottman M., Javouhey E., Gillet Y., Lina B., Josset L. *Diversity of Influenza virus genome evolve during clinical course in immunocompetent patients*.
3. **PICHON M.**, Simon B., Valette M., Bal A., Picard C., Escuret V., Ottman M., Javouhey E., Gillet Y., Lina B., Josset L. *Diversity of Influenza virus genome at baseline is associated with clinical outcome in immunocompetent patients*.
4. Destras G., **PICHON M.**, Simon B., Gaymard A., Valette M., Bal A., Escuret V., Gaucherand P., Lina B., Bolze PA., Josset L. *Diversity of Influenza virus genome is function to Influenza outcome in pregnant women*.
5. Pellisier R., **PICHON M.**, Simon B., Bal A., Ader F. Michaux K., Lina B., Josset L., Morfin F. Frobert E. *Next-Generation sequencing for the detection of antiviral drug resistant herpes simplex virus type 1 subpopulation in immunocompromised patients*.
6. Simon B., **PICHON M.**, Violot S., Gaymard A., Josset L., Casalegno J-S., Lina B., Escuret V. *Evolution of neuraminidase mutations linked to the seasonal oseltamivir-resistant Influenza A(H1N1) virus*.
7. **PICHON M.**, Labois C., Tardy-Guidollet V., Mallet D., Casalegno JS., Billaud G., Lina B., Gheit T., Gaucherand P., Mekki Y. *New PCR enhances biological diagnosis and clinical management of human Parvovirus B19 infections*.
8. **PICHON M.**, Labois C., Josset L., Gaucherand P., Casalegno JS., Billaud G., Lina B., Gheit T., Servant-Delmas A., Mekki Y. *Phylogenic analysis of human parvovirus B19 in French pregnant women*.

Brevet

1. Inventeurs: **PICHON M.**, Josset L., Lina B., Katze M., Langevin S.; Université Lyon 1 – HCL; Titre: [*Biomarkers for early determination of severity of Influenza related disease*] Application number: 15306499.3-1405; Date 18.12.2015

Communications Orales (sur résumé)

1. **PICHON M.**, Froehlich C., Callet - Bauchu E., Vila L. [*Lymphomes de la Zone Marginale: étude rétrospective de la fréquence de phénomène de lymphoagglutination et de satellitisme plaquettaire*]. Congrès du Groupe Francophone d'Hématologie Cellulaire, Mai 2013, Deauville, France.
2. **PICHON M.**, Picard C., Valette M., Bal A., Escuret V., Ottman M., Javouhey E., Gillet Y., Lina B., Josset L. *Characterization of the genome diversity of Influenza virus associated with severe form of Influenza in children*. 18th Annual Meeting of the European Society of Clinical Virology. September 2015, Edinburgh, Ecosse.
3. **PICHON M.**, Picard C., Valette M., Bal A., Escuret V., Ottman M., Javouhey E., Gillet Y., Lina B., Josset L. [*Caractérisation de la diversité génomique des virus Influenzae associée aux formes bénignes et sévères de maladie grippale chez l'enfant*]. 35^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). Décembre 2015, Paris, France.
4. **PICHON M.**, Labois C., Tardy V., Mallet D., Casalegno J.S., Billaud G., Lina B., Servant A., Mekki Y. [*Amélioration de la prise en charge clinique des infections à Parvovirus B19 par une optimisation du diagnostic biologique par PCR nichée.*] 35^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). Décembre 2015, Paris, France.
5. **PICHON M.**, Labois C., Josset L., Gaucherand P., Casalegno J.S., Billaud G., Lina B., Servant-Delmas A., Mekki Y. [*Analyse phylogénique des infections à Parvovirus B19 chez les femmes enceintes*]. 35^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). Décembre 2015, Paris, France.
6. **PICHON M.**, Gaymard A., Verneau V., Buenerd A., Gaucherand P., Bolze P.A., Mekki Y. *Severe fetopathy caused by cytomegalovirus recurrence with isolated intra-abdominal complication in an immune woman*. 19th Annual Meeting of the European Society of Clinical Virology. September 2016, Lisbonne, Portugal.
7. Sabatier M., **PICHON M.**, Essaidi-Laziosi M., Falcon D., Tapparel C., Schuffenecker I., Lina B., Josset L. *Molecular and clinical characterization of Enteroviruses-D68 infections between 2010 and 2015 in Lyon, France using 3D Cell culture and Next-Generation Sequencing*. 19th Annual Meeting of the European Society of Clinical Virology. September 2016, Lisbonne, Portugal.
8. Bal A., **PICHON M.**, Picard C., Billaud G., Casalegno JS, Bouscambert-Duchamp M., Escuret V., Schuffenecker I., Valette M., Lina B., Morfin F., Josset L. *Metagenomic analysis of the respiratory virome associated with acute respiratory illness of unknown etiology in infants*. 19th Annual Meeting of the European Society of Clinical Virology. September 2016, Lisbonne, Portugal.
9. Kramer R., **PICHON M.**, Houhamdi L., Gerbier-Colomban S., Forissier M.F., Pasquet-Volckmann C., Lina B., Josset L., *Effect of a reinforced hospital campaign for seasonal Influenza vaccination of healthcare workers 2016-2017 on nosocomial outbreaks in the University Hospital of Lyon, France*. 6th ESWI Influenza conference, September 2017, Riga, Latvie.
10. Langevin, **PICHON M.**, Smith E., Morrison J., Bent Z., Green R., Baker K., Solberg O., Gillet Y., Javouhey E., Lina B., Katze MG., Josset L. *Nasopharyngeal microbial*

signatures associated with severe Influenza in children and in adults. 6th ESWI Influenza conference, September 2017, Riga, Latvie.

11. Pelissier R., **PICHON M.**, Bal A., Ader F., Michaux K., Lina B., Morfin F., Josset L., Frobert E. *Next generation sequencing for the detection of antiviral drug resistant herpes simplex virus type 1 subpopulations in immunocompromised patients.* 20th Annual Meeting of the European Society of Clinical Virology. September 2017 Stresa, Italie.
12. Bal. A., Cheynet V., Sarkozy C., Oriol G., Becker J., Vilchez G., Guichard A., Trouillet-Assant S., Sesques P., **PICHON M.**, Mallet F., Ader F., Lina B., Josset L., Morfin F., Reynier F., Salles G., Brengel-Pesce K. *Blood viral metagenomic monitoring of autologous stem cell transplant recipients: a prospective case-control study, 2015-2017, Lyon, France.* 28th ECCMID, April 2018, Madrid, Espagne.
13. **PICHON M.**, Balandine A., Valette M., Schuffenecker I., Morfin F., Lina B., Billaud G. *Evaluation of Panther Fusion[®] Respiratory kit in a hospitalized population.* 21th Annual Meeting of the European Society of Clinical Virology. September, 2018, Athens, Greece.
14. **PICHON M.**, Balandine A., Valette M., Schuffenecker I., Morfin F., Lina B., Billaud G. *Evaluation du Panther Fusion[®] Respiratory kit dans une population hospitalisée.* 38^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). Décembre 2018, Paris, France.

Communications Orales (sur invitation)

1. **PICHON M.** *Evaluation des performances analytiques des kits respiratoires Panther Fusion: Grippe A/B/RSV - AdV/hMPV/RV – Parafllu.* 38^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). Décembre 2018, Paris, France.

Communications Affichées

1. **PICHON M.**, Langevin S., Morrison J., Lina B., Katze M. G., Josset L. *Early microbial signatures associated with severe Influenza in children.* 1st Congress on Ecological and Molecular mOdeling of infectIIONS, Décembre 2014, Lyon, France.
2. Gaymard A., **PICHON M.**, Degaud M., Tasse J., Dupieux C., Laurent F. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in environment of public transport: data from metropolitan in Lyon, France.* 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, April 2015, Copenhagen, Denmark.
3. **PICHON M.**, Bal A., Morfin F., Casalegno J.S., Billaud G., Lina B., Vandenesch F., Dauwalder O., Mekki Y. *Evaluation of a multiplex gastrointestinal panel. Which test for a pediatric population?* 18th Annual Meeting of the European Society of Clinical Virology. September 2015, Edimburgh, Scotland.
4. Langevin S., **PICHON M.**, Morrison J., Smith E., Green R., Thomas M., Lina B., Katze M., Josset L. *Prognostic microbial signatures associated with clinical disease outcome in children hospitalized with Influenza.* Cell Symposia on Human Immunity and the microbiome in health and disease, September 2015, Montréal, Canada.

5. **PICHON M.**, Gaymard A., Josset L., Valette M., Millat G., Lina B., Escuret V. *Characterization of oseltamivir-resistant Influenza virus populations in immunocompromised patients using digital-droplet polymerase chain reaction: comparison with deep sequencing analysis*. 19th Annual Meeting of the European Society of Clinical Virology. September 2016, Lisbon, Portugal.
6. **PICHON M.**, Gaymard A., Lebail-Carval K., Beaufile E., Lamblin G., Chene G., Lina B., Gheit T., Mekki Y. *Vaginal intraepithelial neoplasia induced by unusual papillomavirus subtype associated with high load of human herpes virus 6*. 19th Annual Meeting of the European Society of Clinical Virology. September 2016, Lisbon, Portugal.
7. **PICHON M.**, Joly M., Gaymard A., Barthelemy D., Casalegno JS., Billaud G., Radenne S., Cotte L., Ferry T., Benchaïb M., Lina B., Devouassaux-Shisheboran M., Mekki Y. *[Papillomavirus des patients consultants pour ASCUS au CHU de Lyon]*. 36^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). Décembre 2016, Paris, France.
8. Barthelemy D., Guerre P., **PICHON M.**, Potinet V., Jeannoël M., Huot L., Serrier H., Chidiac C., Ferry T., Lina B. *Economic impact of POCT Alere™ i Influenza a&b® in emergencies of hospital Lyon Croix-rousse, France*. 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, April 2017, Vienne, Autriche.
9. **PICHON M.**, Gaymard A., Lebail-Carval K., Frobert E., Beaufile E., Chene G., Tommasino M., Lina B., Gaucherand P., Gautheret-Dejean A., Bonnafous P., Gheit T., Buenerd A., Lamblin G., Mekki Y. *Vaginal Neoplasia Induced by an Unusual Papillomavirus Subtype in a Woman with Inherited Chromosomally Integrated Human Herpesvirus Type 6A*. 10th International Conference on Human Herpesvirus 6 and 7. July 2017, Berlin, Allemagne
10. Etievant S., Barthelemy D., Thomas M., Valette M., Gaymard A., Gillet Y., Lina B., Morfin F., Josset L., **PICHON M.** *RSV infections during 2014 -2016 epidemics: clinical and sequencing characteristics in University Hospital of Lyon, France*. 20th Annual Meeting of the European Society of Clinical Virology. September, 2017 Stresa, Italie.
11. **PICHON M.**, Gaymard A., Jeannoel M., Charre C., Valette M., Schuffenecker I., Morfin F., Lina B. *Evaluation of Liferiver™ respiratory viral kit in a hospitalized population*. 20th Annual Meeting of the European Society of Clinical Virology. September, 2017 Stresa, Italie.
12. Bouaziz J., Hees L., Valette M., Mezgueldi E., Casalegno J-S, Lina B., Gillet Y., Josset L., **PICHON M.** *[Épidémie pédiatrique de virus respiratoire 2016-2017: une saison atypique?]* 37^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). Décembre 2017, Paris, France
13. Gaymard A., **PICHON M.**, Valette M., Fiorini S., Rivat N., Billaud G., Morfin F., Lina B., Escuret V. *[Détection des virus Influenzae et VRS par système cobas®Liat®]*. 37^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). Décembre 2017, Paris, France.
14. Bal A., **PICHON M.**, Casalegno J.S., Picard C., Schuffenecker I., Valette M., Vilchez G., Cheynet V., Oriol G., Brengel-Pesce K., Gillet Y., Lina B., Josset L., Morfin F. *Quality controls implementation for universal characterization of DNA and RNA respiratory viruses using single metagenomic Next Generation Sequencing workflow*. 2nd International Conference on Clinical Metagenomics. Octobre 2017, Genève, Suisse.

15. Billard L., Bal A., Cheynet V., **PICHON M.**, Vilchez G. Hery-Arnaud G., Le Berre R., Lina B, Trouillet-Assant S., Morfin F., Josset L., Brengel-Pesce K., Vallet S. *Comparison of two amplification methods for viral metagenomics analysis of cystic fibrosis respiratory samples*. 28th ECCMID, April 2018, Madrid, Espagne
16. Destras G., **PICHON M.**, Simon B., Lina B., Josset L. *Viral genomic diversity of Influenza virus in a retrospective cohort of pregnant women in Lyon, France*. 4th Congress on Ecological and Molecular modeling of infections, May 2018, Lyon, France.
15. Dupont D., Persat F., Develay M., Josse E., Menotti J., Wallon M., **PICHON M.** *Évaluation in vitro de l'effet inhibiteur de l'EDTA sur les levures d'intérêt médical*. Congrès annuel des Sociétés Françaises de Mycologie Médicale et de Parasitologie. Mai 2018, Nice, France.
16. Destras G., **PICHON M.**, Simon B., Valette M., Bal A., Escuret V., Gaucherand P., Bolze PA., Lina B., Josset L. *Viral genomic diversity of Influenza virus in a retrospective cohort of pregnant women in Lyon, France*. 21th Annual Meeting of the European Society of Clinical Virology. September 2018, Athens, Greece.
17. Gaymard A., **PICHON M.**, Barthelemy D., Semanas Q., Simon B., Etievant S., Thomas M., Gillet Y., Javouhey E., Casalegno JS., Valette M., Lina B., Josset L., Morfin F.. *Genetic characterization of respiratory syncytial virus circulating in Lyon, France, between 2010 and 2018*. 21th Annual Meeting of the European Society of Clinical Virology. September 2018, Athens, Greece.
18. Deroche L., Broutin L., **PICHON M.**, Plouzeau C., Cremniter J., Burucoa C., Michaud A. *BLSE / Carbapénémases: détection simplifiée par les disques D72C® (MastGroup)*. 38^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). Décembre 2018, Paris, France.
19. **PICHON M.**, Fourneau A., Pithon E., Broutin L., Konan N., Plouzeau C., Pichard B., Barrioz T., Lecuit M., Burucoa C. *Prévalence du portage asymptomatique de Listeria monocytogenes*. 38^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). 17-18 Décembre 2018, Paris, France.

Reviewing

1. *Streptococcus and Pseudomonas as discriminatory markers in the microbial profiling of Influenza and non-Influenza cases of severe acute respiratory infections*. Health Science Reports. Dec 2017.
2. *Microbiota composition and the integration of exogenous and endogenous signals in reactive nasal inflammation*. Journal of Immunology Research. Fev 2018.
3. *An assessment of the level of knowledge of secondary school students (in the State of Pernambuco, Brazil) with regard to Human Papillomavirus (HPV) and prophylactic vaccinations*. Current Women's Health Reviews. Mai 2018
4. *Intravenous use of dexmedetomidine for attenuation of hemodynamic stress response to laryngoscopy and endotracheal intubation in contrast to intravenous lignocaine*. Vaccines Research. Juin 2018.
5. *Development and Evaluation of Colloidal Gold Immuno chromatographic Strip for Rapid Detection of Feline Calicivirus*. Vaccines Research. Juin 2018.

Ma belle aventure de la thèse s'achève sur ces mots.

Ne reste que l'avenir à inventer et à écrire.

Caractérisation du microbiome respiratoire et de la diversité génomique virale des formes sévères de maladie grippale

Résumé de la thèse

La grippe est une infection respiratoire responsable de complications respiratoires ou neurologiques et nécessitant une prise en charge rapide et adaptée. L'émergence des technologies de séquençage à haut débit (NGS) permet l'étude des communautés microbiennes résidentes ainsi qu'une étude approfondie du génome des pathogènes impliqués. Cette thèse a pour objectif de caractériser le microbiome respiratoire et la diversité génomique virale des patients infectés par les virus grippaux, en corrélant les données clinicobiologiques recueillies. Après recueil des prélèvements respiratoires d'enfants hospitalisés entre 2010 et 2014, le séquençage de leur microbiome respiratoire a mis en évidence une augmentation de la diversité microbienne ainsi qu'une signature microbienne différentielle entre formes cliniques. Une répartition différentielle de taxons (OTU) permet la prédiction de complications chez les enfants infectés. L'étude d'échantillons respiratoires de patients adultes permettra de compléter la signature prédictive. Après validation des processus analytiques et bio-informatiques par reconstitution artificielles de quasi espèces et recueil de 125 prélèvements cliniques respiratoires, le séquençage du génome entier par NGS des virus grippaux permet de différencier les diversités initiales en fonction de la nature du virus infectant et de la complication. En comparaison du prélèvement initial précoce les échantillons prélevés successivement mettent en évidence une diversification différentielle entre les différents segments des virus grippaux infectant les patients, que ce soit chez les patients immunocompétents ou chez un patient immunodéprimé à l'excrétion prolongé.

Mots clés : Grippe, Microbiome respiratoire, Virome respiratoire, Séquençage ADN16S, Séquençage profond (UDS), NGS, Virus influenza, Diversification virale, Quasi-espèces