



ViBra-Flu : Interactions Virome-Bacteriome-Transcriptome impliquées dans les infections respiratoires aiguës chez l'enfant

Marina Sabatier

► To cite this version:

Marina Sabatier. ViBra-Flu : Interactions Virome-Bacteriome-Transcriptome impliquées dans les infections respiratoires aiguës chez l'enfant. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2023. Français. NNT : 2023LYO10308 . tel-04792938

HAL Id: tel-04792938

<https://theses.hal.science/tel-04792938v1>

Submitted on 20 Nov 2024

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.



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole Doctorale N° 341

E2M2 : Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation

Discipline : Biologie - Virologie

Soutenue publiquement le 15/12/2023, par :

Marina Sabatier

ViBra-Flu : Interactions Virome- Bacteriome-Transcriptome impliquées dans les infections respiratoires aiguës chez l'enfant

Devant le jury composé de :

JARRAUD, Sophie	MCU-PH (Université de Lyon 1)	Présidente
HENQUELL, Cécile	PU-PH (CHU Clermont-Ferrand)	Rapporteuse
LEVEQUE, Nicolas	PU-PH (CHU de Poitiers)	Rapporteur
PICHON, Maxime	MCU-PH (CHU de Poitiers)	Examineur
JOSSET, Laurence	MCU-PH (CIRI - U111)	Directrice de thèse
BARDEL, Claire	MCU-PH (Université Lyon 1)	Co-directrice de thèse
BRENGEL-PESCE Karen	phD (Biomérieux)	Co-directrice de thèse

Résumé

Introduction :

Les infections respiratoires aiguës (IRA) chez les enfants de moins de 5 ans constituent une cause majeure de mortalité et d'hospitalisation. Certaines compositions de microbiome respiratoire peuvent être associées à la sévérité de la maladie. L'objectif principal de cette thèse était de caractériser les différentes communautés virales et bactériennes du microbiome nasopharyngé d'enfants présentant des IRA ainsi que leur réponse transcriptomique afin d'identifier des biomarqueurs pronostic de la sévérité.

Méthodes :

Afin de valider la méthode d'extraction utilisable en amont de la métagénomique virale, une première étude technique a été réalisée comparant deux plateformes automatisées (eMAG ; MagNA Pure 24, MP24) et le kit manuel QIAamp Viral RNA (QIAamp) à partir d'échantillons respiratoires cliniques, un MOCK (comprenant cinq virus isolés) et un contrôle (NTC). Suite à ces résultats, une cohorte prospective de 144 enfants <5 ans hospitalisés à l'unité d'hospitalisation de courte durée (UHCD) des Hospices Civils de Lyon (HCL) pour un syndrome grippal pendant les hivers 2015-2017 a été étudiée. Le bactériome et le virome nasopharyngés ont été caractérisés par des approches de metabarcoding et de métagénomique virale. Les réponses transcriptomiques respiratoires de l'hôte ont été analysées par mRNA-Seq. La prévalence d'une famille virale ubiquitaire du virome a été validée par métagénomique virale sur une 2ème cohorte pédiatrique d'enfants atteints d'IRA.

Résultats :

Concernant la partie technique, l'eMAG donnait les meilleurs résultats en minimisant les contaminations croisées et les contaminations provenant des réactifs. Cette méthode a été choisie pour le reste des analyses sur le virome de cette thèse.

Les analyses du virome et du transcriptome ont été réalisées sur les enfants <7 mois et hospitalisés pour bronchiolite à VRS afin d'étudier une cohorte homogène. Après filtrage de la qualité, les résultats du microbiome étaient disponibles pour 79 enfants pour le bactériome et 53 pour le virome ; et les profils transcriptomiques pour 36 enfants. Les profils dominés par les genres *Haemophilus*, *Moraxella* et *Streptococcus* étaient les plus répandus bien qu'ils ne soient pas associés de manière significative à la sévérité. 77 % des patients présentaient une

ou des co-infections avec un virus respiratoire (les plus fréquentes étant à *Picornaviridae*, *Coronaviridae*, *Orthomyxoviridae*). L'expression des gènes de l'immunité et des cytokines inflammatoires n'était pas associée à la sévérité des bronchiolites ni aux co-infections virales lors de l'analyse du transcriptome de l'hôte. Dans cette cohorte, les *Anelloviridae* étaient la famille de virus d'eucaryotes les plus fréquents (chez 66% des patients), avec le genre *TTMV* majoritaire. Certaines espèces comme *TTMV3*, 6 et 9 étaient associées à la sévérité de la bronchiolite.

Cette prévalence de *TTMV* a été validée dans une seconde cohorte d'enfants (âge médian : 12 mois) hospitalisés pour IRA d'étiologie inconnue pour laquelle ce genre représentait 87,1% des reads d'*Anelloviridae* retrouvées dans les 16 échantillons.

Conclusion :

Nos données soulignent les taux élevés de co-infections virales chez les enfants souffrant d'IRA et confirment la présence majoritaire de profils dominés par *Haemophilus*, *Streptococcus* et *Moraxella* dans une population pédiatrique symptomatique recensée à l'UHCD. Nous n'avons pas pu évaluer les associations significatives entre les profils du microbiome et la sévérité de la maladie. Nos résultats ont mis en évidence une prévalence élevée de *TTMV* dans les échantillons respiratoires de jeunes enfants souffrant d'une IRA. Des études de plus grande envergure sont nécessaires pour identifier les interactions entre les communautés virales et bactériennes au sein du microbiome respiratoire et leur impact sur les réponses transcriptomiques de l'hôte lors d'IRA chez les enfants et pour explorer le rôle du *TTMV* dans les maladies respiratoires de l'enfant.

Abstract

Introduction:

Acute respiratory infections (ARI) in children under 5 years are a major cause of mortality and hospitalization. Respiratory microbiome compositions may be associated with disease severity. The main objective of this thesis was to characterize the different viral and bacterial communities of the nasopharyngeal microbiome of children presenting with ARI and their transcriptomic response in order to identify prognostic biomarkers of severity.

Methods:

In order to validate the extraction method for viral metagenomics method, a technical study was carried out comparing two automated platforms (eMAG; MagNA Pure 24, MP24) and the manual QIAamp Viral RNA (QIAamp) kit using clinical respiratory samples, a MOCK (with five isolated viruses) and a control (NTC). Following these results, a prospective cohort of 144 children <5 years old hospitalized at the Hospices Civils de Lyon (HCL) for influenza-like illness during the winters of 2015-2017 was studied. Nasopharyngeal bacteriome and virome were characterized using metabarcoding and viral metagenomics approaches. Respiratory host transcriptomic responses were analyzed by mRNA-Seq. The prevalence of a ubiquitous viral family of the virome was validated by viral metagenomics on a second pediatric cohort of children with ARI.

Results:

On the technical side, eMAG gave the best results, minimizing cross-contamination and contamination from reagents. This method was chosen for the rest of the virome analyses in this thesis.

Virome and transcriptome analyses were carried out on children <7 months hospitalized for RSV bronchiolitis, in order to study a homogeneous cohort. After quality filtering, microbiome results were available for 79 children for bacteriome and 53 for virome; and transcriptome profiles for 36 children. Profiles dominated by the genera *Haemophilus*, *Moraxella* and *Streptococcus* were the most prevalent, but not significantly associated with severity. 77% of patients had one or several co-infections with a respiratory virus (the most frequent are *Picornaviridae*, *Coronaviridae*, *Orthomyxoviridae*). Expression of immune and inflammatory cytokine genes was not associated with bronchiolitis severity or viral co-infections in host

transcriptome analysis. In this cohort, the *Anelloviridae* were the most frequent eukaryotic virus family (in 66% of patients), with the *TTMV* genus in majority. Some species, such as *TTMV3*, 6 and 9, were associated with the severity of bronchiolitis.

This prevalence of *TTMV* was validated in a second cohort of children (median age: 12 months) hospitalized for ARI of unknown etiology; this genus accounted for 87.1% of the reads of *Anelloviridae* found in the 16 samples.

Conclusion:

Our data underline the high rates of viral co-infections in children suffering from ARI, and confirm the predominant presence of profiles dominated by *Haemophilus*, *Streptococcus* and *Moraxella* in a symptomatic paediatric population identified at the hospital. We were unable to assess significant associations between microbiome profiles and disease severity. Our results highlighted a high prevalence of *TTMV* in respiratory samples from young children with ARI. Larger-scale studies are needed to identify the interactions between viral and bacterial communities within the respiratory microbiome and their impact on host transcriptomic responses during ARI in children, and to explore the role of *TTMV* in childhood respiratory disease.

Remerciements

Je me suis lancée dans ce projet de thèse en le prenant comme une opportunité unique d'évoluer dans mon domaine et avec un peu de chance d'y apporter ma contribution. Bon ok, j'avoue, j'avais aussi très envie de me faire appeler « Docteur » par tout mon entourage pendant au moins 1 mois. Quelques années plus tard, je termine enfin la rédaction de ce manuscrit, consciente d'avoir tiré de cette expérience bien plus que ce que je pouvais en espérer. L'impact d'une thèse peut être évalué en regardant les résultats et innovations qu'elle présente mais aussi en comparant le doctorant qui débute et celui qui soutient. Pour ma part, je dois cette évolution scientifique et personnelle à chacune des personnes suivantes, envers qui je souhaite exprimer mes meilleurs sentiments et surtout une profonde reconnaissance.

Aux membres de mon jury :

Au professeur Sophie Jarraud,

Je vous remercie infiniment de l'honneur que vous me faites en acceptant de présider le jury de cette thèse. Soyez assurée de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Aux professeurs Cécile Henquell et Nicolas Leveque,

Je tiens sincèrement à vous remercier d'avoir accepté de lire et de juger ce travail.

Au Dr Maxime Pichon,

Un grand merci pour la participation à ce jury de thèse.

À mes directrices de thèses,

Je tiens également à remercier mes directrices de thèse, pour la confiance qu'elles ont placée en moi et leur suivi tout au long de ce projet.

Je tiens à remercier en tout premier lieu, **Laurence**, car grâce à toi, j'ai eu l'opportunité de réaliser une thèse, une expérience très précieuse dans ma vie. Travailler à tes côtés m'a été extrêmement bénéfique. Merci pour ton aide et ta patience tout au long de cette thèse.

Je tiens également à remercier **Claire**, pour son soutien et ses conseils constructifs et bienveillants tout au long de cette thèse. Enfin, je voudrais remercier profondément **Karen**, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de l'unité mixte Biomérieux-HCL, ainsi que pour son soutien et ses encouragements chaleureux.

Aux membres de mon comité de suivi de thèse,

Un grand merci à **Fabienne Venet**, **Valérie Cheynet** et **Vincent Navratil** pour leur soutien scientifique tout au long de ce doctorat. Un clin d'œil particulier à **Valérie**, un grand merci pour ta gentillesse et ton aide lors de mon passage à Lyon Sud. Et à **Vincent**, pour les cours de bioinfo au PRABI et dieu sait que ce n'était pas gagné ;)

Au labex Ecofect et à Biomérieux,

Ce travail n'aurait pas été possible sans les aides financières apportées par le labex Ecofect et par Biomérieux.

À Fabien et Thierry,

Je pense fort aux personnes qui ont contribué, il y a plus ou moins longtemps, à m'orienter vers le chemin que je parcours aujourd'hui. Merci de m'avoir poussée à prendre un peu confiance en moi.

Au Professeur Bruno Lina,

Je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre unité de recherche et ainsi de m'avoir donnée l'opportunité de découvrir le monde de la virologie et du séquençage.

.....

Je tiens également à témoigner ma plus grande reconnaissance à toutes les personnes ayant contribué à la réalisation de ce travail :

Aux différents partenaires du projet ViBRAFLU (Biomérieux, PRABI et LBBE),

La collaboration entre nos laboratoires a permis de réaliser une partie des travaux de cette thèse. Votre aide dans l'interprétation des données obtenues m'a été précieuse. Un grand merci à Mad-Hélénie pour sa disponibilité et sa patience à toute épreuve !

Aux membres du CNR EV,

C'est avec vous que mon parcours en virologie à commencer. Notre petit EV68 m'aura bien occupé pendant mes deux années de Master. Un grand merci à **Isabelle** pour tous vos conseils et votre oreille attentive depuis mon arrivée dans ce laboratoire. Un petit clin d'œil à **Delphine**, pour toutes ces heures passées à me former sur toutes les manips et à papoter en analysant quelques séquences !

Aux membres du CNR VI,

Pour cette thèse je ne suis pas partie bien loin, le CNR d'à côté ! Un grand merci à tous pour votre aide et vos conseils techniques.

À tout le personnel du laboratoire de la Croix Rousse et du CRB, biologistes, internes et techniciens,

Vous m'avez permis d'accomplir cette thèse dans un environnement de travail toujours stimulant et propice à la bonne humeur. J'ai une forte pensée envers chacun d'entre vous. Un très grand merci à **Florence Morphin-Sherpa, Vanessa Escuret, Geneviève Billaud, Alexandre Gaymard**, et **Antonin Bal** pour le temps que vous m'avez accordé. Merci également à **Christophe**, pour tous tes conseils tout au long de ma thèse. **À Maxime**, pour le temps que tu m'as consacrée malgré ta charge professionnelle, merci pour ton aide et le partage de tes expériences. **À Bruno**, merci pour ton aide et ton oreille attentive depuis le début de cette thèse. **À Hadrien**, merci pour ton aide en bio-info, les petites blagues, et les sessions karaokés sur des musiques improbables « Du poisson, de la raie, du cabillaud... ». Merci pour les cookies aussi... On sous-estime trop souvent l'importance des cookies ^^

Au Dr Dominique Ploin,

Avec une classification des patients qui nous a parfois donné du fil à retordre, nous sommes quand même venus à bout de la relecture des nombreux dossiers cliniques, toujours dans la bonne humeur et avec Angèle en fond sonore. Un grand merci pour votre aide.

À tout le personnel du laboratoire commun de recherche Biomérieux-HCL,

Un grand merci à toute l'équipe pour votre accueil chaleureux au sein de l'unité mixte. Merci à **Sophie**, pour ton soutien et ta bonne humeur communicative. Merci à **Gaëlle, François** et **Guy** pour votre aide en bio-informatique et Biostat.

Aux responsables de la plateforme NGS de l'EST,

Merci pour votre aide et surtout pour votre patience lors du lancement de mon premier run, riche en émotions.

.....

Par la suite, je tiens à remercier les personnes qui, de près ou de loin, ont façonné ma vie et m'ont permis d'arriver ici aujourd'hui. Je vous ai parfois un peu délaissés lors de la rédaction de cette thèse mais vos attentions et encouragements m'ont aidée lors de cette dernière ligne droite.

À mes parents,

J'adresse tout mon amour à mes parents pour leur indéfectible soutien. Vous m'avez toujours poussée à aller plus loin et à tenir bon. Cette ténacité, c'est à vous que je la dois.

À ma petite sœur, Laura,

Toujours disponible et toujours là dans les mauvais moments mais aussi et surtout dans les meilleurs, je sais que je pourrai toujours compter sur toi. Tu remplis chaque jour l'ensemble des missions qui sont celles d'une petite sœur. Tes encouragements, tes rires et ta bonne humeur m'ont beaucoup aidé. Il est évident que je te souhaite le meilleur pour tous les projets que tu entreprends. J'ai également une pensée pour **Maxence**, comme quoi la mécanique des fluides et la loi de Bernoulli ça tissent des liens !

À mon petit Aloïs, Alolo pour les intimes... (Désolé Max mais ça y'est ce surnom est publié haha). Merci de faire de moi la tata la plus heureuse du monde mon petit classard ;) Tu vas bientôt découvrir la joie d'être grand frère et je suis certaine que tu seras parfait pour ce rôle. Un nouveau compagnon pour jouer et faire des bêtises, tu verras c'est super !

À ma Mamie d'Oloron,

Je te remercie d'avoir cru en moi tout au long de ces études. J'espère que tu es fière de moi.

À ma marraine, Claudine,

Merci pour ton amour et tes encouragements qui m'ont permis de ne jamais abandonner et garder le moral. Je te souhaite tout le bonheur du monde avec Thierry et bon courage pour tes projets futurs par milliers^^

À mes petits cousins, cousins et cousines de cœur,

Vous êtes des rocs sur lesquels j'ai pu m'appuyer, merci pour tous ces moments partagés.

À Christelle et Roland,

Merci d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir soutenue. Merci pour votre gentillesse et votre présence à nos côtés lors des coups durs (et lors des bons moments aussi !).

À mon Papy d'Oloron, ma Mamy et mon papy de Mende,

Vous n'êtes malheureusement plus à mes côtés aujourd'hui mais j'espère que vous êtes fiers de moi et que vous continuez à veiller sur moi de là où vous êtes. Je vous aime.

.....
« Ce n'est pas tant l'intervention de nos amis qui nous aide mais le fait de savoir que nous pouvons toujours compter sur eux. » Epicure.

À mes collègues de laboratoire qui sont devenus de bons amis,

Un grand merci à **Fanny, Solange, Céline et Pascaline**, présentes pour moi sur tous les fronts. Je suis heureuse d'avoir partagé ces moments avec vous. Un grand merci à **Rémi F, Arthur et Dominique**, mes acolytes de foot et pronostics, on n'était pas toujours d'accord (Allez Cornet !!) mais tous ces débats auront bien animé mes repas. Et comme dirait Dom « Allez l'OL » ^^ ! Je tiens également à remercier **Rémi B**, la réalisation de nos thèses respectives nous aura un peu éloignés ces derniers temps mais je n'oublie pas les fou rires et pintes de bières partagées. Et à mon binôme « petit quinquin », **Quentin**, tellement heureuse que tu sois revenu au labo pour ces derniers mois de thèse. Des fou-rires, des domino pizza à 15h parce que « j'ai pas fini ma purif », des autocollants pour décorer les PC, des apéros, mais aussi et surtout beaucoup de sérieux ! J'espère sincèrement que j'aurai l'occasion de retravailler avec toi. Merci à **Chloé**, pour tes encouragements tout au long de ma thèse et pendant les cours de sport quand la motivation n'était pas au rendez-vous ^^ À Dr **Charlotte**, pour ton soutien quotidien et ton oreille attentive tout au long de cette thèse. À mes deux expatriés espagnols, **Pablo y Sara**, merci pour vos conseils, et toutes ces tapas partagées. Vous m'avez aidée à garder le cap dans les moments de doute et de stress. Spécial dédicace à Sara pour le partage de sa recette des croquetaas. Bien manger pour bien rédiger :)

À mes amis de toujours, mes conscrits,

Mes vieux copains... Je ne peux pas me passer de vous ! Là depuis le début, vous m'avez toujours soutenu. Je ne serai jamais arrivée jusqu'ici sans vos encouragements et votre soutien continu. Vous avez été mes piliers, mes repères durant ce long chemin, parfois épineux mais parsemé de rires, de déconnades, de rêves et d'aventures plus folles les unes que les autres. Un énorme, et même un gigantesque merci à vous tous : **Thomas, Florian, Tiffany, Thibault, Charlène, Christophe, Sophie, Romain, Jérémy, Jean Noël, Victor et Virginie**. Impossible de ne pas vous dire un petit mot en plus, à **Thomas**, ma besta ;) Alors toi tu en as du mérite, depuis le temps que tu me supportes ! Merci pour ton amitié, pour nos moments passés ensemble qui rendent la vie belle et simple, merci pour ton soutien... **À Vivi**, Ma number 2 ^^ Merci pour ton humour éclatant et pour tous ces fous-rires qui ont rythmé mes soirées et weekends. Big Up à **Martine** pour tous ces Spritz partagés !

À Solène,

Ma copine de vélo, ma vieille moule... Merci pour ta présence et tes encouragements, en particulier dans la dernière ligne droite. Cette thèse achevée j'espère que nous aurons plus de temps pour nos soirées potins^^ Je te souhaite tout le bonheur du monde avec **Quentin** dans votre belle maison rénovée !

Aux Farinois,

Je ne pourrai pas tous vous citer ici mais vous vous reconnaitrez ! Les classards de la 1, les copains de la 2 et de la 3, les supers voisins qui auront supportés les quelques soirées d'été arrosées et bruyantes, pour décompresser...

Aux copains du Lycée,

Gaëlle, Merci pour cette coloc qui a été au top ! Merci pour tes petits plats (Eh oui maintenant je mange des courgettes), merci de savoir si oui ou non je peux manger ce truc périmé depuis 4 jours, merci pour ta bonne humeur ! **Elsa** et **Sarah**, merci à vous pour toutes ces bonnes doses d'endorphines depuis toutes ces années. **La team S4**, 11 ans après la terminale et on ne s'est pas perdu de vue... qui l'aurait cru ? Pas moi en tout cas ^^ Alors merci de m'avoir donné tort...

À Audrey,

Ma numéro uno! Depuis cette rencontre sur les bancs de la FAC tu as toujours été là pour moi. Mon acolyte de partiels (foirés), de soirées du jeudi et de tous les autres jours de la semaine tant qu'il y a du Pineau des Charentes ! Merci de m'avoir toujours soutenue, cette aventure terminée, j'ai hâte de te raconter mes futures nouvelles angoisses pour que tu les fasses disparaître comme toujours! Être la marraine de ta petite **Noélie** est pour moi une immense fierté et je ferai tout pour la soutenir car avec des parents fadas comme toi et **Romain**, du soutien c'est pas de refus^^. Bien évidemment merci à **Patachon**, pour sa dent de maquereau et son testicule non descendu, et surtout pour les fous rires qu'ils ont déclenchés.

À la team Mont de Marsan,

J'y suis parti à reculons mais uniquement parce que je n'avais aucune idée des personnes formidables et des liens solides que j'allais créer grâce à cette licence à l'autre bout de la France. Que de bons souvenirs, s'il y a une année d'étude que je n'oublierais jamais c'est bien elle. Alors merci, merci pour tous ces moments partagés durant ces années : des cours de génétique de Bertrand au cours sur le maïs de Coussy, de Porto à Prague, des soirées crêpes just-dance dans mon appart aux férias de la madeleine (notre rendez-vous annuel de retrouvailles arrosés et toujours source de nouveaux délires). J'espère pouvoir partager encore tant d'autres choses avec vous. À la Team Princesse : **Aurélie, Lucile & Mathilde** et à la Team Kiki : **Clément & Kévin**, merci pour vos encouragements et vos messages qui m'ont été un carburant précieux. Hâte de tous vous retrouver.

À mes rencontres du Master SSIB,

Laurie, merci pour tous ces moments partagés avant et pendant notre coloc'. **Lisa**, ces 3 dernières années nous nous sommes beaucoup rapprochées. Présente l'une pour l'autre dans les moments difficiles, je suis heureuse de voir qu'aujourd'hui nous avons toutes les deux pu rebondir. Je te souhaite un bonheur infini avec ta nouvelle famille.

À Anthony Lopes,

Merci à toi mon Lolo pour tous tes arrêts magiques ! Ne change rien t'es le meilleur !

.....

À Victorien,

Pour ton écoute, et surtout pour ta capacité à trouver le positif en tous. Je suis heureuse de partager ta vie. À nos projets infinis... Je t'aime plus que 3x1000 !

.....

Merci à tous, cette thèse finie j'espère qu'on aura le temps de se voir plus souvent, et surtout qu'on aura l'occasion de fêter ça dignement.

Merci pour tout !

.....

À tous ceux que je n'ai pas cité, qu'ils ne se sentent pas oubliés... Un grand MERCI à tous !

Ce travail a été réalisé au sein de : l'Institut des Agents infectieux de la Croix Rousse et du laboratoire commun de recherche HCL-Biomérieux à Lyon Sud.

Avec le soutien financier de : Biomérieux et du LABEX ECOFECT (ANR-11-LABX-0048) de l'Université de Lyon, dans le cadre du programme « Investissements d'Avenir » (ANR-11-IDEX-0007) porté par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR).

Table des matières

Résumé	2
Abstract	4
Remerciements	6
Table des matières	14
Liste des Figures	20
Liste des Tableaux	23
Liste des abréviations	25
Partie A : Etude Bibliographique	29
Chapitre 1 : Les infections respiratoires aiguës.....	29
1 Importance des IRA en santé publique	30
2 Facteurs influençant la prévalence et la gravité des IRA chez les enfants de moins de 5 ans.....	30
2.1 Facteur lié à l'agent pathogène.....	31
2.2 Facteurs liés à l'hôte.....	32
2.3 Facteurs liés à l'environnement	33
3 Diagnostic	33
4 Traitement et Prévention	34
Chapitre 2 : Le Virus Respiratoire Syncytial.....	40
1 Le virus.....	40
1.1 Historique	40
1.2 Taxonomie	40
1.3 Génome	41
1.4 Structure.....	42
1.5 Cycle viral.....	44
2 L'infection par le VRS.....	46
2.1 Epidémiologie	46
2.2 Physiopathologie	47

2.3	Manifestations cliniques	48
2.4	Conséquence à moyen et long terme	49
2.5	Traitements	49
2.6	Prévention	50
3	La réponse immunitaire anti-VRS.....	51
3.1	Immunité Innée	52
3.2	L'immunité adaptative	53
3.3	Primo-infection et réinfection chez les nourrissons.....	54
4	Sévérité de la maladie	55
4.1	Facteurs favorisant la survenue de bronchiolite.....	55
4.2	Critères d'hospitalisation des bronchiolites.....	57
4.3	Classification des patients et score de gravité	58
4.4	Biomarqueurs associés à la sévérité des infections à VRS	60
4.4.1	Polymorphismes génétiques associés à la sévérité.....	60
4.4.2	Réponse transcriptomique associée à la sévérité	62
	Chapitre 3 : Microbiome respiratoire.....	66
1	Généralités	66
2	Méthodes d'étude du microbiome respiratoire	68
2.1	Metabarcoding	68
2.2	Métagénomique.....	70
2.3	Limites des études du microbiome respiratoire	71
3	Bactériome respiratoire	73
3.1	Généralités	73
3.2	Acquisition du bactériome	74
3.3	Développement du microbiome	75
3.4	Caractérisation du bactériome chez un individu sain	78
3.5	Rôle.....	83
3.6	Impact du bactériome sur l'évolution des IRA virales.....	85

3.7	Impact clinique du bactériome respiratoire.....	89
3.8	Impact du bactériome digestif sur les IRA.....	92
4	Virome respiratoire	95
4.1	Généralités	95
4.2	Caractérisation du virome respiratoire chez un individu sain.....	95
4.3	Rôle du virome chez l'individu sain	100
4.4	Impact du virome sur l'évolution des IRA virales.....	102
5	Mycobiome.....	104
6	Réponse immunitaire et microbiome pulmonaire	106
7	Interactions trans-règles	107
7.1	Interactions Virome/Bactériome respiratoire.....	107
7.2	Interaction Virus/Mycobiome respiratoire	109
7.3	Interaction Virus/phageome respiratoire	109
7.4	Interaction Bactériome/Mycobiome.....	110
8	Conclusion	111
	Chapitre 4 Projet VIBRAFLU.....	112
1	Contexte et hypothèses.....	112
2	Objectifs de la thèse	113
	Partie B : Résultats	115
	Chapitre 1 : Cohorte VIBRAFLU	115
1	Méthodes	115
1.1	Type d'étude.....	115
1.2	Echantillons et population.....	115
1.3	Diagnostic virologique	116
1.4	Collecte des données cliniques et variables recueillies.....	116
1.5	Classification Clinique.....	117
1.6	Ethique	117

2	Résultats	118
2.1	Caractéristiques démographiques de la cohorte	118
2.2	Présentation clinique à l'admission et évolution clinique.....	119
2.3	Prévalence des différents virus respiratoires.....	120
3	Discussion/Conclusion.....	122
Chapitre 2 : Caractérisation du virome respiratoire chez l'enfant.....		124
1.	Choix du type d'extracteur d'acides nucléiques	124
1.1	Introduction.....	124
1.2	Article publié	125
2.	Caractérisation du virome des patients de la cohorte ViBraFlu.....	143
2.1	Objectif	143
2.2	Matériels et Méthodes.....	143
2.2.1	Populations étudiées au sein de la cohorte Vibraflu.....	143
2.2.2	Séquençage du virome	143
2.2.3	Analyses Bio-informatiques.....	144
2.2.4	Génération des matrices pour l'analyse statistique.....	146
2.2.5	Analyses statistiques	147
2.3	Résultats	147
2.3.1	Caractéristiques cliniques et démographiques de la cohorte.....	147
2.3.2	Analyse descriptive des données de virome	149
2.3.3	Analyse détaillée pour quelques familles du virome	155
2.3.4	Analyse des coinfections	160
2.3.5	Analyse des groupes O ₂ vs sans O ₂	163
2.3.6.	Séquence VRS.....	167
2.4	Discussion	171
2.4.1	Caractéristiques cliniques et démographiques de la cohorte.....	171
2.4.2	Hétérogénéité du virome respiratoire chez l'enfant.....	172
2.4.3	Association entre sévérité de la bronchiolite et composition du virome respiratoire	173

2.4.4. Coinfections.....	174
2.4.5 Analyse détaillée pour quelques familles du virome	176
2.4.6 Analyse des séquences VRS.....	180
2.4.7 Limite de l'étude.....	181
2.5 Conclusion	183
3 Analyse des <i>Anelloviridae</i> dans les voies respiratoires d'enfants atteints d'IRA sans étiologie retrouvée ou à VRS (URTI seulement).....	184
3.1 Introduction.....	184
3.2 Article publié	185
4 Discussion - Conclusion Générale Virome	193
Chapitre 3 : Caractérisation du bactériome respiratoire chez l'enfant.....	196
1 Introduction.....	196
2 Matériels et Méthodes	196
2.1 Population étudiée	196
2.2 Séquençage bactériome.....	196
2.3 Analyse bio-informatique et statistique.....	197
3 Résultats.....	199
3.1 Caractéristiques Cliniques et démographiques de la cohorte	199
3.2 Analyse descriptive des données de bactériome	200
3.2.1 Analyse compositionnelle au niveau taxonomique : Genre.....	200
3.2.2 Analyse compositionnelle au niveau taxonomique : Espèce	201
3.3 Analyse de diversité	202
3.4 Analyse compositionnelle en fonction des critères cliniques et démographiques.....	206
3.5 Analyse compositionnelle en fonction des groupes URTI/LRTI.....	207
4 Discussion	210
5 Conclusion	214
Chapitre 4 : Analyse préliminaire du transcriptome de l'hôte.....	215
1. Introduction.....	215

2. Matériels et Méthodes	215
2.1. Population étudiée	215
2.2. Séquençage transcriptome.....	215
2.3. Analyse bio-informatique et statistique.....	216
3. Résultats des analyses préliminaires du transcriptome de l'hôte	217
3.1 Analyse préliminaire entre les groupes URTI et LRTI	217
3.2 Analyse préliminaire entre les patients avec ou sans supplémentation en O ₂	221
3.3 Analyse préliminaire entre les patients avec ou sans coinfection	225
4. Discussion	229
5. Conclusion	232
Partie C : Conclusion Générale	233
Annexes : Autres travaux réalisés pendant la thèse	240
Annexe 1	240
Annexe 2	241
Annexe 3	242
Bibliographie	244

Liste des Figures

Figure 1 Vue d'ensemble des principaux organes qui composent le système respiratoire.....	29
Figure 2 Représentation schématique du génome du VRS.....	42
Figure 3 Représentation schématique de l'organisation de la particule virale du VRS	42
Figure 4 Schéma du cycle de réplication virale du VRS	44
Figure 5 Schéma montrant les similarités des séquences d'ARNr 16S entre plusieurs bactéries.....	69
Figure 6 Physiologie et diversité des communautés bactériennes du système respiratoire.....	76
Figure 7 Facteurs déterminants de l'écologie du microbiote pulmonaire humain.....	77
Figure 8 Facteurs liés à l'hôte et à l'environnement qui influencent le microbiote respiratoire.....	81
Figure 9 Heatmap montrant le profil du virome respiratoire d'enfants en bonne santé	98
Figure 10 Répartition du nombre de cas par semaine pour chaque virus.	121
Figure 11 Proportion de chaque famille virale parmi les 53 patients inclus.	150
Figure 12 Histogramme représentant la proportion de présence de chaque famille virale parmi les 53 patients inclus en fonction des groupes URTI (bleu) ou LRTI (rouge).	151
Figure 13 Boxplots représentant l'abondance de chaque famille virale en fonction des groupes URTI (bleu) ou LRTI (rouge) réalisés à partir de la matrice ALR.	152
Figure 14 Heatmaps générés à partir de la matrice binaire (Présence/Absence) des familles virales.	153
Figure 15 Heatmaps générés à partir de la matrice d'abondance des familles virales (exprimée en ALR).....	154
Figure 16 Boxplot représentant la distribution des ALR des différents genres d'Anelloviridae en fonction des groupes URTI (bleu) ou LRTI (rouge) réalisés à partir de la matrice ALR.	156
Figure 17 Histogramme représentant la proportion de présence des différentes espèces d'Anelloviridae parmi les 53 patients inclus en fonction des groupes URTI (bleu) ou LRTI (rouge). ...	156
Figure 18 Boxplot représentant la distribution des ALR des différentes espèces d'Anelloviridae en fonction des groupes URTI (bleu) ou LRTI (rouge) réalisés à partir de la matrice ALR.	157
Figure 19 Heatmaps générés à partir de la matrice binaire (A) et de la matrice ALR (B).	158
Figure 20 Boxplot représentant la distribution des ALR des Picornaviridae en fonction des groupes URTI (bleu) ou LRTI (rouge) réalisés à partir de la matrice ALR.	159

Figure 21 Histogramme représentant la proportion de présence de chaque famille virale parmi les 36 patients de la matrice ALR en fonction des groupes sans supplémentation en O2 (bleu) ou avec supplémentation en O2 (rouge), pour les virus respiratoires humain (A).....	165
Figure 22 Arbres phylogéniques des séquences génome complet de VRS-A (A) et de VRS-B (B)	168
Figure 23 Arbre phylogénique des séquences du gène G des VRS-A.....	169
Figure 24 Arbre phylogénique des séquences du gène G des VRS-B.....	170
Figure 25 Représentation de l'alpha diversité globale (estimée par observed OTU, chao 1 et les indices de diversité de Shannon et Simpsons) entre les groupes de nourrissons ayant reçu une alimentation avec du lait artificiel et ceux avec une alimentation mixte (maternel + artificiel).	204
Figure 26 Représentation de l'alpha diversité globale (estimée par observed OTU, chao 1 et l'indice de diversité de Shannon) entre les groupes de nourrissons ayant reçu une alimentation avec du lait maternel et ceux avec une alimentation mixte (maternel + artificiel).	205
Figure 27 Représentation de l'alpha diversité calculée avec l'indice de Shannon entre les groupes de patients URTI et LRTI.	205
Figure 28 Représentation graphique des moyennes des abondances relatives des OTUs retrouvés en majorité en fonction du groupe LRTI ou URTI à différent niveau taxonomique en A- au niveau du genre et en B- au niveau de l'espèce.	207
Figure 29 Heatmap des OTUs retrouvés en majorité en fonction du groupe LRTI ou URTI.	208
Figure 30 Volcano plot des gènes différentiellement exprimés chez les enfants infectés par le VRS des groupes URTI et LRTI.	218
Figure 31 Heatmap des gènes exprimés différemment entre les groupes URTI et LRTI de manière significative.....	219
Figure 32 Heatmap des gènes associés aux voies de l'immunité en fonction des groupes URTI et LRTI.	220
Figure 33 Volcano plot des gènes différentiellement exprimés chez les enfants infectés par le VRS des groupes ayant reçu ou non une supplémentation en O2.	222
Figure 34 Heatmap des gènes exprimés différemment entre les groupes ayant reçu ou non une supplémentation en O2 de manière significative.	223
Figure 35 Heatmap des gènes associés aux voies de l'immunité en fonction des groupes ayant reçu ou non une supplémentation en O2.	224
Figure 36 Volcano plot des gènes différentiellement exprimés chez les enfants infectés par le VRS des groupes avec ou sans coinfection.	226
Figure 37 Heatmap des gènes exprimés différemment groupes de manière significative entre les patients avec ou sans coinfection.	227

Figure 38 Heatmap des gènes associés aux voies de l'immunité en fonction des groupes avec ou sans
coinfection..... 228

Figure 39 Diagramme de Venn indiquant le nombre d'échantillons interprétables par axe d'étude. 236

Liste des Tableaux

Tableau 1 Tableau récapitulatif des virus respiratoires responsables d'IRA chez l'enfant de moins de 5 ans	35
Tableau 2 Les différentes protéines du VRS.....	43
Tableau 3 Facteurs favorisant la survenue et/ou la sévérité de la bronchiolite	55
Tableau 4 Synthèse des scores de gravité les plus utilisés pour la classification des patients atteints de VRS.....	59
Tableau 5 Liste des polymorphismes génétiques associés à une prédisposition à une maladie grave lié à l'infection par le VRS chez l'enfant	60
Tableau 6 Liste non exhaustive des cytokines, chimiokines et autres molécules immunitaires associées à la sévérité de la maladie à VRS dans des échantillons respiratoires provenant d'enfants de moins de 5 ans.....	63
Tableau 7 Espèces bactériennes retrouvées en majorité dans chaque compartiment du tractus respiratoire	79
Tableau 8 Résumé des profils protecteurs ou associés aux IRA.....	86
Tableau 9 Principaux virus retrouvés au sein du virome extracellulaire humain dans le tractus respiratoire chez un individu sain	97
Tableau 10 Caractéristiques des patients inclus dans la cohorte ViBraFlu	119
Tableau 11 Numéro d'accèsion des séquences de références utilisées pour les VRS-A et les VRS-B145	
Tableau 12 Caractéristiques cliniques et démographiques des 53 patients inclus pour l'étude du virome respiratoire.....	148
Tableau 13 Liste des familles virales retrouvées dans l'étude du virome chez les patients de la cohorte Vibraflu.	149
Tableau 14 Caractéristiques cliniques et démographiques des 36 patients de la matrice ALR en fonction de la variable « supplémentation en O2 ».	164
Tableau 15 Caractéristiques cliniques et démographiques des 79 patients inclus pour l'étude du bactériome respiratoire.	200
Tableau 16 Valeurs médianes (minimales -maximales) et moyennes des abondances relatives (en %) des principaux genres chez les 79 patients étudiés.	201
Tableau 17 Valeurs médianes (minimales -maximales) et moyennes des abondances relatives (en %) des principales espèces chez les 79 patients étudiés.	202
Tableau 18 Tableau récapitulatif des p-values associées à chaque indice de diversité pour chaque variable étudiée.....	203

Tableau 19 Effectifs et pourcentages des profils majoritaires en fonction des groupes URTI et LRTI.	209
Tableau 20 Tableur des gènes exprimés différemment entre les groupes URTI et LRTI ainsi que leur Log2FC, p-value ajustée et statut (sous ou surexprimé).	217
Tableau 21 Tableur des gènes exprimés différemment entre les groupes ayant reçu ou non une supplémentation en O2 ainsi que leur Log2FC, p-value ajustée et statut (sous ou surexprimé).	221
Tableau 22 Tableur des gènes exprimés différemment entre les groupes de patients avec ou sans coinfection ainsi que leur Log2FC, p-value ajustée et statut (sous ou surexprimé).	225

Liste des abréviations

aa acides aminés
ACOD1 Aconitate Decarboxylase 1
ADN Acide Désoxyribonucléique
ADNc ADN complémentaire
AdV adénovirus
AE alimentation entérale
ANP aspirations nasopharyngée
ARN Acide Ribonucléique
ARNm ARN messenger
ARNr ARN ribosomique
ARNv ARN viral
BPCO Bronchopneumopathie chronique obstructive
CC10 Clara cell 10
CCA Chimpanzee Coryza Agent
CCL C-C motif chemokine ligand
CCR C-C motif chemokine receptor
CD cluster of differentiation
CLR C-type lectin Receptors
CMV cytomégalovirus
CNR2 Cannabinoid Receptor 2
CoV coronavirus
Ct Cycle threshold
CXCL C-X-C Motif Chemokine Ligand
CXCR C-X-C motif chemokine receptor
DAT desaminotyrosine
db double brin
EBV virus Epstein-Barr
EGF-R Epidermal Growth Factor Receptor
EOPS exempt d'organisme pathogène spécifique
EV entérovirus
F protéine de fusion
FCER1A Fc Fragment Of IgE Receptor 1a
FGF- β fibroblast growth factor
FR fréquence respiratoire
FR Fréquence respiratoire
G protéine d'attachement
GBV-C virus GB virus type C
G-CSF Granulocyte Colony-Stimulating Factor
H. influenzae Haemophilus influenzae

HAS Haute Autorité de Santé
hBoV bocavirus humains
HCL Hospices Civils de Lyon
HCoV Human Coronavirus
HFME Hôpital Femme Mère Enfant
HGF Hepatocyte growth factor
HGV virus de l'hépatite G
HMP Human microbiome project
hMPV métapneumovirus
HR humidité relative
ICAM Intercellular Adhesion Molecule
ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses
IFI6 Interferon Alpha Inducible Protein
IFIT Interferon Induced Protein With Tetratricopeptide Repeats
IFITM Interferon-induced transmembrane proteins
IFN interferon
IFNA Interferon Alpha
IFNL Interferon Lambda
Ig immunoglobulines
IL interleukine
IL1RL1 Interleukin 1 Receptor Like 1
IL-R Interleukine Receptor
IP Interferon gamma-induced Protein
IRA Infection Respiratoire Aiguë
ISG interferon stimulated genes
ITS Internal Transcribed Spacer
kb kilobase
Kg kilogramme
L polymérase
LBA Lavage broncho-alvéolaire
LPS lipopolysaccharide
LRT Lower Respiratory Tract
LRTI Lower Respiratory Tract Infection
M protéine de matrice
MAVS mitochondrial antiviral signaling
MCP-1 Monocyte Chemoattractant Protein 1
MDA5 melanoma differentiation-associated protein 5
MERS Middle East respiratory syndrome
MetaHIT Metagenomics of the Human Intestinal Tract
MIP Macrophage Inflammatory Protein
MMP3 Matrix Metalloproteinase 3

MX1 MX Dynamin Like GTPase 1
N nucléoprotéine
na non assigné
N-ARNv Nucléoprotéine-ARN viral
NG nez-gorge
NGS Next generation sequencing
NK lymphocytes Natural Killer
NOS2 Nitric Oxide Synthase 2
NS1/2 protéines non structurales 1 et 2
nt nucléotides
OMA otites moyennes aiguës
OMS Organisation Mondiale de la Santé
OPRM1 Opioid Receptor Mu 1
OR odd ratio
P phosphoprotéine
pO2 pressions partielles de l'oxygène
PAMPs Pathogen-Associated Molecular Patterns
pCO2 pressions partielles du dioxyde de carbone
PCR Polymerase Chain Reaction
PDGF Platelet derived growth factor
PIV Parainfluenzavirus
PPTA pré-pro-tachykinine A
PRR Pattern Recognition Receptor
RACS Respiratory Assessment Clinical Score
RANTES Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted
RDAI Respiratory Distress Assessment Index
RIG-1 retinoic acid-inducible gene I
RNPs ribonucléoprotéines
RT-PCR Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction
S. aureus Staphylococcus aureus
S. pneumoniae Streptococcus pneumoniae
SA semaines d'aménorrhée
SARS Severe acute respiratory syndrome
sb simple brin
SH protéine small hydrophobic
SP-A2/B/C/D Surfactant Protein A2/B/C/D
SpO₂ saturation pulsée en oxygène
SRAS Syndrome Respiratoire Aigu Sévère
TGFB1 Transforming Growth Factor Beta 1
Th lymphocytes T helper
TIMP Tissue Inhibitor of Metalloproteinase

TLR Toll-Like-Receptor
TNF Tumor Necrosis Factor
TRAIL Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand
TTMDV Torque Teno Midi Virus
TTMV Torque Teno Mini Virus
TTV Torque Teno Virus
UHCD unité d'hospitalisation de courte durée
URT Upper Respiratory Tract
URTI Upper Respiratory Tract Infection
VCAM-1 Vascular cell adhesion protein 1
VDR Vitamin D Receptor
VRS Virus Respiratoire Syncytial
WHO World Health Organization

Partie A : Etude Bibliographique

Chapitre 1 : Les infections respiratoires aiguës

On appelle Infection Respiratoire Aiguë (IRA) toute infection des voies respiratoires caractérisée par une apparition brutale, une évolution rapide et sur une courte durée. Les IRA peuvent être classées en 2 catégories en fonction de la partie du tractus respiratoire qui est infectée (**Figure 1**) : les infections des voies respiratoires supérieures (*Upper Respiratory Tract Infection*, URTI) qui comprennent les rhinopharyngites, pharyngites, angines, sinusites et otites ; et les infections des voies respiratoires inférieures (*Lower Respiratory Tract Infection*, LRTI) qui comprennent les bronchites, bronchiolites et pneumopathies infectieuses¹. Ces dernières peuvent être associées à des taux de mortalité élevés en particulier chez les enfants de moins de 5 ans^{2,3}, les personnes âgées⁴, les femmes enceintes⁶ ainsi que les personnes immunodéprimées^{5,6} ou atteintes d'une maladie chronique⁷.

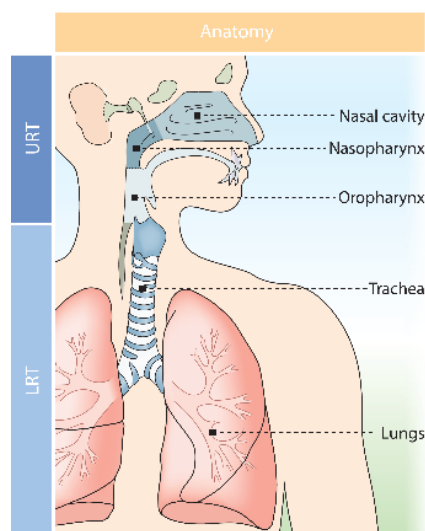


Figure 1 Vue d'ensemble des principaux organes qui composent le système respiratoire

Les voies respiratoires supérieures (URT) sont constituées de la cavité nasale, du nasopharynx et de l'oropharynx. Les voies respiratoires inférieures (LRT) sont constituées de la trachée et des poumons (bronches, bronchioles et alvéoles). Figure extraite de Steenhuijsen Piters et al., 2020⁸.

Abréviations : URT : Upper Respiratory Tract. LRT : Lower Respiratory Tract.

La large présentation clinique des IRA s'explique notamment par un large panel de pathogènes respiratoires et par des différences d'interactions entre le pathogène respiratoire, l'hôte infecté et son environnement⁹. Un aperçu des pathogènes respiratoires viraux sera présenté dans ce chapitre.

1 Importance des IRA en santé publique

Avant même la pandémie de Covid-19 actuelle, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) avait identifié les IRA comme la principale cause de morbidité et de mortalité dues aux maladies infectieuses dans le monde¹⁰. En effet, près de 4 millions de personnes en meurent chaque année, en particulier des nourrissons, des enfants et des personnes âgées notamment dans les pays à revenu faible ou moyen. Dans une étude américaine, près de 50 % des enfants hospitalisés pour une IRA étaient âgés de moins de 6 mois¹¹. Bien que la létalité des IRA chez les enfants de moins de 5 ans soit en baisse (2,34 millions en 1990 pour 808 920 en 2017), les IRA restent la cause majeure de décès dans cette tranche d'âge au niveau mondial¹². De plus, les IRA sont l'une des causes les plus fréquentes de consultation et d'hospitalisation notamment dans les services pédiatriques, ce qui provoque des phénomènes d'engorgement des hôpitaux en hiver dans les pays développés¹³.

D'autre part, les récentes émergences de virus respiratoires ces vingt dernières années avec les épidémies telles que le Syndrome Respiratoire Aigu Sévère (SRAS) en 2003¹⁴, la grippe aviaire A(H5N1) en 2004¹⁵, la grippe aviaire A(H1N1) en 2009¹⁶, le MERS-CoV en 2012¹⁷, la grippe A(H7N9) en 2013¹⁸ et la Covid19 en 2020¹⁹, ont rappelé l'importance et la gravité que peuvent engendrer les IRA dans le monde.

De plus, l'émergence de résistance aux traitements antimicrobiens constitue une menace importante et croissante pour la santé publique. Ces résistances liées à l'utilisation abusive et non appropriée d'antimicrobiens, entraînent une augmentation du nombre de décès et de la durée des hospitalisations et induisent un risque d'impasse thérapeutique.

Enfin, la présence d'un grand nombre de pathogènes associés aux IRA et la récurrence des infections tout au long de la vie, rendent indispensable de développer une meilleure connaissance sur ces IRA et ces divers agents étiologiques, afin d'améliorer la prise en charge des patients et proposer de nouvelles approches thérapeutiques.

2 Facteurs influençant la prévalence et la gravité des IRA chez les enfants de moins de 5 ans

Les IRA chez les moins de 5 ans peuvent avoir de lourdes conséquences à long terme telles qu'une diminution de la fonction respiratoire¹¹ ou encore le développement d'un asthme²⁰, c'est pourquoi il est important d'identifier et de comprendre les facteurs pouvant moduler la sensibilité et la gravité de ces infections.

2.1 Facteur lié à l'agent pathogène

En premier lieu, la gravité de l'infection est liée aux caractéristiques de l'agent pathogène qui en est la cause (mode de transmission, transmissibilité, facteur de virulence).

Chez l'enfant de moins de 5 ans, la majorité des IRA sont causées par des virus, bien que l'on trouve également des co-infections virales et/ou bactériennes^{10,11,21}. Le Virus Respiratoire Syncytial (VRS) est le virus le plus fréquemment retrouvé notamment lors des bronchiolites¹¹ (décrit en détail dans le **chapitre 2**). Les autres virus majoritairement identifiés sont les *rhinovirus* (24,3%), les *bocavirus* humains (hBoV), les virus *influenza*, les *métapneumovirus* (hMPV), les *coronavirus* (CoV), les *entérovirus*, les *adénovirus* (AdV) et les virus *parainfluenza* (PIV)¹¹ (**Tableau 1**). Ces virus ont tous en commun un tropisme quasi exclusif des cellules ciliées de l'épithélium respiratoire. Il est important de noter que certains virus dit « opportunistes » peuvent également être responsables d'IRA, tels que les virus de la famille des *Herpesviridae*²². Dans 26,9% des cas, deux ou plusieurs virus sont identifiés et la co-infection la plus fréquente est celle du VRS et du *rhinovirus* (27,3%)¹¹. Dans 43,9% des cas, des surinfections bactériennes sont observées, le plus fréquemment avec *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) et *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)²³. Celles-ci sont favorisées par des altérations du système immunitaire et les lésions de l'épithélium respiratoire induites par l'infection virale.

Les IRA d'origine bactérienne sont le plus fréquemment causées par *S. pneumoniae*, *S. aureus* et *H. influenzae*. Ces bactéries font parties de la flore commensale des muqueuses respiratoires et sont donc présentes chez des individus sains²⁴. C'est sous l'influence de divers facteurs que ces bactéries peuvent devenir pathogènes et induire des infections de types otite, sinusite ou bronchite, voir des infections plus graves comme des pneumonies chez les personnes à risque et les enfants en bas âge^{2,25}. Les autres bactéries pouvant causer des IRA sont *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella pertussis* (bactérie responsable de la coqueluche), *Mycoplasma pneumoniae* et *Chlamydia pneumoniae*^{25,26}. Les co-infections virales sont également fréquentes lors des infections respiratoires d'origine bactérienne^{2,27,28}.

2.2 Facteurs liés à l'hôte

De nombreux facteurs liés à l'hôte sont susceptibles de moduler la sensibilité et la gravité des IRA chez les enfants de moins de 5 ans. Parmi ces différents facteurs on retrouve notamment :

- **Le sexe** : Les enfants de sexe masculin ont un risque relatif de 1,23 de faire une IRA pouvant conduire à une hospitalisation comparé aux enfants de sexe féminin dans les pays en développement^{29,30}.
- **L'âge** : Le risque de décès est plus élevé chez les nourrissons de 1 à 3 mois^{11,29-31}.
- **L'état nutritionnel** : La malnutrition est un facteur de risque et un facteur aggravant des IRA. La malnutrition engendre une diminution des mécanismes de défense de l'organisme, ce qui rend l'enfant plus sensible aux infections^{32,33}. D'autre part, le type d'alimentation du nourrisson a également un impact sur la survenue des IRA. Le lait maternel peut avoir un effet protecteur contre les infections virales et bactériennes en fonction de la durée et de l'exclusivité de l'allaitement^{30,34-38}. Une méta-analyse a montré que suite à un allaitement maternel exclusif d'au moins 4 mois, le risque relatif d'hospitalisations pour infections respiratoires était divisé par trois par rapport aux nourrissons nourris de manière artificielle³⁹.
- **La prématurité** : Les grands prématurés ont des poumons immatures anatomiquement et fonctionnellement avec un risque accru de développer des dysplasies broncho-pulmonaires. Les poumons des prématurés sont particulièrement vulnérables car ils ne produisent pas (ou peu) de surfactant pulmonaire, substance indispensable à la fonction respiratoire normale et aux mécanismes de défenses broncho-alvéolaire grâce à ses propriétés bactéricides^{30,40,41}.
- **Le mode de naissance** : Chez les enfants de moins de 5 ans, ceux nés par césarienne ont un risque d'hospitalisation et d'infection respiratoire 1,15 fois plus élevé que ceux nés par voie basse⁴².
- **Présence d'une pathologie pulmonaire chronique** (tel que l'asthme)⁴³ **ou d'un déficit immunologique congénital ou acquis** (tel qu'une infection à VIH)⁴⁴ rendant le sujet plus susceptible de développer des formes sévères.
- **Prédisposition génétique** : La présence de polymorphismes dans plusieurs gènes de l'immunité a été décrite dans plusieurs cas d'IRA sévères, par le VRS, la grippe, ou plus récemment le SARS-CoV-2⁴⁵⁻⁴⁸.

2.3 Facteurs liés à l'environnement

De nombreux facteurs liés à l'environnement sont également susceptibles de jouer un rôle sur la prévalence et la gravité des IRA. Parmi ces différents facteurs, on retrouve notamment :

- **Des facteurs saisonniers et climatiques** : les éléments comme la température et l'humidité de l'air peuvent avoir un impact sur la fréquence des IRA. C'est notamment le cas dans les pays du sud où la prévalence des IRA est significativement plus élevée pendant les saisons humides (mars à octobre) par rapport aux saisons sèches (novembre à février)⁴⁹.
- **Les conditions socio-économiques** : dans les pays développés par exemple, il a été montré qu'il y avait une corrélation négative entre la mortalité infantile due aux IRA et le produit national brut par habitant⁵⁰. L'hygiène mais aussi des soins de qualité ainsi que des mesures de prévention sont des facteurs importants mais dont l'accès est parfois limité dans les pays en voie de développement³².
- **L'environnement de vie de l'enfant** : pour cette catégorie, on peut noter la pollution de l'air des maisons d'habitation par les fumées domestiques ainsi que la fumée dégagée par le tabac⁵¹⁻⁵⁴. Les habitations surpeuplées⁵³, la présence de frères et sœurs²⁹ mais aussi la fréquentation des garderies²⁹ constituent des facteurs de risque de survenue d'IRA précoce (et donc potentiellement sévère), notamment par le VRS.

3 Diagnostic

Le diagnostic des maladies respiratoires repose à la fois sur la clinique, l'imagerie (radiographie pulmonaire notamment), et le diagnostic microbiologique. Les IRA virales sont diagnostiquées quasi exclusivement par du diagnostic direct, avec historiquement des méthodes dites conventionnelles (culture, immunofluorescence) qui ont été remplacées progressivement par des techniques de biologie moléculaire (PCR (*Polymerase Chain Reaction*), RT-PCR (*Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*), séquençage) depuis plus d'une dizaine d'années.

4 Traitement et Prévention

Les traitements spécifiques des IRA dépendent bien sûr de la nature de l'agent pathogène qui en est responsable. A noter cependant que peu de traitements antiviraux spécifiques existent, par rapport aux antibiotiques pour les IRA bactériennes qui sont couramment employés.

Les IRA virales ayant un potentiel épidémique (voir pandémique), elles peuvent présenter un risque pour la santé publique, c'est pourquoi la mise en œuvre de précautions particulières (gestes barrières, isolement...) et de méthodes de prophylaxie (vaccination) sont nécessaires afin de limiter au mieux la propagation des virus respiratoires ^{10,13}.

Tableau 1 Tableau récapitulatif des virus respiratoires responsables d'IRA chez l'enfant de moins de 5 ans

Classé par ordre de prévalence d'après l'article de Brouard et *al.*, 2020¹¹.

Virus humain	Prévalence (%)	Structure	Clinique	Traitements	Prévention	Références
Famille <i>Pneumoviridae</i> Genre <i>Pneumovirus</i> Espèce VRS	31,70	ARNsb polarité négative 15 kb	Saisonnalité Dans les zones tempérées : circulation à partir de novembre-décembre jusqu'en mars-avril. Dans les zones tropicales : circulation toute l'année ou de façon biannuelle Incubation 2-8 jours Durée de la maladie 3-7 jours Tableau clinique Tableau léger d'infection des voies respiratoires supérieures à une infection grave des voies respiratoires inférieures avec possible surinfection bactérienne - Complication neurologique possible	Traitement symptomatique , dont Hospitalisation des cas sévères : O2, antipyrétiques, alimentation entérale... Traitement antiviral possible chez l'immunodéprimé	Mesures d'hygiène Anticorps monoclonal chez prématurés et enfants avec terrain à risque	11,55-61
Famille <i>Picornaviridae</i> Genre <i>Rhinovirus</i> Espèce Rhinovirus A et B	24,30	ARNsb polarité positive 7,2 kb	Saisonnalité Aucune Incubation 2-3 jours Durée de la maladie 7 à 10 jours Tableau clinique Toux, rhinorrhée, congestion nasale, irritation de la gorge, céphalées Evolution en laryngite, bronchiolite ou pneumonie possible	Traitement symptomatique	Mesures d'hygiène Absence de vaccin	11

Virus humain	Prévalence (%)	Structure	Clinique	Traitements	Prévention	Références
Famille <i>Parvoviridae</i> Genre <i>Bocavirus</i>	10,10	ADNsb 5 kb	Saisonnalité Tout au long de l'année avec un pic lors de la période hivernale et début du printemps			
			Incubation non établie	Traitement symptomatique	Mesures d'hygiène	11,62
			Durée de la maladie environ 6 jours		Absence de vaccin	
			Tableau clinique Infection des voies respiratoires supérieures bénignes (Toux, rhinorrhée, congestion nasale, irritation de la gorge, céphalées)			
Famille <i>Orthomyxoviridae</i> Genre <i>Influenzavirus</i> Espèce Virus Influenza A, B et C	9,60	ARNsb segmenté polarité négative 13,5 kb	Saisonnalité Epidémies annuelles hivernales de décembre à mars	Traitement symptomatique		
			Incubation 2-3 jours	Traitement spécifique antiviral pour les patients à risque et les formes graves : - Inhibiteurs de neuraminidase (Oseltamivir) - Inhibiteurs de polymérase uniquement au Japon (favipiravir)	Mesures d'hygiène	11,55,63-70
			Durée de la maladie 3 à 6 jours mais dans les cas les plus sévères peut se prolonger jusqu'à 6 semaines		Vaccination antigrippale (populations à risque et soignants)	
			Tableau clinique Forme asymptomatique (30%). Fièvre brutale et élevée, asthénie, frissons, céphalées, myalgies, toux sèche, maux de gorge, rhinorrhée... Complications respiratoires et/ou neurologiques possibles			

Virus humain	Prévalence (%)	Structure	Clinique	Traitements	Prévention	Références
Famille <i>Pneumoviridae</i> Genre <i>Pneumovirus</i> Espèce Métapneumovirus	8,20	ARNsb polarité négative 13 kb	Saisonnalité En hiver de novembre à mars Incubation 3 à 5 jours Durée de la maladie 7 à 10 jours Tableau clinique Congestion nasale, rhinorrhée, mal de gorge, pharyngite ou bronchite, éternuements, toux, mal de tête, myalgie ou fièvre et respiration sifflante	Traitement symptomatique	Mesures d'hygiène Absence de vaccin	11,71
Famille <i>Coronaviridae</i> Genre <i>Coronavirus</i> Espèce SARS-CoV, HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV-2	5,60	ARNsb polarité positive jusqu'à 32 kb	Saisonnalité Epidémies entre janvier et mai (hormis pour les SARS-CoV et le MERS-CoV) Incubation 2 à 4 jours Durée de la maladie 3 à 10 jours Tableau clinique Infection des voies respiratoires supérieures et syndrome pseudo-grippal (Fièvre, frissons, courbatures, asthénie). Possible infections des voies respiratoires inférieures avec détresse respiratoire et passage en service de réanimation	Traitement symptomatique Traitements antiviraux pour le SARS-CoV-2 : anticorps monoclonaux et antiviraux	Mesures d'hygiène Absence de vaccin excepté contre le Sars-Cov-2	11,17,19,72

Virus humain	Prévalence (%)	Structure	Clinique	Traitements	Prévention	Références
Famille <i>Picornaviridae</i> Genre <i>Enterovirus</i> Espèce Entérovirus A, B, C et D	3,50	ARNsb polarité positive 7,5 kb	Saisonnalité Circule en été et en automne			
			Incubation 3 à 5 jours			
			Durée de la maladie 7 à 10 jours	Traitement symptomatique	Mesures d'hygiène	11,73,74
			Tableau clinique Infections respiratoires hautes d'évolution bénigne. Evolution plus grave possible notamment des infections respiratoires basses avec l'EV-D68 ou des cas de paralysie flasque aiguë avec EV-D68 et EV-71		Absence de vaccin	
Famille <i>Adenoviridae</i> Genre <i>Mastadenovirus</i> Espèce Adénovirus	1,80	ADNdb jusqu'à 38 kb	Saisonnalité Circule d'octobre à mars avec un pic en hiver	Traitement symptomatique	Mesures d'hygiène	11,75
			Incubation 2 à 14 jours			
			Durée de la maladie 3 à 5 jours	Traitement antiviral possible des cas sévères (immunodéprimés)	Absence de vaccin	
			Tableau clinique Infection des voies respiratoires supérieures			

Virus humain	Prévalence (%)	Structure	Clinique	Traitements	Prévention	Références
Famille <i>Paramyxoviridae</i>			Saisonnalité PIV-3 circule au printemps et en été ; PIV-1 et 2 évoluent sous forme épidémique à l'automne tous les 2 ans et l'épidémiologie du PIV-4 mal connue			
Genre <i>Respirovirus</i>			Incubation 2 à 6 jours			
Espèce Parainfluenzavirus-1 et 3	1,80	ARNsb polarité négative 15 kb	Durée de la maladie 2 à 10 jours	Traitement symptomatique	Mesures d'hygiène Absence de vaccin	11,76–79
Genre <i>Rubulavirus</i>						
Espèce Parainfluenzavirus-2 et 4			Tableau clinique PIV-1 et 2 (Laryngo-trachéites aiguës) ; PIV-3 (Infection respiratoire hautes : rhinites, trachéites, laryngites ; et infections respiratoire basse : pneumonies, bronchiolites) et PIV-4 (Infections respiratoires mineures)			

Abréviations : VRS : Virus Respiratoire Syncytial ; ARN : Acide Ribonucléique ; ADN : Acide Désoxyribonucléique ; sb : simple brin ; db : double brin ; kb : kilobase ; SARS : Severe acute respiratory syndrome ; MERS : Middle East respiratory syndrome ; HCoV : Human Coronavirus, EV : entérovirus ; PIV : Parainfluenzavirus.

Chapitre 2 : Le Virus Respiratoire Syncytial

Le virus respiratoire syncytial est la première cause d'infection des voies respiratoires basses aiguës (bronchiolite, pneumopathie) chez les enfants de moins de 5 ans⁸⁰⁻⁸¹. C'est également le virus retrouvé en majorité chez les patients de la cohorte VibraFlu (cohorte d'étude de cette thèse).

1 Le virus

1.1 Historique

Le VRS a été découvert pour la première fois en 1955 chez un chimpanzé qui souffrait d'un coryza sévère, ce qui lui a dans un premier temps valu le nom de « Chimpanzee Coryza Agent » (CCA)⁸². En 1957, un agent semblable au CCA a été isolé chez un enfant atteint de pneumonie⁸³. Ce nouveau virus sera nommé virus respiratoire syncytial en rapport avec les images obtenues lors de l'infection de lignées cellulaires Hep-2⁸³ sur lesquelles il est possible d'observer la formation de « syncytia » (cellules plurinucléées) due à la fusion de plusieurs cellules.

En 1960, une étude portant sur des enfants hospitalisés a mis en évidence que parmi ceux présentant des signes respiratoires, 16% étaient infectés par le VRS contre seulement 1,5% pour les enfants sans symptômes respiratoires⁸⁴. De plus, le virus a été principalement retrouvé chez les nourrissons de moins de sept mois qui présentaient une bronchiolite (59%) ou une pneumonie (54%). Cette étude a donc permis de confirmer l'implication du VRS lors des IRA chez les enfants et de mettre en évidence une sévérité plus importante chez les enfants de moins de 7 mois.

1.2 Taxonomie

Le VRS appartient à l'ordre des *Mononegavirales*, la famille des *Pneumovirinae* et au genre des *Orthopneumovirus*⁸⁵. La variabilité des séquences des VRS est importante en raison du taux élevé de substitutions nucléotidiques lors de la transcription (caractéristique des virus à ARN). Deux sérotypes majeurs sont identifiés : A et B. Ils se distinguent par une variation au niveau de la glycoprotéine G mise en évidence en 1985 grâce à des tests *in vitro* avec des anticorps monoclonaux dirigés contre les différentes protéines^{86,87}. Par la suite, une classification additionnelle plus détaillée basée principalement sur le séquençage du gène de la protéine G a été établie⁸⁸. Au sein de chaque sérotype, on distingue différents génotypes

en fonction des variations observées dans la 2^{ème} région hypervariable du domaine extracellulaire de la séquence de la protéine G⁸⁹. Ce sont ces régions hypervariables qui induisent une divergence de séquences importante entre les sérotypes A et B où l'on retrouve seulement 53% d'homologie⁹⁰. La variabilité au sein d'un sérotype est élevée car le taux de substitutions nucléotidiques dans le génome complet mais surtout dans le gène codant pour la protéine G est important. En effet, une étude réalisée entre 1998 et 2010 au niveau mondial a mis en évidence au niveau du génome complet un taux de substitutions de $6,72 \times 10^{-4}$ par sites/an pour les VRS-A et de $7,69 \times 10^{-4}$ par sites/an pour les VRS-B⁹¹. Le taux d'évolution varie d'un gène à l'autre, mais toujours dans cette étude, le taux de substitutions pour le gène codant pour la protéine G était estimé à $1,86 \times 10^{-3}$ par sites/an pour les VRS-A et $2,43 \times 10^{-3}$ par sites/an pour les VRS-B⁹¹.

De multiples génotypes ont été décrits dans les sérotypes A et B du VRS. Cependant, les critères de classification pour le génotypage des souches n'ont pas encore été bien établis et il n'existe pas de consensus pour définir les différents génotypes du VRS^{92,93}. D'après la littérature, 16 génotypes de VRS-A ont déjà été décrits dont les principaux sont : GA1 à GA7, SAA1, NA1 et ON1^{88,92,94-97}. Quant au VRS-B, jusqu'à 37 génotypes différents ont déjà été décrits notamment GB1 à GB4, BA1 à BA10, SAB1 à SAB4, URU1 et URU2^{93,98}. La protéine G du VRS étant en constante évolution, une surveillance continue de la diversité du virus est importante car ce mécanisme favorise les réinfections à VRS tout au long de la vie.

1.3 Génome

Le VRS est un virus enveloppé qui possède un génome ARN simple brin non segmenté de polarité négative. Il se réplique entièrement dans le cytoplasme de la cellule qu'il infecte⁹⁹. La taille de son génome est d'environ 15 kb, et ses extrémités comportent des séquences promotrices (séquence « leader » en 3' et séquence « trailer » en 5') qui servent au recrutement de la polymérase virale ainsi qu'à l'initiation de la réplication. Le génome comporte 10 gènes codant pour 11 protéines¹⁰⁰ : les protéines non structurales 1 et 2 (NS1 et NS2), la nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P), la protéine de matrice (M), la protéine small hydrophobic (SH), la protéine d'attachement (G), la protéine de fusion (F), la polymérase (L), et les protéines M2-1 et M2-2 synthétisées à partir du gène M2 (**Figure 2**).

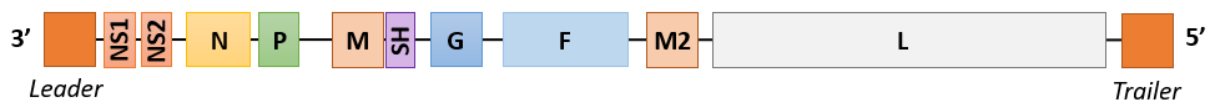


Figure 2 Représentation schématique du génome du VRS

Le génome viral est constitué d'environ 15 000 nucléotides, comprend 10 cadres de lecture séparés par des régions intergéniques non codantes. Il comporte en 5' et 3' des séquences non codantes (Leader et Trailer).

Abréviations : NS1/NS2 : protéines Non Structurales 1 et 2 ; N : Nucléoprotéine ; P : Phosphoprotéine ; M : protéine de Matrice ; SH : protéine Small Hydrophobic ; G : protéine d'attachement ; F : protéine de Fusion ; L : Polymérase.

1.4 Structure

Le VRS est un virus pléomorphe d'une taille de 100 à 350 nm. Il peut avoir un aspect sphérique ou filamenteux¹⁰¹. L'enveloppe virale formée par une bicouche lipidique porte à sa surface trois glycoprotéines : la protéine F, la glycoprotéine d'attachement G et la protéine SH. Sous cette enveloppe, on trouve la matrice virale composée de la protéine M. A l'intérieur du virion, on trouve la nucléocapside : complexe protéique associés à l'ARN viral (ARNv) et constitué de la nucléoprotéine N, de l'ARN polymérase L, de la phosphoprotéine P et des protéines M2-1 (facteur de transcription) et M2-2 (protéine régulatrice). Enfin, les protéines non-structurales (NS1 et NS2) sont produites en abondance uniquement lors du cycle viral et auraient pour rôle de limiter la réponse immunitaire à l'infection⁵⁵ (**Figure 3**). Les rôles de chaque protéine sont répertoriés dans le **Tableau 2**.

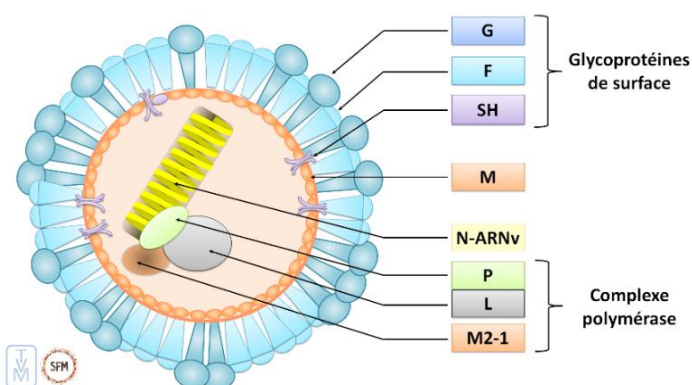


Figure 3 Représentation schématique de l'organisation de la particule virale du VRS

Figure extraite du Traité de Virologie⁵⁵.

Abréviations : N-ARNv : Nucléoprotéine-ARN viral ; P : Phosphoprotéine ; M/M2-1 : protéine de Matrice ; SH : protéine Small Hydrophobic ; G : protéine d'attachement ; F : protéine de Fusion ; L : Polymérase.

Tableau 2 Les différentes protéines du VRS

Nom	Taille du gène (nt) et de la protéine (aa)	Fonctions	Références
G	922 nt 298 aa	→ Attachement du virus à la membrane cellulaire → Participe à l'échappement au système immunitaire de l'hôte → Peut induire la formation d'anticorps neutralisants contre le VRS	88,102-104
F	1903 nt 574 aa	→ Protéine de fusion : permet la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire de la cellule hôte, permettant ainsi l'entrée du virion dans la cellule → Provoque la fusion des membranes de cellules adjacentes infectées induisant la formation de syncytia et la propagation du virus → Peut induire la formation d'anticorps neutralisants et protecteurs à long terme	58,103-107
SH	410 nt 64 aa	→ Petite protéine hydrophobe → Rôle mal connu → Interviendrait dans la survie du VRS et inhiberait l'apoptose → Permettrait la régulation de la perméabilité membranaire en formant un canal ionique sélectif aux cations	103,104,108,109
M	957 nt 256 aa	→ Protéine de matrice → Rôle dans l'assemblage, la maturation et le bourgeonnement des virions	103,104,110,111
N	1205 nt 391 aa	→ Nucléoprotéine → Encapsidation de l'ARNv. Ce complexe est appelé la nucléocapside. Son rôle est de protéger l'ARNv de la dégradation par les RNases cellulaires.	55,103,104
NS1	532 nt 139 aa	→ Protéines non structurales 1 et 2	56,105,106
NS2	502 nt 124 aa	→ Capables de moduler les cascades pro-inflammatoires et antivirales limitant ainsi la réponse cellulaire à l'infection	
L	6578 nt 2165 aa	→ ARN polymérase ARN dépendante → Sous unité majeure de la polymérase, contient les domaines catalytiques. → Permet la synthèse de l'ARNm et la réplication de l'ARN	56,105,106
P	890 nt 241 aa	→ Phosphoprotéine → Cofacteur de l'ARN polymérase → Composant de la ribonucléocapside ; elle se lie aux protéines N, M2-1 et L et facilite sa formation et sa fonction	56,105,106
M2	961 nt M2-1 : 194 aa M2-2 : 90 aa	→ Facteur essentiel pour la transcription du génome viral → Régulation du switch entre les fonctions de réplication et de transcription de l'ARN polymérase	103,104,112

Abréviations : N : Nucléoprotéine ; ARNv : ARN viral ; P : Phosphoprotéine ; M/M2-1 : protéine de Matrice ; SH : protéine Small Hydrophobic ; G : protéine d'attachement ; F : protéine de Fusion ; L : Polymérase ; nt : nucléotides ; aa : acides aminés.

1.5 Cycle viral

Les détails des différentes étapes du cycle de réplication du VRS ne sont pas encore totalement connus. Le VRS cible principalement les cellules épithéliales ciliées du tractus respiratoire et son cycle de réplication se déroule entièrement dans le cytoplasme de la cellule hôte¹¹³ (Figure 4).

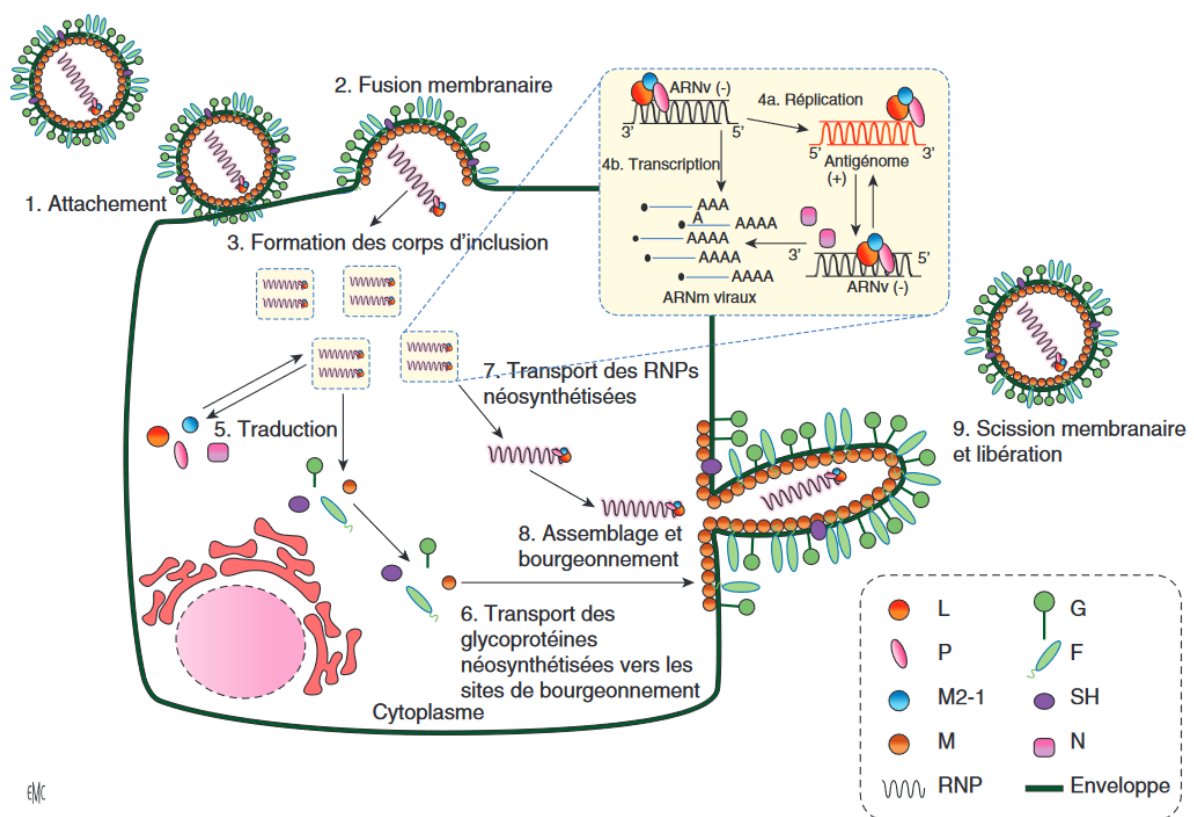


Figure 4 Schéma du cycle de réplication virale du VRS

La particule virale s'attache à la surface de la cellule hôte sensible à l'infection (1). S'en suit alors la formation d'une vésicule d'endocytose puis la fusion des membranes virale et cellulaire (2). Les ribonucléoprotéines (RNPs) sont regroupées aux niveaux des corps d'inclusion (3) où se déroulent la réplication et la transcription du génome viral (4a et b). Les ARNm viraux sont traduits dans le cytoplasme (5). Les protéines de surface, la protéine de matrice et les RNPs néosynthétisées sont amenées vers les sites d'assemblage du virus (6 et 7). Une fois assemblé, les virions bourgeonnent à la membrane plasmique de la cellule hôte (8). Les particules virales sont libérées (9). Figure extraite de la revue de Cosentino *et al.*, 2021¹¹³.

Abréviations : L : polymérase ; P : phosphoprotéine ; M : protéine de matrice ; F : la protéine de fusion ; G : la protéine d'attachement ; N : nucléoprotéine ; SH : petite protéine hydrophobe ; ARN : acides ribonucléiques ; m : messenger ; v : viral ; RNPs : ribonucléoprotéines.

Entrée du virus dans la cellule

L'attachement des particules virales aux cellules se fait par le biais des glycoprotéines de surface F et G. Différentes études ont mis en évidence différents récepteurs cellulaires pouvant être impliqués dans l'entrée virale. La protéine G interagit avec des glycosaminoglycanes, notamment l'héparane sulfate, présents à la surface des cellules cibles. La protéine G est également capable d'interagir avec le récepteur CX3CR1, puisqu'elle possède des motifs moléculaires similaires à la chimiokine CX3CR1-Ligand¹¹⁴. Cette interaction pourrait induire une réduction de la réponse immunitaire cellulaire de l'hôte^{115,116}. La protéine F peut également jouer un rôle de protéine d'attachement de substitution pour faire face à l'absence de la protéine G (virus recombinants ou mutants avec délétion spontanée) via des récepteurs tels que le TLR-4 et la nucléoline^{89,117}. Cependant sa fonction principale est de permettre la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de la cellule hôte. Suite à la formation d'une vésicule d'endocytose, le mécanisme de fusion est induit par un changement de conformation de la protéine F déclenché par la liaison à la membrane cellulaire. La protéine F passe d'une conformation dite de « pré-fusion » à une protéine F stable de « post-fusion ». Après cette fusion, la nucléocapside est libérée dans la cellule hôte (**Figure 4**).

Transcription et réplication du virus

Les étapes de transcription et réplication du génome viral ont lieu dans le cytoplasme de la cellule infectée au niveau des corps d'inclusion. Dans un premier temps, la polymérase L réalise une transcription séquentielle du génome viral en commençant par l'extrémité 3'. Les ARNm sont ensuite coiffés et polyadénylés par la polymérase virale, puis traduits en protéine dans le cytoplasme de la cellule infectée. Dans un second temps, la polymérase L assure la réplication du génome en générant un brin d'ARN complet de polarité positive appelé brin antigénomique qui sera par la suite répliqué pour former des ARNv. La protéine N recouvre au fur et à mesure de leur réplication les ARN génomiques et antigénomiques (**Figure 4**).

Assemblage et libération des virions néoformés

Ce complexe ARNv et protéine N va ensuite s'associer aux protéines du complexe polymérase et être exporté vers les sites d'assemblage du virus concentrés en glycoprotéines virales. La protéine de matrice M permet ensuite l'assemblage, la maturation et le bourgeonnement du virion au niveau de la membrane plasmique de la cellule hôte. Après scission membranaire, les virions vont pouvoir infecter les cellules voisines (**Figure 4**).

2 L'infection par le VRS

2.1 Épidémiologie

Importance en pédiatrie

Le VRS est le principal agent infectieux de la bronchiolite du nourrisson, responsable de 60 à 90% des cas¹¹⁸. En 2005, 33.8 millions d'infections respiratoires basses dues au VRS ont été recensées dans le monde, parmi lesquelles au moins 3.4 millions de formes sévères qui ont conduit à une hospitalisation et 100 000 à 150 000 morts chez les moins de 5 ans. Notons que 99% des décès enregistrés se produisent dans les pays en développement³. En France, la bronchiolite touche environ 30% des nourrissons de moins de 2 ans, soit environ 480 000 enfants par an, et 2 à 3% des nourrissons de moins de 1 an seraient hospitalisés pour une forme grave. Le VRS est aussi une cause majeure d'exacerbation des maladies chroniques des voies respiratoires comme l'asthme et la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO).

Saisonnalité et variabilité

La saisonnalité du virus est dépendante de la région géographique. En effet, dans les zones tempérées de l'hémisphère Nord, le virus circule sous la forme d'une épidémie débutant généralement en novembre-décembre, avec un pic au mois de janvier et se finissant vers le mois de mars-avril, alors que dans les zones tropicales, le virus est détecté durant toute l'année ou de façon bimanuelle⁵⁶. La circulation du virus semble favorisée par le froid et surtout l'humidité mais ces facteurs météorologiques ne permettent pas d'expliquer toutes les variations de saisonnalité⁵⁷. En France, la période épidémique s'étend généralement de mi-octobre à février avec un pic au mois de décembre.

Epidémiologie moléculaire

Le VRS a été classé en 2 sous-groupes A et B capables de co-circuler au cours d'une épidémie¹¹⁹. L'épidémiologie moléculaire du VRS est indispensable pour avoir des informations sur les sous-groupes et génotypes circulants et l'évolution du virus. Cependant la plupart des laboratoires hospitaliers n'effectuent pas la détermination du sous-groupe ou des génotypes. Lors de la saison 2016/2017 (saison correspondant à celle de la cohorte VibraFlu), les laboratoires ayant réalisés le typage ont observé la même proportion de VRS A que de VRS B¹²⁰. Au sein de notre laboratoire, le génotypage n'était effectué que sur une petite

proportion de virus avant 2019. Lors de la saison 2016/2017 à Lyon, les 7 souches génotypées de VRS-A étaient de type ON1 et les 10 souches VRS-B étaient de type BA. Ces deux génotypes étaient les génotypes majoritaires circulants parmi les 50 souches séquencées à Lyon de 2016 à 2018¹²¹.

2.2 Physiopathologie

Le VRS est un virus très contagieux qui peut infecter un individu plusieurs fois au cours de sa vie. La majorité des enfants sont infectés par le VRS pendant leur première année de vie, et >90% le sont avant l'âge de 2 ans^{122,123}. Les réinfections sont fréquentes notamment au cours des premières années de vie. En effet, une étude a montré que parmi les enfants infectés dans leur première année de vie, 47% ont été réinfectés durant leur deuxième année de vie et 45 % pendant la troisième année de vie¹²².

Transmission – Incubation – Durée de la maladie

La transmission du VRS est strictement interhumaine. La contamination se fait de manière directe par inhalation de gouttelettes émises par un patient infecté (via de la toux ou des éternuements) dans un rayon allant jusqu'à 2 mètres. Il est également possible de contracter la maladie de manière indirecte par contact des muqueuses nasales ou conjonctivales par le biais de mains ou support inerte souillés par des sécrétions contaminées¹¹⁸. En effet, le VRS peut survivre environ 30 minutes sur la peau et jusqu'à 7 heures sur une surface inerte¹¹⁸.

Le délai d'incubation est de 2 à 8 jours. La réplication virale se fait au niveau de l'épithélium nasal entraînant congestion, rhinorrhée et perte d'appétit. L'infection par le VRS reste localisée à l'arbre respiratoire d'où une maladie locale (respiratoire haute ou basse). La maladie dure en général de 3 à 7 jours, mais peut parfois aller jusqu'à 3 semaines^{118,124}.

Histopathologie

La réplication virale débute au niveau des cellules ciliées de l'épithélium respiratoire, dans un premier temps dans le nasopharynx puis s'il se propage, au niveau de l'arbre respiratoire inférieur par diffusion de cellules en cellules. L'infection provoque un détachement, une nécrose et une perte de la fonction de clairance des cellules épithéliales ciliées, ce qui semble contribuer à l'encombrement des voies respiratoires du nourrisson (obstruction des bronchioles et inflammation pulmonaire)^{125–127}. En effet, il est observé une augmentation de la sécrétion de mucus, la présence d'œdème et d'infiltrat inflammatoire et une altération de

la motilité ciliaire dans les poumons des enfants infectés. Cette atteinte plus ou moins prononcée du poumon dépend des capacités de défenses innées de l'organisme mais aussi de l'immunité adaptative dite « mémoire ». L'âge de la primo-infection par le VRS est donc un déterminant majeur de sévérité de la bronchiolite. Actuellement, l'impact respectif de la multiplication virale et de la réponse immunitaire et inflammatoire dans les lésions pulmonaires observées n'est pas encore défini. Bien que la guérison se fasse de manière spontanée, le processus de cicatrisation peut s'avérer long et expose l'épithélium respiratoire aux surinfections.

2.3 Manifestations cliniques

Le VRS provoque des pathologies allant d'un tableau léger d'infection des voies respiratoires supérieures à une infection grave des voies respiratoires inférieures.

La présentation typique de la bronchiolite à VRS est celle d'un nourrisson présentant une rhinite avec une toux sèche avec peu voire pas de fièvre (dans 50% des cas). Dans 30% des cas environ, des signes pulmonaires vont apparaître. Parmi ces signes pulmonaires on peut trouver : de la toux, une dyspnée obstructive avec polypnée, des signes de lutte (tirages, battement des ailes du nez...), une distension thoracique, un « wheezing » (respiration sifflante) ou des râles crépitants. Chez certains patients on note aussi des troubles alimentaires : fausse-route due à la polypnée, ballonnement abdominal, reflux gastro-œsophagien. Ces troubles aggravent les difficultés ventilatoires et peuvent compromettre l'hydratation. L'évolution de la pathologie est variable et difficilement prévisible, nécessitant souvent l'hospitalisation pour les nourrissons les plus jeunes⁵⁸.

Des surinfections bactériennes sont fréquemment observées notamment des otites moyennes aiguës (OMA) lorsque les enfants présentent des charges élevées de VRS¹²⁸. Le pourcentage de co-infection par une bactérie est de plus de 40% chez les nourrissons ayant une bronchiolite sévère^{98,129}.

Des complications neurologiques ont également pu être observées dans certains cas. Les apnées représentent la première complication neurologique associée aux bronchiolites à VRS⁵⁹. Des convulsions sont également rapportées dans des cas de bronchiolite. Récemment, il a été décrit dans la littérature, des atteintes neurologiques centrales à VRS, avec des tableaux cliniques ressemblant à des encéphalites virales⁶⁰.

2.4 Conséquence à moyen et long terme

Le VRS est identifié comme étant une cause majeure d'exacerbation des maladies des voies respiratoires telles que l'asthme. Selon une méta-analyse, les infections virales seraient impliquées dans près de 40% de ces exacerbations, le VRS étant le 2^{ème} virus le plus détecté, dans 9% des cas, après les rhinovirus¹³⁰.

De plus, l'infection par le VRS pendant la première année est associée à un risque de développement d'une respiration sifflante récurrente (wheezing), d'asthme et d'autres maladies pulmonaires chroniques plus tard dans la vie^{60,131,132}. Par exemple, l'impact des bronchiolites à VRS survenue chez des enfants de moins d'un an sur la fonction respiratoire a été étudié sur une cohorte prospective et il a été observé une augmentation significative des cas d'asthme dans le groupe VRS à tous les âges du suivi (1, 3, 7 et 13 ans)¹³³⁻¹³⁶.

2.5 Traitements

Traitements symptomatiques

Devant le manque de traitements spécifiques curatifs, un patient ne présentant aucun facteur de risque recevra un traitement essentiellement symptomatique avec une désobstruction nasopharyngée. La kinésithérapie respiratoire n'est à ce jour plus recommandée¹³⁷. Si besoin, un recours à l'oxygénation et aux bronchodilatateurs est possible (patient présentant une désaturation inférieure à 94%). Dans les cas de signes de lutte importants ou de forts encombrements, il est possible d'avoir recours à une alimentation entérale (AE)³⁴.

Traitement spécifique

À ce jour, aucun traitement curatif n'est recommandé contre le VRS en France chez le nourrisson.

Le premier antiviral approuvé pour le traitement des infections à VRS a été la ribavirine (inhibiteur de la réplication virale). Initialement utilisé dans le traitement contre l'hépatite C, les effets de la ribavirine lors d'infection à VRS ont été évalués mais devant la faible efficacité clinique et face à l'apparition de plusieurs effets indésirables (anémie hémolytique, insuffisance rénale, nausées et vomissements), son utilisation n'est pas recommandée en routine^{138,139}. Toutefois, en l'absence d'alternative, la ribavirine peut être utilisée chez les personnes immunodéprimés⁶¹.

Actuellement, plusieurs antiviraux sont en cours de développement, avec comme cibles principales l'entrée cellulaire et la synthèse des ARNv. Parmi eux, le GS-5806 (inhibiteur de la

fusion membranaire)¹⁴⁰, le MDT-637 (inhibiteur de fusion dirigé contre la protéine F)¹⁴¹, le ALS-8112 et le ALS-8176 (inhibiteurs de la synthèse de l'ARN)^{142,143}, ont montré des résultats prometteurs. Ces molécules pourraient permettre de diminuer rapidement la sévérité de la maladie et les durées d'hospitalisation mais doivent faire l'objet d'évaluation plus approfondie pour s'assurer de leur efficacité et de leur non-toxicité.

2.6 Prévention

Mesures barrières

La mise en place de mesures d'hygiène basique et de mesures barrières simples sont le principal moyen pour limiter la transmission du VRS et de globalement tous les virus respiratoires notamment en période d'épidémie¹¹⁸.

Parmi ces mesures on retrouve principalement le port d'un masque chirurgical par le patient infecté, le lavage fréquent des mains (savons et/ou solution de gel hydroalcoolique notamment après un mouchage ou éternuement/toux) et la mise en place de distanciation physique avec les personnes présentant des signes d'infection respiratoire. D'autres mesures telles que le renouvellement régulier de l'air des pièces fréquentées, la décontamination des surfaces et la limitation à l'exposition (distanciation avec la fratrie infectée ou éviter les lieux publics et transport en commun) peuvent également être appliquées¹¹⁸.

La vaccination

A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement efficace contre les infections à VRS, c'est pourquoi le développement d'un vaccin est devenu une priorité pour l'OMS ¹⁴⁴.

Dans les années 1960, un essai clinique sur un premier vaccin inactivé (« formalin-inactivated virus vaccin ») a été testé sur des enfants et des nourrissons. Ce vaccin n'a pas permis de prévenir l'infection par le VRS puisque 64,5 % des enfants vaccinés ont ensuite développé la maladie. De plus, ce vaccin a également provoqué une augmentation de la gravité de la maladie avec des atteintes respiratoires très sévères, un taux d'hospitalisation de 80% et le décès de 2 enfants¹⁴⁵.

Cet essai clinique a eu un impact très négatif sur la poursuite du développement d'un vaccin anti-VRS. Par ailleurs, la méconnaissance des mécanismes immuno-pathologiques ayant conduit à l'augmentation des signes de gravité de la maladie n'étant pas encore totalement compris, il est difficile de progresser dans l'élaboration d'un vaccin anti-VRS inactivé¹⁴⁶.

Actuellement, de nombreux essais sont en cours chez des enfants et chez des femmes enceintes pour la mise au point d'un vaccin efficace contre le VRS notamment avec l'utilisation de protéine recombinante F¹⁴⁷. De plus, la récente pandémie de Covid-19 a mis en lumière la technologie des vaccins à ARN messager qui pourtant connue depuis une dizaine d'années n'avait pas pu bénéficier des investissements nécessaires pour le développement de vaccins. Le groupe Moderna a d'ailleurs annoncé des données intermédiaires positives d'un essai de phase 1 d'un vaccin contre le VRS (NCT04528719)¹⁴⁸.

Immunoprophylaxie passive

L'immunisation passive est donc le principal mode de prévention contre le VRS dans la population pédiatrique à ce jour. De plus, il existe actuellement un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre un épitope de la protéine F, le palivizumab qui réduit le risque d'hospitalisation de 50%¹⁴⁹. En France, il est indiqué pour la prévention des IRA dues au VRS chez les enfants à haut risque de bronchiolite grave c'est-à-dire pour les enfants nés prématurément, de moins de 6 mois au début de l'épidémie, et pour les enfants ayant des comorbidités cardio-respiratoire¹¹⁸. En octobre 2022, une autorisation de l'Agence Européenne du médicament a été obtenue pour un nouvel anticorps monoclonal : le nirsevimab. Une analyse groupée de deux essais a montré qu'après une injection intramusculaire chez les enfants nés avant ou pendant la saison épidémique de circulation du VRS, le taux d'hospitalisation pour infections des voies respiratoires inférieures causées par le VRS diminuait de 77,3%¹⁵⁰.

3 La réponse immunitaire anti-VRS

La plupart des informations concernant la réponse immunitaire anti-VRS proviennent de modèles murins et d'études *in vitro*. Bien qu'elles soient importantes pour la formulation d'hypothèses, ces méthodologies peuvent ne pas refléter de manière exacte la réponse immunitaire au cours de l'infection chez l'homme. Dans la suite de ce chapitre, nous nous concentrerons surtout sur les connaissances concernant la réponse immunitaire anti-VRS chez l'homme, notamment chez le nourrisson. La réponse immunitaire contre le VRS peut être à la fois protectrice et pathogène. En effet, le VRS est peu cytopathogène¹⁵¹ mais il induit de fortes réactions immunitaires parfois associées à des manifestations d'immunopathologie^{152,153}.

3.1 Immunité Innée

Avant même que l'immunité innée se mette en place, il existe des niveaux de défenses anatomiques (la peau et la surface des muqueuses) et physiologiques (l'hyperthermie puisque la température optimale de multiplication des virus respiratoires est comprise entre 33 et 35°C)⁵⁵.

Le surfactant pulmonaire est la première ligne de défense innée des poumons. Il est constitué de phospholipides (principalement la lécithine et la sphingomyéline) et de plusieurs protéines de surfactant. Le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) des nourrissons ventilés infectés par le VRS montre une diminution des concentrations de protéines A, B et D du surfactant. *In vitro*, il a été démontré que la protéine A du surfactant neutralise le VRS en se liant à la protéine F¹⁵⁴.

L'initiation de la réponse immunitaire innée repose sur la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes (*Pathogen-Associated Molecular Patterns* ou PAMPs) par des récepteurs spécifiques : *Pattern Recognition Receptor* (PRR). Il existe 2 catégories de PRR qui se distinguent par leur localisation cellulaire. Les PRR situés à la surface de membranes cellulaires et endosomales reconnaissent les PAMP extracellulaires. Ces PRR sont surtout exprimés dans les cellules immunitaires telles que les macrophages et les cellules dendritiques et incluent les TLR et les CLR (*C-type lectin Receptors*). La deuxième catégorie est constituée de PRR intracellulaires localisés dans le cytoplasme et/ou le noyau de pratiquement toutes les cellules. Ces PRR servent de capteurs pour détecter la présence de pathogènes viraux dès l'invasion cellulaire. Parmi eux, on trouve notamment RIG-1 (*retinoic acid-inducible gene 1*) et MDA5 (*melanoma differentiation-associated protein 5*) impliqués dans la défense précoce de l'hôte à l'infection par le VRS^{55,155}.

Après cette phase de reconnaissance des PAMP viraux, les PRR vont induire une cascade de signalisation via différents intermédiaires moléculaires tels que la protéine MAVS (*mitochondrial antiviral signaling*) ou différents facteurs de transcription. Cette cascade de signalisation va permettre par la suite la production de différentes protéines telles que les IFN de type 1 (IFN-I), les cytokines et les chimiokines pro-inflammatoires. Ces différentes molécules vont à leur tour induire des signaux.

Les IFN de type 1 après fixation à leurs récepteurs sur les cellules infectées ou avoisinantes, vont induire l'expression de nombreux gènes ISG (*interferon stimulated genes*) via le complexe de transcription ISG factor 3 (ISGF3, *IFN-stimulated gene factor 3*). Ces ISG peuvent être

impliqués dans l'inhibition de la traduction des ARNm viraux, coder pour des protéines antivirales ou des facteurs de restriction capables notamment de limiter la réplication virale ou la libération des virions^{55,155}.

En réponse à la libération de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires induite par l'infection, des cellules immunitaires sont recrutées, principalement des lymphocytes *Natural Killer* (NK), des cellules phagocytaires (neutrophiles et macrophages), des cellules dendritiques et des éosinophiles¹⁵⁴.

Chez les nouveau-nés, la réponse immunitaire innée est généralement retardée et/ou atténuée¹⁵³. Certaines études ont notamment mis en évidence qu'une altération de la production de cytokines^{156,157}, des polymorphismes sur certains gènes tels que TLR4^{158,159} ou une surexpression des gènes de l'immunité innée¹⁶⁰ peuvent être associés aux formes sévères de bronchiolites à VRS.

3.2 L'immunité adaptative

Dans l'infection par le VRS, la réponse humorale permet une immunité protectrice grâce à la stimulation des lymphocytes B et la production d'anticorps neutralisants ciblant les protéines F et G à la surface du virus. Cette production d'anticorps sériques a également lieu chez les jeunes enfants, bien que les titres d'anticorps produits chez les nourrissons soient faibles par rapport aux enfants plus âgés et aux adultes¹⁵⁴.

La réponse cellulaire quant à elle, favorise l'élimination du virus via le recrutement de lymphocytes T cytotoxiques CD8 + et de lymphocytes T helper (Th) CD4+¹⁵⁴. Les lymphocytes de type Th1 permettent notamment l'activation des macrophages qui contribuent à l'élimination des pathogènes intracellulaires tandis que la réponse Th2 est impliquée dans les réponses contre les pathogènes extracellulaires mais également associée à l'atopie avec une hyperéosinophilie, une hypersécrétion de mucus et une hyperactivité bronchique⁸⁵. Ces 2 réponses s'inhibent mutuellement¹⁵². Chez les nourrissons, le système immunitaire est immature et l'équilibre entre la réponse Th1 et Th2 est biaisé. Lors de l'infection par le VRS, une réponse de type Th2 est observée au détriment d'une réponse antivirale de type Th1, avec un ratio plus élevé de cytokines Th2/Th1 chez les nourrissons atteints de forme grave^{152,161}. Ce mécanisme immunopathologique a été mis en évidence sur la base des résultats des premiers essais vaccinaux dans les années 1960, où les enfants décédés présentaient des infiltrats inflammatoires riches en polynucléaires éosinophiles¹⁴⁵. Legg *et al.*,

ont examiné la réponse immunitaire de nourrissons infectés par le VRS en analysant les niveaux de cytokines dans des prélèvements nasaux et sanguins¹⁶². Une production importante d'IL-4 (cytokine de la réponse Th2) a été associée à des signes d'obstruction bronchique et aux formes sévères de la maladie sans différence dans la charge virale initiale. Ces données suggèrent fortement un excès de réponses immunitaires de type 2 et/ou une déficience de type 1 dans la pathogenèse de la bronchiolite à VRS chez le nourrisson.

En résumé, la réponse immunitaire innée des nourrissons est faible et incomplète ce qui induit une réponse immunitaire adaptative biaisée avec une forte réponse Th2 et une faible réponse Th1. A noter que d'autres études ont mis en évidence une corrélation entre la charge virale et la sévérité des symptômes¹⁶³. La question du rôle respectif du virus et de la réponse immunitaire dans la sévérité des symptômes reste donc ouverte.

3.3 Primo-infection et réinfection chez les nourrissons

Il est important de noter que des différences dans l'état immunitaire peuvent moduler les réponses moléculaires et cellulaires pendant l'infection par le VRS. Il existe des différences entre une primo-infection chez un nourrisson naïf et une réinfection chez un enfant plus âgé¹⁶⁴.

Lors d'une primo-infection, les nouveaux nés sont souvent plus sensibles aux infections par rapport aux enfants plus âgés, leur réponse immunitaire innée étant faible (faibles taux de cytokines, signalisation TLR immature, altération des fonctions présentatrices d'antigènes et diminution d'activation des lymphocytes T)^{155,164}. De plus, la composition cellulaire du poumon néonatal favorise naturellement le développement d'une réponse immunitaire de type Th2 associée à une hyperéosinophilie, une augmentation de sécrétion du mucus et une hyperréactivité bronchique. La réponse immunitaire adaptative est donc biaisée chez les nourrissons induisant des formes plus sévères de la maladie¹⁶⁵. La réponse inflammatoire initiée par l'infection à VRS contribue à l'immunopathologie puisque les polynucléaires et les chemokines pro-inflammatoires recrutés dans les bronches entraînent la destruction directe des cellules infectées en endommageant aussi les tissus environnants⁵⁸.

L'infection naturelle n'induit pas de protection. En effet, les réinfections par le VRS sont fréquentes, avec toutefois des signes cliniques atténués^{166,167}.

4 Sévérité de la maladie

La sévérité de l'infection par le VRS chez le nourrisson résulte d'une intense réplication virale, d'une importante inflammation pulmonaire et d'une altération de l'intégrité du parenchyme pulmonaire aboutissant à l'obstruction des conduits aériens. En effet, lors de la bronchiolite à VRS, il est constaté une destruction des cellules épithéliales ciliées, des infiltrats péri-bronchiques de lymphocytes et macrophages, une inflammation des sous muqueuses ainsi qu'une sécrétion excessive de mucus^{118,153}.

4.1 Facteurs favorisant la survenue de bronchiolite

Lors d'une première infection, entre 70 et 80% des enfants infectés ne développeront qu'une simple rhino-pharyngite tandis que les 20 à 30% restants développeront une bronchiolite de forme plus ou moins sévère¹²⁴. Cette différence de réaction face au virus peut être expliquée par différents facteurs favorisant pour certains encore discutés. Ces facteurs sont résumés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 Facteurs favorisant la survenue et/ou la sévérité de la bronchiolite

<u>Facteurs individuels</u>	Prématurité < 36 semaines Age < 2 ans Faible poids à la naissance <2,5 kg Naissance entre septembre et janvier <i>Sexe masculin</i> Composition du microbiome respiratoire <i>Absence d'allaitement</i> Maladie pulmonaire chronique Cardiopathie congénitale Prédisposition génétique Immunodépression <i>Condition socio-économique</i>
<u>Facteurs environnementaux</u>	<i>Fréquence d'exposition au virus</i> (Vie en collectivité, Mode de garde, Fratrie) Exposition à des toxiques (Tabagisme passif, Pollution)

A noter que dans le tableur les facteurs **en gras** sont associés à **la survenue et à la sévérité** de la bronchiolite et les facteurs *en italique* sont associés *uniquement à la survenue* de la bronchiolite.

L'âge est le principal facteur de risque. Les nourrissons de moins d'un an sont plus à risque d'une forme sévère de la maladie¹²⁴. En effet le faible diamètre des voies respiratoires des nourrissons favorise l'obstruction des voies aériennes lors de l'infection^{85,155}. De plus, il a été observé que les taux d'hospitalisation dus aux bronchiolites à VRS sont les plus hauts entre 1 et 3 mois après la naissance, ce qui correspondrait à l'âge où la concentration d'anticorps maternels serait en baisse¹⁶⁸. Pour finir, comme décrit auparavant, la réponse immunitaire innée des nourrissons est faible^{155,164}, et leur réponse immunitaire adaptative est biaisée¹⁶⁵. Le faible poids à la naissance (< 2,5 kg) est aussi un facteur qui peut s'avérer important³⁰. Une méta-analyse a mis en évidence que le fait d'avoir un faible poids à la naissance constituait un facteur de risque d'hospitalisation chez les enfants de moins de cinq ans (Odd Ratio (OR) à 1,91)³⁰.

Des études ont également révélé que la période de naissance pouvait avoir un impact sur le risque de développer des formes sévères et d'être hospitalisé. En effet, les enfants nés entre septembre et janvier seraient plus à risque en raison de leur jeune âge (<3 mois) en début de saison hivernale du VRS^{169,170}.

Tout comme dans d'autres infections respiratoires virales, certaines études ont indiqué que le sexe masculin est associé à des formes plus sévères d'infections¹⁷¹.

La prématurité (<36 semaines d'aménorrhée), l'absence d'allaitement maternel, la malnutrition, la présence de maladie pulmonaire chronique, d'une cardiopathie congénitale, d'un déficit immunitaire (VIH ou prédisposition génétique), d'un polyhandicap sont également des facteurs de risque de développer une forme sévère de la maladie^{30,118,172}.

Parmi les facteurs favorisant la survenue de bronchiolite, on trouve comme pour la plupart des infections respiratoires, le contexte social ou économique défavorable et le niveau socioéducatif de la famille^{30,118}.

La composition du microbiome respiratoire peut également être un facteur favorisant la survenue de bronchiolite et de forme grave de la maladie (détaillé dans la section 3.6 et 4.4 du chapitre 3).

Enfin, certains facteurs liés à l'environnement de l'enfant peuvent être liés à la survenue ou à la sévérité de la bronchiolite tel que le tabagisme passif, la garde en collectivité, une fratrie nombreuse ou encore une virulence plus importante de l'épidémie^{30,172}.

Cependant, il est important de noter que certains enfants développent des formes sévères de la maladie bien qu'ils ne présentent aucun des facteurs de risque détaillés ci-dessus. Des

études sur l'association entre des mutations de gènes de l'immunité (détaillés dans la **section 4.4.1** de ce chapitre) et des cas de bronchiolites sévères ont été faites et ont mis en évidence l'importance de la réponse immunitaire innée sur la survenue de bronchiolite et l'augmentation de la sévérité de la maladie^{173,174}.

4.2 Critères d'hospitalisation des bronchiolites

La décision d'hospitaliser repose en grande partie sur le jugement de l'état clinique et respiratoire du nourrisson. Lorsque la décision d'une éventuelle hospitalisation doit être prise, les médecins prennent en compte le fait que la maladie a tendance à s'aggraver au cours des 72 premières heures, ce qui nécessite de bien prendre en compte les facteurs de risque ainsi que le contexte familial avant de renvoyer chez lui un patient¹⁷⁵.

Plusieurs critères sont observés afin d'évaluer la gravité de la maladie et d'orienter la prise en charge du nourrisson¹¹⁸, parmi lesquels :

- L'altération de l'état général (comportement anormal, hypotonie, geignement)
- La fréquence respiratoire (FR) > 60 cycles/minutes et la fréquence cardiaque
- L'utilisation des muscles accessoires (signes de lutte)
- La survenue d'apnée ou présence d'une cyanose
- La prise alimentaire (évaluation par rapport aux apports habituels)
- La saturation pulsée en oxygène (SpO2) mesurée par oxymètre de pouls en air ambiant.

Cependant, le jeune âge des nourrissons, l'évolution instable des infections à VRS, et l'incapacité à prévoir si une assistance respiratoire ou alimentaire sera nécessaire, mènent souvent à une hospitalisation pour surveillance chez les nourrissons les plus jeunes, même en l'absence de symptômes inquiétants.

4.3 Classification des patients et score de gravité

De nombreux scores ont été proposés dans la littérature pour évaluer la gravité des infections des voies respiratoires¹⁷⁶ et de la bronchiolite¹⁷⁷. Ces scores de sévérité peuvent être utiles pour les praticiens de soins de santé pour reconnaître cliniquement l'infection mais aussi pour évaluer la sévérité des symptômes et ainsi améliorer la prise en charge des patients au cas par cas. Il n'existe pas à l'heure actuelle de gold standard international pour scorer la gravité de la bronchiolite¹⁷⁸. En effet, l'hétérogénéité des populations étudiées et la différence de composition des scores rendent difficile le choix d'un score « standard » et valide dans sa totalité. Les recommandations concernant la classification des patients selon les critères de gravité sont différentes entre les pays^{118,178}.

Une synthèse (non exhaustive) des scores de gravité les plus utilisés pour la classification des patients atteints de VRS est présenté dans le **tableau 4**. Globalement, ces scores sont basés sur l'observation de 2 à 9 critères, parmi lesquels étaient souvent retrouvés l'utilisation des muscles accessoires, la présence de tirage intercostal, la présence de sibilants, la FR et la SpO₂. Les scores « Respiratory Distress Assessment Index » RDAI¹⁷⁹, les score de Tal¹⁸⁰ et celui de Wang¹⁸¹ sont les trois les plus souvent utilisés¹¹⁸.

Dans de nombreuses études, aucun score n'est utilisé et la gravité est définie en fonction de certains critères déjà utilisés dans les scores précédemment cités tels que la fréquence respiratoire, la présence de sibilants ou tirage, la saturation en oxygène ou l'état général^{182,183} ou encore de différents paramètres isolés tels que la durée de l'hospitalisation, la durée des symptômes, de l'admission aux soins intensifs, du recours à une assistance respiratoire (oxygénothérapie, ventilation mécanique)^{184,185}. Cependant, ces paramètres sont variables selon les pratiques cliniques et les pays, leur fiabilité pour déterminer la sévérité de l'infection à VRS est donc limitée.

Tableau 4 Synthèse des scores de gravité les plus utilisés pour la classification des patients atteints de VRS

Adapté de Rodriguez-Martinez *et al.*, 2018¹⁸⁶.

Critères utilisés pour le calcul du score	Score clinique Tal ¹⁸⁰	RDAI ¹⁷⁹	Score de Wang ¹⁸¹	Score clinique Tal modifié ¹⁸⁷	Score de Wang modifié ¹⁸⁸	RACS ¹⁸⁹	Score OMS ¹⁹⁰	Global Respiratory Severity Score ¹⁹¹	Score HAS 2019 ¹¹⁸
Utilisation des muscles accessoires	×			×			×		×
Sibilants (Wheezing)	×	×	×	×	×	×	×	×	
Fréquence respiratoire	×		×	×	×	×	×	×	×
Fréquence cardiaque					×				×
Cyanose	×							×	
Etat Général			×					×	×
Tirage		×	×		×	×	×	×	
Saturation en oxygène				×	×		×	×	×
Age								×	
Léthargie								×	
Rales/Rhonchi								×	
VRS positif en PCR							×		
Toux							×		
Incapacité à manger							×		×
Malaise							×		

Abréviations: RDAI: Respiratory Distress Assessment Index; RACS: Respiratory Assessment Clinical Score; HAS: Haute Autorité de Santé ; WHO: World Health Organization.

4.4 Biomarqueurs associés à la sévérité des infections à VRS

4.4.1 Polymorphismes génétiques associés à la sévérité

Des polymorphismes génétiques humains ont été identifiés dans plusieurs gènes comme étant associés à une prédisposition à une maladie grave liée à l'infection par le VRS^{45,46}. Des associations significatives de variations génétiques avec la gravité du VRS ont principalement été signalées dans :

- les gènes impliqués dans la réponse immunitaire Th1,
- les cytokines associées au recrutement des neutrophiles,
- d'autres cytokines pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires,
- les protéines tensioactives,
- les récepteurs du VRS sur l'épithélium respiratoire,
- les récepteurs cannabinoïdes,
- les récepteurs de la vitamine D.

Une liste non exhaustive des polymorphismes spécifiques de chaque gène est présentée dans le tableau ci-dessous (**Tableau 5**).

Tableau 5 Liste des polymorphismes génétiques associés à une prédisposition à une maladie grave lié à l'infection par le VRS chez l'enfant

Adapté de Tahamtan et al.,2019⁴⁵ et Oner et al.,2020⁴⁶.

Catégorie de gènes	Gènes	Mutations	Publications
Chimiokines	<i>CCR5</i>	-2459A/G & -2554G/T	192
	<i>RANTES</i>	-28C/G & -403G/A	193
		-403G/A	194
	<i>CX3CR1</i>	T280M	195
Cytokines	<i>IL-4</i>	-589C/T	196
		-590T/C	197
	<i>IL-4Ra</i>	Q551R & I50V	197,198
	<i>IL-13</i>	R130Q	199
		-1112T/C	200
	<i>IL-6</i>	-174G/C	201
	<i>IL-8</i>	-251A/T	202–204
		-251A/T & -781C/T	205,206

Catégorie de gènes	Gènes	Mutations	Publications
Cytokines	<i>IL-10</i>	-1117A/G	207
		-1082G/A	201
		-592C/A	208,209
		-1082G/A & -819C/T & -592C/A	210
	<i>IL-18</i>	133G/C	211
	<i>IFN-γ</i>	+874T/A	201
	<i>IFNL4</i>	G/TT	212
	<i>IL-9</i>	C361T	213
	<i>IL1RL1</i>	A/G	214
	<i>TNF-α</i>	-308G/A	201,208
	<i>TGFB1</i>	rs1800471	201
	<i>ICAM-1</i>	K469E	215
	<i>VCAM-1</i>	-833C/T	215
	<i>E-Selectin</i>	S128R & H468Y	215
Récepteurs PRR	<i>TLR4</i>	D299G & T399I	158,216–218
	<i>CD14</i>	-550C/T	219
		-159C/T	220,221
	<i>TLR3</i>	L412F	222
	<i>TLR5</i>	rs5744174	223
	<i>TLR7</i>	rs179008	224,225
	<i>TLR9</i>	A-2622G	226
		A-2871G	227
Protéines du surfactant	<i>SP-A2</i>	A223K	228
		T9S	229
	<i>SP-B</i>	-39G/T & T131I	230
	<i>SP-C</i>	N138T & N186S	231
	<i>SP-D</i>	M11T & T160A	232,233
Récepteurs opioïdes et cannabinoïdes	<i>OPRM1</i>	A118G	234
	<i>CNR2</i>	Q63R	235
Récepteurs de Vitamine D	<i>VDR</i>	T1M	209,236,237
		T1M & T1216C	238
		T162C	239
Autres gènes	<i>JUN</i>	-750G/A	236
	<i>IFNA5</i>	-45C/T	236
	<i>NOS2</i>	-2757G/A	236
	<i>MX1</i>	V379I	240
	<i>MMP3</i>	A790G	241
	<i>CC10</i>	A38G	242
	<i>TIMP1</i>	rs4898	241
	<i>DPB</i>	rs7041	243
	<i>FCER1A</i>	-66C/T	236

Abréviations : CCR5 : C-C chemokine receptor type 5 ;RANTES : Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted ; CX3CR1 : C-X-C motif chemokine receptor 1 ; IL : interleukine ; IL-R : Interleukine Receptor ; IFN : interferon ; IFNL4 : Interferon Lambda 4 ; IL1RL1 : Interleukin 1 Receptor Like 1 ; TNF : Tumor Necrosis Factor ; TGFB1 : Transforming Growth Factor Beta 1 ; ICAM : Intercellular Adhesion Molecule ; VCAM-1 : Vascular cell adhesion protein 1 ; TLR : Toll-Like-Receptor ; CD14 : cluster of differentiation 14 ; SP-A2/B/C/D : Surfactant Protein A2/B/C/D ; OPRM1 : Opioid Receptor Mu 1 ; CNR2 : Cannabinoid Receptor 2 ; VDR : Vitamin D Receptor ; IFNA5 : Interferon Alpha 5 ; NOS2 : Nitric Oxide Synthase 2 ; MX1 : MX Dynamin Like GTPase 1 ; MMP3 : Matrix Metalloproteinase 3 ; CC10 : Clara cell 10-kDa protein ; TIMP : Tissue Inhibitor of Metalloproteinase ; FCER1A : Fc Fragment Of IgE Receptor Ia.

4.4.2 Réponse transcriptomique associée à la sévérité

Chez les nourrissons atteints de bronchiolite sévère, il a été observé une surexpression des gènes associés à la fonction neutrophile et aux réponses inflammatoires et une sous-expression des gènes associés aux lymphocytes B et T et aux cellules NK^{46,155,244}. De nombreuses cytokines, chimiokines et autres molécules immunitaires impliquées dans la réponse immunitaire à l'infection par le VRS ont été associées à des effets protecteurs ou délétères, en fonction de la sévérité de la maladie chez les patients étudiés. Une limite pour la comparaison de ces études est l'absence de recommandations standardisées concernant l'évaluation de la sévérité comme mentionné précédemment (**paragraphe 4.3**)⁴⁶.

Une liste non exhaustive des cytokines, chimiokines et autres molécules immunitaires associées à la sévérité de la maladie à VRS dans des échantillons respiratoires sont énumérées dans le tableau (**Tableau 6**).

Tableau 6 Liste non exhaustive des cytokines, chimiokines et autres molécules immunitaires associées à la sévérité de la maladie à VRS dans des échantillons respiratoires provenant d'enfants de moins de 5 ans

Adapté de Russel *et al.*, 2017¹⁵⁵, Oner *et al.*, 2020⁴⁶ et Rajagopala *et al.*, 2021²⁴⁴.

Catégorie de Molécules	Gènes	Corrélation positive (+) ou négative (-) avec la sévérité	Publications
Chimiokines	MCP-1 (CCL-2)	(+)	245
		(-)	246
		(na)	157,247
	MIP-1 α (CCL-3)	(+)	245
		(-)	246
	MIP-1 β (CCL-4)	(+)	245,248
Chimiokines	RANTES (CCL5)	(-)	244,246,247
		(+)	246
		(-)	249
	CCL-8	(na)	245,250
	IP-10 (CXCL-10)	(-)	244
	Eotaxine (CCL-11, CCL-24, CCL-26)	(-)	244,246
Cytokines	IFN- γ	(-)	246
		(na)	253,254
		(+)	157,247,249,251,252
	TNF- α	(-)	245
		(na)	246
		(+)	157,247,250,254,255
	sCD25	(-)	246
	IL-1 α	(-)	246
	IL-1R- α	(+)	245
	IL-1 β	(+)	245,256
		(-)	246,255
		(na)	157,247,254,257
	IL-2	(+)	245
		(na)	246,247,254,257,258
Cytokines	IL-4	(-)	246
		(na)	247,253,257
	IL-6	(+)	245,248,256,259
		(-)	247
		(na)	157,250,257
	IL-7	(+)	245
IL-8	(+)	245,253,256	

Catégorie de Molécules	Gènes	Corrélation positive (+) ou négative (-) avec la sévérité	Publications
Cytokines	<i>IL-8</i>	(-)	246,247
		(na)	254,257
	<i>IL-9</i>	(na)	246
		(+)	250
	<i>IL-10</i>	(-)	247
		(na)	157,251,257
	<i>IL-12</i>	(+)	246
	<i>IL-13</i>	(na)	246
	<i>IL-17A</i>	(-)	255
	<i>IL-18</i>	(+)	246
	<i>IL-23</i>	(-)	255
	<i>IL-33</i>	(na)	246
	<i>sTRAIL</i>	(na)	260
	<i>sICAM-1</i>	(+)	250
		(-)	250,261,262
Substances P	<i>PPTA</i>	(-)	252
Autres	<i>IFN-λ</i>	(-)	263,264
	<i>IFN-α</i>	(+)	245
		(na)	265
	<i>G-CSF</i>	(-)	259,266
	<i>EGF-R</i>	(+)	245
	<i>FGF-6</i>	(-)	157
	<i>HGF</i>	(+)	245
	<i>PDGF-ββ</i>	(-)	157
	<i>IFIT1</i>		
	<i>IFIT2</i>		
	<i>IFIT3</i>		
	<i>IFI6</i>		
	<i>IFITM1</i>	(-)	244
	<i>IFITM3</i>		
	<i>MX1</i>		
	<i>ACOD1</i>		
Ratio de cytokines	<i>RANTES / IL-10</i>	(+)	267
	<i>IL-8/RANTES</i>	(+)	267
	<i>TNF-R1/RANTES</i>	(+)	267
	<i>IL-6/TNF-α</i>	(-)	268

Abréviations : (-) association negative/délétère ; (+) association positive/protectrice ; (na) pas d'association trouvée. MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1 ; MIP : Macrophage Inflammatory Protein ; CCL : C-C motif chemokine ligand ; RANTES : Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted ; IP : Interferon gamma-induced Protein ; CXCL : C-X-C Motif Chemokine Ligand ; IFN : Interferon ; TNF : Tumor Necrosis Factor ; CD : cluster of differentiation ; IL : Interleukine ; IL-R : Interleukine Receptor ; TRAIL : Tumor-necrosis-

factor Related Apoptosis Inducing Ligand ; ICAM : Intercellular Adhesion Molecule ; PPTA : pré-pro-tachykinine A ; G-CSF : Granulocyte Colony-Stimulating Factor ; EGF-R : Epidermal Growth Factor Receptor ; FGF- β : fibroblast growth factor ; HGF : Hepatocyte growth factor ; PDGF : Platelet derived growth factor ; IFIT : Interferon Induced Protein With Tetratricopeptide Repeats ; IFI6 : Interferon Alpha Inducible Protein ; IFITM : Interferon-induced transmembrane proteins ; MX1 : MX Dynamin Like GTPase 1 ; ACOD1 : Aconitate Decarboxylase 1.

Bien qu'un large éventail de biomarqueurs ait été associé à la sévérité de l'infection à VRS, des biomarqueurs robustes et validés font défaut. En effet, certaines études obtiennent des données contradictoires, ce qui peut être expliqué par : la petite taille des cohortes ou du nombre d'échantillons analysés ; la difficulté pour obtenir des groupes homogènes sur tous les facteurs de risque (dont l'âge gestationnel, le poids à la naissance, le tabagisme maternel, les frères et sœurs et la garde de jour ; et la grande variabilité inter-études de la définition de la maladie grave due au VRS.

Des études de plus grande envergure sont nécessaires pour s'assurer de l'exactitude des différents résultats et ainsi valider des biomarqueurs. Des recherches supplémentaires incluant les interactions avec le microbiome sont prometteuses pour mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs.

Chapitre 3 : Microbiome respiratoire

La majorité des études portant sur le microbiome se sont concentrées sur l'intestin en raison de la biomasse importante présente et de la facilité de prélèvement. Le microbiome respiratoire a été largement moins étudié que celui des autres sites du corps humain, le poumon étant même considéré comme stérile jusqu'en 2010²⁶⁹.

La récente pandémie COVID-19 a favorisé les efforts visant à mieux comprendre l'organisation du microbiome respiratoire et son évolution de la naissance à l'âge adulte, ainsi que son interaction avec les agents pathogènes externes et le système immunitaire de l'hôte²⁷⁰. De nouvelles données dans la littérature scientifique actuelle montrent que la composition du microbiome respiratoire diffère selon les conditions de santé du patient et peut contribuer aux processus physiopathologiques associés aux maladies des voies respiratoires²⁷⁰.

Dans ce chapitre, nous aborderons la connaissance actuelle sur le microbiome respiratoire et sa composition chez l'enfant, ainsi que l'impact du microbiome respiratoire sur la survenue et la sévérité des IRA.

1 Généralités

Le terme de « microbiome » est relativement récent puisqu'il a été proposé en 2001 par le prix Nobel Joshua Lederberg pour désigner l'ensemble des micro-organismes commensaux, symbiotiques, et/ou pathogènes qui vivent à l'intérieur du corps humain (peau, bouche, intestin, etc.)²⁷¹. Par la suite, les relations entre le microbiome et le corps humain ont fait l'objet de différentes études plus approfondies notamment dans le but de déterminer le rôle potentiel du microbiote dans la santé et la maladie^{270,272}. A noter que l'emploi des termes de « microbiote » et de « microbiome » reste parfois controversé dans la littérature. La terminaison « biote » (microbiote) est souvent utilisée pour désigner l'ensemble des microorganismes résidant dans un site donné, tandis que la terminaison « biome » peut avoir 2 définitions, l'une d'un point de vue écologique et l'autre d'un point de vue génomique. En effet, le terme de microbiome peut être utilisé pour désigner le microbiote

et son environnement (cellules humaines, protéines et métabolites de l'environnement), c'est le point de vue écologique. D'un point de vue génomique, le microbiome (bactériome, virome, mycobiome) désigne l'ensemble des génomes des microorganismes (bactéries, virus, phages et champignons) composant la communauté microbienne d'un site donné. Les termes « microbiote » et « microbiome » sont même confondus dans certaines publications. Ici, nous utiliserons le terme microbiome pour désigner le microbiote et son environnement.

En 2008, les projets américain « Human microbiome project » (HMP)²⁷³ et européen « Metagenomics of the Human Intestinal Tract » (MetaHIT)²⁷⁴ ont été lancés afin d'identifier et caractériser la composition du microbiome de différents sites du corps humain (tube digestif, voies nasales, cavité buccale, peau et voies urogénitales). Initialement, l'étude du microbiome pulmonaire n'était pas prévue car contrairement au 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. Grâce au développement des techniques de séquençage à haut-débit, le mythe selon lequel le poumon serait stérile a pu être brisé, élargissant ainsi le champ de recherche autour du microbiome humain. Deux études publiées en 2010 et 2011 ont mis en évidence la présence de bactéries dans le tractus respiratoire bas (biopsies bronchiques et LBA) chez des patients atteints de pathologies respiratoires (BPCO et asthme) et des sujets sains^{269,275}. Le risque de contamination des échantillons par le microbiome du tractus respiratoire haut lors du passage du bronchoscope ayant été écarté dans ces études, le poumon a été reconnu comme une niche écologique à part entière, portant sa propre communauté microbienne. En 2020, près de 21 361 publications correspondent au mot-clé "microbiome" sur la banque de donnée PubMed. Cependant, on note que seule une petite part se concentre sur l'étude du microbiome respiratoire (739 publications seulement). De plus, la plupart des publications porte sur les perturbations liées à des maladies respiratoires chroniques (tels

que l'asthme, la mucoviscidose et la BPCO) et peu d'étude se concentre sur le rôle et les perturbations du microbiome lors d'une infection virale.

Actuellement, les principales recherches sur le microbiome respiratoire portent sur la manière dont le microbiome respiratoire sain est établi ainsi que sur les facteurs qui vont interférer ou modifier son développement. Le rôle que le microbiome respiratoire joue dans le développement et le maintien de la santé respiratoire humaine reste encore à établir.

2 Méthodes d'étude du microbiome respiratoire

Les techniques de diagnostic de routine ciblent un nombre limité de micro-organismes pathogènes et sont peu adaptées à une approche globale visant à décrire l'ensemble des micro-organismes présents au sein des voies respiratoires et leur évolution²⁷⁶. C'est pourquoi les approches de métagénomiques sont essentielles pour caractériser l'ensemble des micro-organismes présents dans un échantillon²⁷⁶. En effet, le séquençage de l'ensemble du génome de nombreux agents pathogènes présents dans un prélèvement est possible en une seule réaction. Une fois les séquences générées, il est possible de comparer ces séquences avec des bases de données publiques de séquences microbiennes et ainsi de détecter la présence de pathogènes dans un échantillon clinique sans à priori.

2.1 Metabarcoding

Le metabarcoding consiste à l'amplification puis au séquençage d'une région ciblée du génome. Un exemple d'approche ciblée est le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S, gène bactérien universel décrit comme un marqueur permettant de classer taxonomiquement les espèces^{276,277}. D'une longueur d'environ 1,5 kb, le gène codant pour l'ARNr 16S est composé de 9 régions hypervariables (V1 à V9) et 10 régions hautement conservées (C1 à C10). Les régions constantes servent pour la production d'amorces permettant l'amplification des régions variables sur lesquelles reposent la classification taxonomique²⁷⁸ (**Figure 5**).

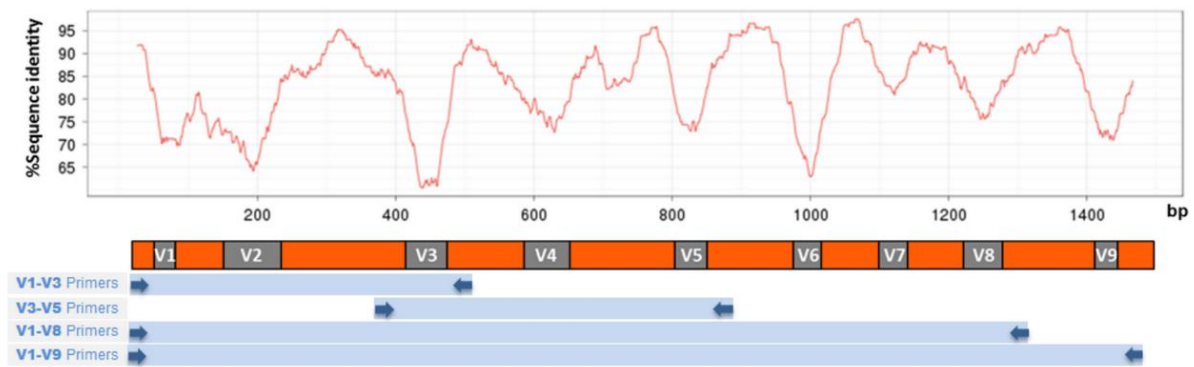


Figure 5 Schéma montrant les similarités des séquences d'ARNr 16S entre plusieurs bactéries

Figure extraite du site Introduction à la métagénomique²⁷⁹.

Le graphique montre le pourcentage de similarité entre différentes séquences d'ARNr 16S de plusieurs bactéries. Les régions conservées avec le plus grand pourcentage d'identité entre les séquences sont représentées en orange sous le graphique. Les régions variables avec un faible pourcentage d'identité entre les séquences sont représentées en gris et numérotées de V1 à V9. Sous le graphique figurent également les différents couples d'amorces utilisables.

De plus, les études se contredisent sur le choix de la région variables à séquencer, indépendamment du type de microbiote^{280–283}. Cependant toutes les études s'accordent à dire que le choix de la région variable est important puisque l'utilisation d'amorces non adaptées peut conduire à une surreprésentation ou à une sous-représentation d'une ou plusieurs espèces de bactéries au sein d'une communauté et donc à des conclusions biologiques discutables.

Dans notre étude sur le microbiome respiratoire, nous avons séquencé les régions V1-V3 pour déterminer la diversité bactérienne de nos échantillons de la même manière que dans une autre étude de notre laboratoire réalisée par Pichon *et al.*, 2017²⁸⁴.

Les méthodes de metabarcoding sont extrêmement sensibles aux contaminations et ne permettent pas d'obtenir une quantification absolue du nombre de bactéries présentes dans le prélèvement. En effet, les bactéries présentent un nombre de copies variables de leur opéron ribosomique (1 à 15 copies selon l'espèce), de ce fait la quantification de l'ARNr

16S ne renseigne pas sur la quantité de bactéries présentes dans l'échantillon considéré et ne peut donc pas être utilisée comme méthode quantitative absolue²⁸⁵.

Il existe des méthodes amplicons pour l'étude du mycobiome : ciblant soit la petite sous-unité de l'ARNr 18S, la grande sous-unité de l'ARN 28S ou la région ITS (Internal Transcribed Spacer). L'ITS est tout particulièrement utilisé car il est plus diversifié et permet un meilleur positionnement phylogénétique faisant de lui la référence pour le typage des espèces en mycologie²⁸⁶.

2.2 Métagénomique

Le terme de métagénomique a été proposé en 1998 par Handelsman et désigne le séquençage direct de l'ADN et/ou de l'ARN dans un milieu, permettant ainsi d'identifier les génomes de tous les membres d'une communauté²⁸⁷. À l'inverse du metabarcoding, la métagénomique consiste au séquençage de l'ensemble des génomes présents dans un milieu/échantillon sans sélection de zone spécifique. Contrairement aux bactéries et aux champignons, il n'existe pas de gène universel présent chez tous les virus et permettant leur classification⁵⁵. Cette absence de séquence conservée constitue un défi important pour détecter et identifier l'ensemble des virus présents dans un échantillon. De plus, la diversité des virus (en termes de taille, de structure ou de génome) et l'existence de virome extracellulaire et intracellulaire, rendent difficile l'élaboration d'un protocole unique permettant d'étudier le virome dans sa globalité. Enfin, une autre difficulté est liée au fait que les virus possèdent des génomes de petites tailles en comparaison à celui des bactéries ou des cellules humaines. Les séquences virales représentent donc une partie infime par rapport au total des séquences générées lors du séquençage complet d'un échantillon, c'est pourquoi il est nécessaire d'adapter les protocoles en ajoutant une étape de purification des particules virales ou d'enrichissement en particules virales^{55,276,288}. La purification des particules virales se fait via une ultracentrifugation qui permet l'élimination des contaminants bactériens et des cellules humaines. Cette technique est cependant compliquée à réaliser et est difficilement applicable pour un grand nombre d'échantillons,

limitant son utilisation en routine hospitalière. La technique la plus accessible et celle utilisée pour Vibraflu est donc l'enrichissement viral en 3 étapes (centrifugation – filtration – digestion par des nucléases). Malheureusement cette technique ne permet pas d'éliminer totalement les bactéries et les cellules humaines. Dans les deux cas, ces étapes sont suivies d'une amplification aléatoire afin de séquencer l'intégralité de l'ADN et/ou de l'ARN (après transcription inverse en ADNc)^{55,276}.

Bien que les protocoles de métagénomique globale soient considérés comme non biaisés, chaque étape du protocole peut induire des biais. Par exemple, l'étape d'enrichissement favorise l'extraction du virome extracellulaire ou encore l'étape d'amplification qui peut favoriser l'amplification des virus avec un génome à ADN simple brin⁵⁵. Enfin, un autre problème qui freine l'implémentation de la métagénomique est la difficulté d'analyse bioinformatique des résultats, avec jusqu'à 50% des séquences obtenues lors d'études de virome qui ne possèdent pas de similarité avec des séquences virales connues (matière noire virale). L'étude de cette matière noire par des analyses bioinformatiques complexes utilisant de l'assemblage de novo sera importante pour la suite, puisqu'elle permettra d'identifier de nouveaux pathogènes ou micro-organismes tels que le crAssphage, le bactériophage le plus abondant dans le virome entérique humain²⁸⁸.

Grâce au développement de protocole permettant le séquençage de l'ADN et de l'ARN en même temps, et aux diminutions des coûts de séquençage, l'implémentation de protocole de métagénomique virale dans les laboratoires de diagnostic est en cours, avec comme principale application actuellement l'identification de pathogènes dans des infections virales sévères sans étiologies (diagnostic de recours)²⁸⁹.

2.3 Limites des études du microbiome respiratoire

Plusieurs paramètres limitent encore l'utilisation du mNGS comme outils de diagnostic pour les pathologies respiratoires.

Échantillonnage

Un des premiers défis associés à l'étude du microbiome respiratoire est l'obtention d'échantillons des voies respiratoires sans contaminant et contenant assez de matériel génétique pour être séquencé par la suite. En effet, la charge microbienne provenant des voies respiratoires basses est faible en particulier chez les individus en bonne santé. Cette faible biomasse limite l'obtention de génomes complets présents dans les échantillons, et de ce fait peut empêcher la bonne assignation taxonomique et l'interprétation des données sur le microbiome^{290,291}. De plus, il existe un risque élevé de contamination croisée des échantillons des voies respiratoires inférieures avec les communautés résidant dans les voies respiratoires supérieures qui possèdent une biomasse beaucoup plus élevée^{277,291}. A noter que quel que soit la méthode d'échantillonnage, il existe également un risque de contamination lié à l'environnement, aux réactifs et aux manipulateurs. Le développement de procédures d'échantillonnage standard ainsi que l'utilisation de contrôles négatifs à différents stades de l'échantillonnage et du workflow peuvent aider à identifier et à exclure les séquences provenant de sources contaminantes²⁹¹. Enfin, concernant l'échantillonnage, il est important de noter que la plupart des études étant principalement orientées sur la composante bactérienne du microbiome, l'ADN était extrait sans chercher à préserver ou à récupérer l'ARN²⁸⁸. Pourtant, une grande partie des virus respiratoires eucaryotes connus sont des virus à ARN et des études récentes ont démontré qu'il existe aussi une forte diversité de phages ARN²⁹². Ainsi, afin d'obtenir une vue plus complète du virome, il est essentiel que les études sur le virome soient conçues de telle sorte que les virus à ARN soient préservés dans les échantillons.

Analyse bio-informatique

La métagénomique est un vrai défi pour la bio-informatique notamment à cause du volume de données très important produit lors d'un séquençage. A titre d'exemple, une expérience NGS sur un échantillon clinique peut générer plusieurs dizaines de millions de séquences qu'il faut pouvoir comparer aux dizaines de milliers de séquences des bases de données. Ce

volume de données important pose des problèmes à toutes les étapes de l'analyse. Il faut donc être capable de concevoir, exploiter, maintenir et améliorer des méthodes d'analyses bio-informatiques performantes permettant de traiter ces données. Il est donc nécessaire d'avoir accès à une ingénierie logicielle, à des capacités matérielles de calcul ainsi qu'à une expertise bio-informatique qui restent à l'heure actuelle un frein pour beaucoup d'infrastructures hospitalières.

Temps de rendu des résultats

La question du temps de rendu des résultats se pose aussi. Aujourd'hui et en situation optimale, il est possible de rendre un résultat d'analyse NGS en 12h à partir de la mise à disposition de l'échantillon²⁹³. Dans certaines circonstances, ce temps bien que plus court que les méthodes de culture bactérienne, reste trop long comparé aux quelques heures nécessaires à un rendu de résultat de PCR, notamment pour les besoins des unités de soins intensifs ou lorsque le choix du traitement dépend du résultat.

Absence de protocole standard

Pour permettre la comparaison des données sur le microbiote, la normalisation de chaque étape du processus de génération et d'analyse des données de séquençage est essentielle. L'absence de protocole standard (stockage des échantillons, isolement de l'ADN et de l'ARN, choix de la région variable de l'ARNr 16S à séquencer, mode de séquençage) et de pipeline de bio-informatique et d'analyse des données limitent la possibilité de réaliser des analyses comparatives ou des méta-analyses précises^{291,294}.

3 Bactériome respiratoire

3.1 Généralités

Depuis la découverte de la « non-stérilité » des poumons, la question de l'origine du microbiome pulmonaire se pose. Il existe différentes études et hypothèses intégrant l'impact de l'environnement et des caractéristiques liées à l'hôte, ou encore le lien avec les

microbiomes des autres sites du corps tels que la cavité buccale, les voies respiratoires hautes ou encore le tube digestif^{8,290,291,294,295}.

Le poumon sain n'est colonisé que par une population limitée de bactéries qui sont maintenues par un équilibre entre l'immigration, l'élimination et la croissance microbienne. Il est reconnu qu'un hôte est capable de développer des relations avec leurs bactéries symbiotiques, qui sont essentielles pour une bonne santé. Cependant, les changements locaux qui modifient cette symbiose peuvent entraîner des maladies, telles que les infections respiratoires, les allergies et l'asthme²⁷². D'importantes études sont disponibles concernant pour la majorité le microbiome respiratoire bactérien. Bien qu'elles soient encore limitées, des preuves de plus en plus nombreuses suggèrent une association entre la composition du microbiome respiratoire et la gravité des maladies respiratoires pédiatriques notamment l'infection par le VRS et la prédisposition à des formes sévères d'infection à VRS pendant la petite enfance^{46,290}.

3.2 Acquisition du bactériome

L'acquisition du bactériome *in utero* ou à la naissance reste très débattue. Plusieurs études ont suggéré qu'il serait possible qu'une partie du microbiome respiratoire soit acquis pendant la grossesse *in utero*^{291,294,296}. En effet, certaines études ont mis en évidence la présence de micro-organismes oraux dans des échantillons de liquide amniotique et placenta humain chez jusqu'à 70% de femmes enceintes bien que cet environnement ait toujours été considérée comme stérile^{291,294,297,298}. Cette découverte laisse supposer que l'exposition du fœtus au microbiome placentaire de la mère pourrait contribuer à l'acquisition du microbiome pulmonaire du fœtus ainsi qu'influencer la maturation des cellules immunitaires^{290,297,299}. Cependant, un nombre croissant d'études ont remis en question la présence d'un microbiome « prénatal » identifiant la contamination comme un problème majeur. En effet, le liquide amniotique présentant une faible abondance bactérienne, ces études soulignent le risque de contamination par des bactéries présentes dans l'eau, les réactifs et l'environnement du laboratoire^{300,301}.

Bien que plusieurs études aient mis en avant la possibilité d'une acquisition du microbiome *in utero*, la majorité du microbiome d'un nouveau-né est acquise à la naissance et provient principalement de la mère⁸. Il a été démontré que la composition du microbiome colonisant les voies respiratoires supérieures au cours du premier jour de vie était fortement influencée par le mode d'accouchement^{290,295}. En effet, chez les nouveau-nés mis au monde par voie basse, les bactéries fécales, vaginales et cutanées sont prédominantes dans le nasopharynx alors que chez les nouveau-nés mis au monde par césarienne, les micro-organismes retrouvés dans le nasopharynx proviennent plutôt de la peau et de l'environnement^{290,295}.

Il est également possible que l'inhalation de micro-organismes présents dans l'air soit une source importante du microbiome pulmonaire²⁹⁹. De plus, certaines études ont également montré que le microbiome pulmonaire ressemble à celui des cavités buccales et nasales, ce qui suggère qu'une grande partie du microbiome pulmonaire provient des voies respiratoires supérieures²⁹⁰.

Enfin, d'autres études ont mis en évidence une ressemblance entre la composition des populations bactériennes pulmonaires et intestinales indiquant un potentiel partage de micro-organismes via la cavité pharyngée. Cette observation est probablement liée aux micro-aspirations de sécrétions salivaires qui permettent la dispersion des bactéries vers les voies respiratoires inférieures³⁰²⁻³⁰⁴.

Si le microbiome respiratoire à la naissance est initialement homogène, celui-ci se diversifie le long de l'appareil respiratoire sous l'effet de pressions sélectives locales et ceux tout au long des premières années de la vie⁸. Le temps nécessaire à l'établissement d'un microbiome respiratoire « stable » reste à déterminer²⁹¹.

3.3 Développement du microbiome

Les principales fonctions du système respiratoire supérieur sont de filtrer, chauffer et humidifier l'air qui le traverse avant qu'il n'atteigne les poumons. A cette fin, les voies respiratoires de l'homme adulte ont une surface d'environ 70m², soit 40 fois plus que la

surface de la peau²⁹¹. Toute cette surface est habitée par différentes communautés de micro-organismes dépendantes des niches anatomiques. Chaque région anatomique a ses propres caractéristiques (l'humidité, la température, la concentration en oxygène, le type de cellules épithéliales, le pH, la présence de métabolites etc.), induisant un microenvironnement propre à chacune d'elle²⁷². De ce fait, il existe des différences dans la composition et la densité du microbiome le long de l'arbre respiratoire (densité et diversité plus importante au niveau du tractus respiratoire supérieur)²⁹¹ (**Figure 6**).

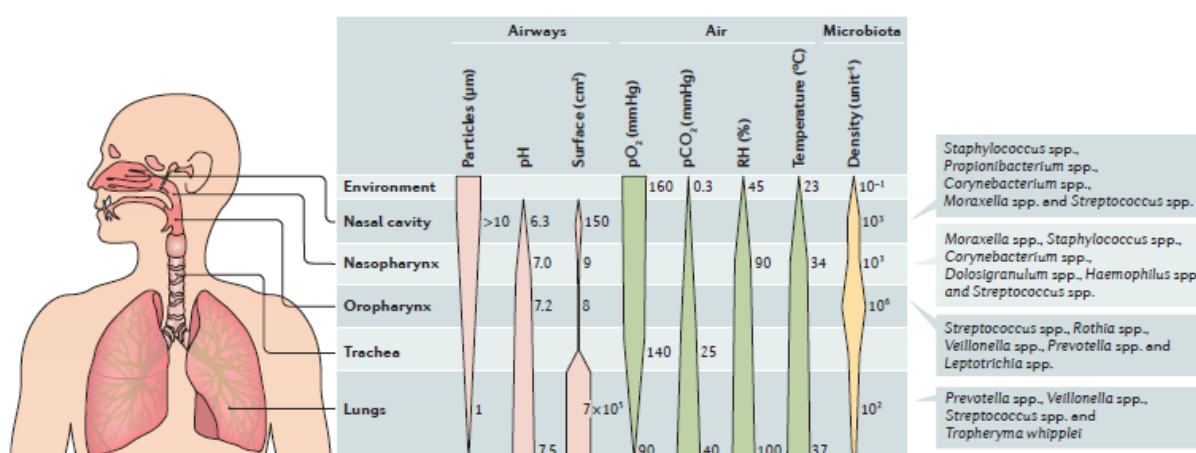


Figure 6 Physiologie et diversité des communautés bactériennes du système respiratoire

Figure extraite de l'article Man *et al.*, 2017²⁹¹.

Le tractus respiratoire haut est composé des fosses nasales, du pharynx, et de la trachée. Le tractus respiratoire bas est composé des poumons subdivisés en bronches, bronchioles et alvéoles. Des gradients physiologiques et microbiens existent le long de l'arbre respiratoire. Le pH, l'humidité relative (HR), la température, les pressions partielles de l'oxygène (pO₂) et du dioxyde de carbone (pCO₂) varient en fonction de la position dans le tractus. Ces conditions physiologiques façonnent la diversité et l'abondance des communautés bactériennes.

Il n'existe pas de composition saine et unique du microbiome bactérien, car elle peut être différente pour chaque individu. En effet il a été prouvé dans différentes études que la composition de celui-ci pouvait varier selon l'état de santé de l'hôte ou la présence de certaines maladies pulmonaires telle que l'asthme, la BPCO ou la mucoviscidose^{269,277,305–}

La composition du microbiome est donc influencée par les facteurs environnementaux et les interactions entre les microbes et le système immunitaire de leur hôte. Un microbiome sain participe à empêcher la colonisation de microorganismes pathogènes. En effet, l'agent pathogène se retrouve en compétition pour les sites de fixation et pour les nutriments avec les microorganismes du microbiome, et il devient difficile pour lui de s'installer pour se multiplier, coloniser le tractus respiratoire et ainsi provoquer des maladies²⁷².

Les communautés pulmonaires sont en constante rotation, la composition et la diversité du microbiome sont déterminées par un équilibre entre l'immigration microbienne (par micro-aspiration, inhalation de micro-organismes, dispersion directe des muqueuses) et l'élimination microbienne (toux, clairance muco-ciliaire, immunité innée et adaptative) ainsi que par les conditions locales de croissance (disponibilité nutritionnelle, température, tension partielle de l'O₂, compétition microbienne locale, concentration et activité des cellules inflammatoires)^{272,277,304} (**Figure 7**).

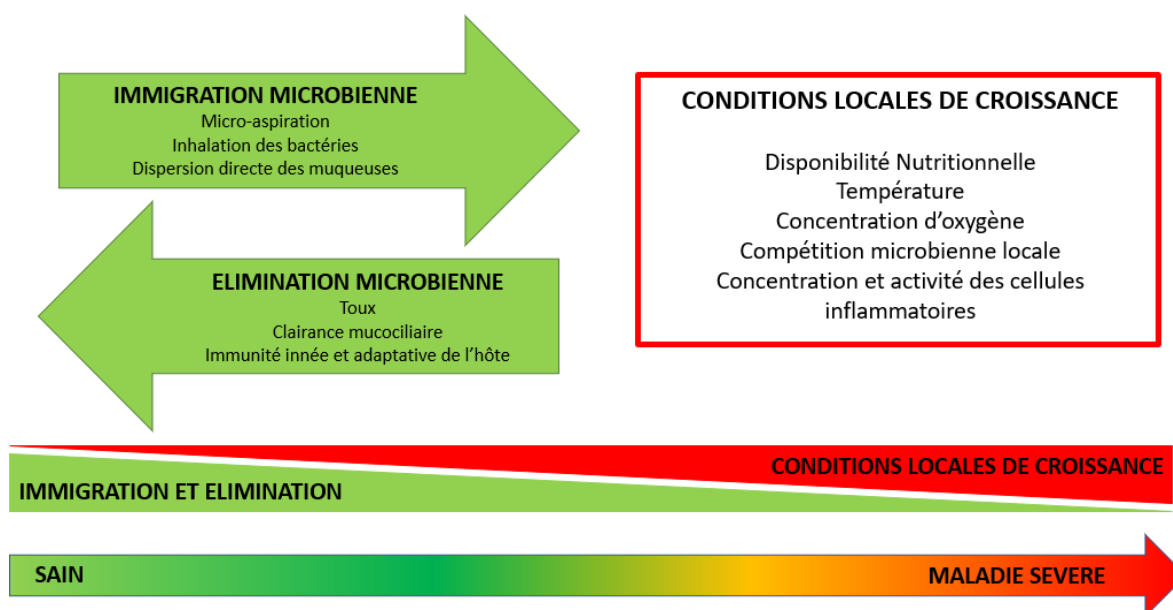


Figure 7 Facteurs déterminants de l'écologie du microbiote pulmonaire humain

Figure adaptée de Dickson and Huffnagle 2015³⁰⁴.

La composition du microbiome respiratoire est déterminée par trois facteurs : l'immigration microbienne, l'élimination microbienne et les taux de reproduction relatifs de ses membres. En bonne santé, l'appartenance à la communauté est principalement déterminée par l'immigration et

l'élimination ; dans les maladies pulmonaires avancées, l'adhésion est principalement déterminée par les conditions de croissance régionale.

Différents facteurs sont capables d'influer sur les taux d'immigration et d'élimination microbienne du microbiome pulmonaire. Par exemple, la proximité de la cavité du larynx et la charge microbienne élevée de la cavité oropharyngée augmentent probablement le taux d'immigration. Le taux d'élimination microbienne quant à lui peut être diminué en fonction de facteurs tels que la toux, le tapis muco-ciliaire, ou les réponses immunes innée et adaptative de l'hôte³⁰⁴.

L'acquisition et le développement du microbiome du nourrisson sont importants pour établir une symbiose saine entre l'hôte et le microbiome, et la perturbation de celui-ci a été associée aux maladies respiratoires infantiles²⁹⁰. Lorsque l'état « basal » du microbiome est altéré, c'est-à-dire qu'il diffère de l'état habituellement retrouvé chez des patients sains, l'apparition de pathologie chez l'hôte est en effet souvent observée. Cet état altéré est aussi appelé dysbiose du microbiome, et se traduit par des modifications au niveau de la composition (qualitative et quantitative) en espèces bactériennes, virales, parasitaires ou fongiques²⁷². Associée à cette dysbiose, l'inefficacité des mécanismes d'élimination des germes (toux, clairance muco-ciliaire), mais aussi une possible altération des structures des voies respiratoires (bronches, bronchioles, alvéoles) entraînant des modifications de la viscosité du mucus, du pH et de la tension de l'O₂ sont observés²⁷². Autrement dit, le microbiome « sain » représente un écosystème fragile mais dans un état d'équilibre où les interactions entre les différents acteurs symbiotiques se font sur le mode mutualiste ou sur le mode commensal. Mais dans le cas d'une dysbiose, l'état d'équilibre est perturbé et les relations deviennent alors parasitaires c'est-à-dire pathogène pour l'hôte.

3.4 Caractérisation du bactériome chez un individu sain

Différentes études effectuées sur des cohortes de tailles importantes ont permis d'apporter des informations sur la composition du microbiome respiratoire à l'état « sain ». Cependant, les changements dans les méthodes d'exploration du microbiome humain (approches de

séquençage en remplacement des techniques de culture notamment) rendent difficile la mise en relation de toutes les données obtenues à ce jour²⁹⁵. De plus, au vu des nombreux facteurs pouvant influencer la composition de celui-ci, il reste difficile de définir les caractéristiques précises d'un patient-type sain.

L'interprétation des études du microbiome des voies respiratoires doit donc être effectuée avec prudence, en délimitant non seulement les différents compartiments des voies respiratoires mais aussi en se basant sur la procédure de prélèvement des échantillons. En effet, des microbiomes différents ont été observés entre les méthodes d'échantillonnage au sein d'un même compartiment des voies respiratoires²⁹⁰.

Dans cette partie, nous aborderons la composition bactérienne des différents compartiments de voies respiratoires chez un enfant sain. Les espèces bactériennes retrouvées en majorité dans chaque compartiment sont répertoriées dans le **tableau 7**.

Tableau 7 Espèces bactériennes retrouvées en majorité dans chaque compartiment du tractus respiratoire

Tableau adapté de Man *et al.*, 2017²⁹¹; Xiao *et al.*, 2020²⁹⁴ et de Steenhuijsen Piters *et al.*, 2020⁸.

Localisation anatomique	Tractus respiratoire supérieur			Tractus respiratoire inférieur
	Cavité buccale	Narines antérieures	Nasopharynx	
Bactéries retrouvées majoritairement chez les enfants sains de moins de 5 ans	<i>Streptococcus</i> <i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>Corynebacterium</i> Parfois : <i>Moraxella</i> <i>Dolosigranulum</i> <i>Streptococcus</i>	<i>Moraxella</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Dolosigranulum</i> <i>Haemophilus</i> <i>Streptococcus</i>	<i>Moraxella</i> <i>Haemophilus</i> <i>Staphylococcus</i> Chez enfants nés à terme : <i>Veillonella</i> <i>Prevotella</i> <i>Fusobacterium</i>

Le microbiome des voies respiratoires supérieures des nourrissons

La plupart des études du microbiome des voies respiratoires chez les enfants sont réalisées sur des échantillons non invasifs des voies respiratoires supérieures (par exemple, écouvillons nasopharyngés/ aspirations nasopharyngées/ lavage nasal), c'est la raison pour laquelle il y a un plus grand nombre d'études sur la composition du microbiome des voies respiratoires supérieures²⁹⁰.

Le mode d'accouchement est un facteur majeur de détermination du microbiome à la naissance. En effet, à la naissance, les nourrissons nés par césarienne ont un microbiome respiratoire dominé par *S. aureus*, et ce pendant une plus longue durée. Les nourrissons nés par voie basse ont quant à eux un microbiome respiratoire qui se complexifie plus rapidement avec dans un premier temps un enrichissement en *Corynebacterium* et *Dolosigranulum*, puis ultérieurement de *Moraxella*^{291,309,310}. Ce microbiome diversifié offre d'ailleurs une meilleure protection contre les infections respiratoires au cours de la première année de vie^{272,290,291,310,311}.

Un autre facteur qui peut influencer la composition du microbiome est l'âge gestationnel. Il a été montré que le microbiome respiratoire des enfants prématurés est différent de celui des enfants nés à terme^{8,294}.

Chez les nourrissons de 1,5 mois, plusieurs études ont caractérisé le microbiome des voies respiratoires supérieures comme étant le plus souvent dominé par l'un des six genres bactériens suivants : *Moraxella*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Haemophilus* et *Dolosigranulum*²⁹⁰. La composition « initiale » du microbiome est maintenue par l'allaitement maternel qui favorise des profils *Dolosigranulum/Corynebacterium* stables contrairement aux nourrissons nourris au lait maternisé, qui présentent des profils dominés par *S. aureus*^{295,309}. A noter que le microbiome des nourrissons allaités semble avoir un effet protecteur contre les infections respiratoires³⁰⁹. En effet, des études ont mis en évidence une forme de protection probablement liée au transfert d'anticorps maternels et de micro-organismes bénéfiques présents dans le lait maternel, tels que *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*^{8,272,291,311}.

Passé 1,5 mois, les profils dominés par *Staphylococcus* tendent à disparaître et les profils *Corynebacterium/Dolosigranulum* sont progressivement remplacés par des profils dominés par *Moraxella/Dolosigranulum*³⁰⁹. En effet, les protéobactéries, en particulier les *Moraxella* augmentent après l'âge de 1,5 mois.

Dès l'âge de 6 mois, des profils de microbiome dominés par *Haemophilus* et *S. pneumoniae* apparaissent aussi²⁹⁵.

Dans l'ensemble, sur la base d'observations faites sur des enfants au cours de leurs deux premières années de vie, il semblerait que les profils dominés par *Dolosigranulum*, *Moraxella* et *Corynebacterium* forment un microbiome plus stable par rapport aux profils dominés par *Streptococcus* et *Haemophilus*. En effet, les profils dominés par *Streptococcus* et *Haemophilus*, étaient associés à un risque élevé de bronchiolite au début de la vie³⁰⁹.

Malgré d'importantes variations au cours des premiers mois de vie, la composition du microbiote bactérien évolue rapidement vers un profil mature dès l'âge de deux mois, et se stabilise par la suite vers l'âge d'un an³⁰⁹.

Pendant la petite enfance, la maturation du microbiome est fortement influencée par des facteurs liés à l'hôte et à l'environnement^{8,290} (**Figure 8**).

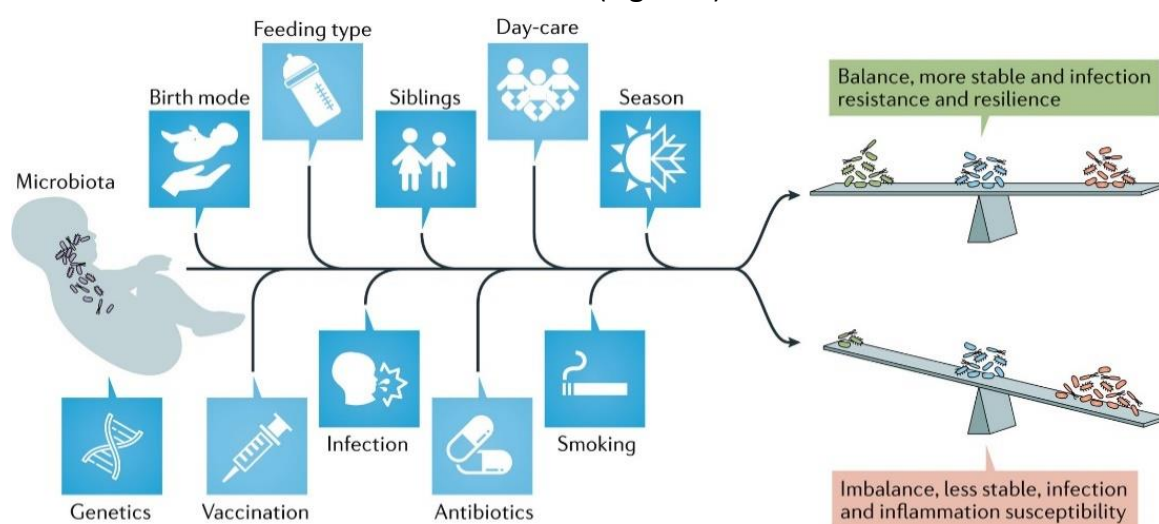


Figure 8 Facteurs liés à l'hôte et à l'environnement qui influencent le microbiote respiratoire

Figure extraite de Man et al., 2017²⁹¹.

Au début de la vie, les communautés microbiennes des voies respiratoires sont très dynamiques et dépendent de multiples facteurs (carrés bleus) dont le mode de naissance, le type d'alimentation, les conditions de promiscuité et le traitement antibiotique. Ces facteurs peuvent modifier la composition du microbiote vers une communauté stable à l'équilibre qui résiste à la prolifération des agents pathogènes ou, au contraire, vers une communauté instable prédisposée aux infections et aux inflammations.

En plus du mode d'accouchement et du type d'allaitement, le développement du microbiome respiratoire peut aussi être perturbé par l'utilisation d'antibiotiques, qui sont couramment utilisés chez les jeunes enfants pour traiter les infections²⁹¹. Les perturbations dues aux antibiotiques ont été caractérisées par une diminution de l'abondance des bactéries commensales présumées bénéfiques, telles que *Dolosigranulum* et *Corynebacterium* dans le tractus respiratoire des enfants en bonne santé^{272,291,311}. A noter que cette altération du microbiome pourrait à son tour, provoquer l'augmentation du risque d'infections des voies respiratoires²⁹¹.

Les conditions de vie, comme la fréquentation d'une garderie et la présence de jeunes frères et sœurs sont aussi d'autres déterminants importants de la structure et du développement du microbiome respiratoire⁸.

La génétique de l'hôte semble également avoir un effet mais mineur sur le microbiome du tractus respiratoire haut chez les individus en bonne santé. En effet, elle n'influencerait que la densité bactérienne et non la composition du bactériome²⁹¹. Des études récentes ont montré que l'impact de la génétique était moins important que l'impact de l'environnement sur la variabilité microbienne entre individus²⁹⁰. Les individus génétiquement apparentés ont effectivement tendance à posséder un microbiome similaire, mais probablement en raison des expositions environnementales communes et à la cohabitation qui facilite le transfert microbien entre les membres d'une famille²⁹⁰. L'environnement du nourrisson constitue donc une source microbienne naturelle capable de coloniser le tractus respiratoire.

Différentes expériences basées sur des modèles de souris ont confirmé l'observation selon laquelle les enfants qui grandissent avec des chiens ou sont exposés à des lieux tel que des fermes avec du bétail sont moins susceptibles de développer des allergies ou un asthme infantile et ont un microbiome distinct pendant la petite enfance^{272,290}.

Enfin, des facteurs tels que la saison, la vaccination, le tabagisme passif et les infections respiratoires antérieures peuvent également affecter le microbiome du nourrisson^{291,309,311}.

Le microbiome des voies respiratoires inférieures des nourrissons

L'échantillonnage des voies respiratoires inférieures, en particulier chez les enfants qui ne peuvent pas réaliser de crachats profonds, nécessite une bronchoscopie invasive. Cette procédure est mal adaptée aux études impliquant des nourrissons, des enfants en bonne santé et aux études à grande échelle en raison de la nécessité d'une anesthésie et d'une expertise procédurale spécialisée. Par conséquent, les études approfondies sur le microbiote des voies respiratoires inférieures chez les jeunes enfants sont peu nombreuses²⁹⁰ et se limitent souvent à des échantillons provenant de nourrissons nés prématurément et intubés²⁹¹.

Chez les enfants, la source la plus probable du microbiote pulmonaire est le nasopharynx et l'oropharynx. Une étude a révélé que, bien que le microbiote pulmonaire soit différent (notamment en densité), il était dominé par des espèces également présentes dans le tractus respiratoire supérieur, notamment les *Moraxella*, *Haemophilus*, *Staphylococcus* et *Streptococcus*. Cependant, il manquait d'autres espèces typiques du tractus supérieur, telles que *Corynebacterium* et *Dolosigranulum*²⁹¹. Dans une revue plus récente, il a été rapporté que la composition du microbiome différait fortement en fonction de l'âge gestationnel, avec des *Staphylococcus* et *Ureaplasma* chez les enfants prématurés et un profil anaérobie mixte (identique à celui des adultes) incluant des *Veillonella*, *Prevotella* et *Fusobacterium* chez les enfants nés à terme⁸.

3.5 Rôle

L'une des principales fonctions de tout écosystème microbien est de provoquer un état de symbiose, qui confère une "résistance à la colonisation" contre les agents pathogènes. Le bactériome agit donc comme une véritable barrière biologique et semble nécessaire pour le maintien de fonctions respiratoires normales. La colonisation compétitive (au niveau des nutriments disponibles) est un moyen plausible par lequel les commensaux des voies aériennes supérieures protègent contre la colonisation des agents pathogènes. Bien que des études aient mis en évidence des associations entre la diminution de la diversité et la colonisation des agents pathogènes, il n'existe à n'importe quelle connaissance aucune preuve

directe démontrant que la diversité microbienne présente au niveau des voies respiratoires puisse protéger contre l'acquisition d'agents pathogènes chez l'homme²⁹¹. Cependant, des membres spécifiques du bactériome ont été identifiés comme pouvant potentiellement exclure des agents pathogènes de la niche nasopharyngée. Par exemple, il a été démontré que la présence de *Staphylococcus epidermidis* participe à l'exclusion de *S. aureus* et à la destruction des biofilms préexistants via la sécrétion de sérine-protéases²⁹⁰. De plus, la résistance à la colonisation peut être renforcée par des interactions avec le système immunitaire de l'hôte. Par exemple, une étude sur modèle murin a montré qu'*H. influenzae* peut profiter de la réponse immunitaire innée de son hôte pour supplanter et éliminer *S. pneumoniae* lorsqu'elles colonisent en même temps les voies respiratoires supérieures³¹². En effet, la reconnaissance d'un peptidoglycane (acide γ -D-glutamyl-mésodiaminopimélique) présent uniquement dans la paroi d'*H. influenzae* par Nod1, va permettre la transmission de signaux inflammatoires et déclencher une augmentation du recrutement de neutrophiles capables de tuer *S. pneumoniae*, l'éliminant ainsi de la surface muqueuse des voies respiratoires de l'hôte³¹².

Outre cette relation symbiotique, le bactériome respiratoire joue probablement un rôle dans la maturation structurelle des voies respiratoires. En effet, des études ont montré que les rongeurs axéniques (élevées dès la naissance en milieu stérile et ainsi exempts de tout micro-organisme et donc exempts de bactériome respiratoire) ont tendance à avoir des poumons plus petits et un nombre réduit d'alvéoles matures. De plus, lorsque les fosses nasales de souriceau axéniques ont été colonisées expérimentalement après la naissance par des *Lactobacillus*, le nombre d'alvéoles matures s'est normalisé suggérant un lien entre le bactériome et la morphogenèse des voies respiratoires²⁹¹.

Comme le microbiome intestinal, le microbiome pulmonaire jouerait un rôle dans la régulation de la réponse immunologique. Une dysbiose pourrait causer un déséquilibre de l'homéostasie immunologique qui interviendrait alors dans la genèse des maladies respiratoires chroniques inflammatoires²⁹⁹. L'acquisition d'un bactériome « sain » chez le nourrisson semble être vital pour établir des fonctions immunitaires innées et adaptatives

locales et systémiques appropriées. Dans l'ensemble, les études sont en accord pour valider le rôle bénéfique de *Corynebacterium*, *Dolosigranulum*, et des espèces de *Staphylococcus* coagulase-négatif (c'est-à-dire autres que *S. aureus*) dans la modération de l'inflammation des voies respiratoires, la perte de ces commensaux étant associée à une activation de réponse immunitaire pro-inflammatoire accrue²⁹⁰.

Enfin, il a également été démontré que le bactériome des voies respiratoires influence le développement d'allergie. En effet, immédiatement après leur naissance, les souris dépourvues de bactériome présentent une proportion accrue de lymphocytes Th2 pro-inflammatoire lorsqu'elles sont exposées à des aéro-allergènes, des acariens ou de la poussière domestique. Cependant, à mesure que le bactériome des voies respiratoires se développe, la réponse exacerbée aux aéro-allergènes semble diminuer²⁹⁰.

3.6 Impact du bactériome sur l'évolution des IRA virales

Dans le but d'étudier les interactions potentielles impliquant le bactériome, de nombreuses études se sont intéressées à la diversité de sa composition lors d'une infection par un virus respiratoire. Plusieurs études ont montré que les profils de communautés bactériennes, souvent dominés par une espèce, étaient différents en fonction de l'infection ou non par un virus respiratoire²⁹⁰.

Les mécanismes qui contribuent à la sévérité des infections respiratoires ne sont pas tous encore bien compris. Ces dernières années, le rôle du microbiome respiratoire dans la survenue d'IRA et le développement d'asthme ou maladie chronique, suite à une infection à VRS par exemple, a reçu un intérêt croissant³¹³.

Ici, nous nous intéresserons principalement aux études du bactériome réalisées chez des enfants de moins de 5 ans (**Tableau 8**).

Tableau 8 Résumé des profils protecteurs ou associés aux IRA

Profils	Bactéries	Virus concernés	Références
Protecteur vis-à-vis de l'infection	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Dolosigranulum</i> <i>Corynebacterium</i>	IRA	314
	<i>Dolosigranulum</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Moraxella catarrhalis</i>		315
	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Corynebacterium</i>	VRS	316
	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Dolosigranulum</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Moraxella catarrhalis</i>	Influenza virus	317
	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Dolosigranulum</i> <i>Corynebacterium</i>	IRA	310,314
	<i>Dolosigranulum</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Moraxella catarrhalis</i>		318
	<i>Corynebacterium</i>		319
Protecteur vis-à-vis de la sévérité	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Corynebacterium</i>	VRS	320
			321
	<i>Staphylococcus aureus</i>	IRA	322
		Influenza virus	284
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Moraxella catarrhalis</i>	IRA	310,314,322,323
		VRS	316
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i>	VRS	315,321
Associés aux IRA		IRA	318
	<i>Haemophilus influenzae</i>	VRS	320
	<i>Moraxella catarrhalis</i>	Rhinovirus	324
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Moraxella catarrhalis</i>	Rhinovirus	325
	<i>Haemophilus influenzae</i>	VRS	244,326–331
		VRS	324,332
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Influenza virus	317
	<i>Moraxella catarrhalis</i>	IRA	319

Abréviations : VRS : Virus Respiratoire Syncytial ; IRA : Infection Respiratoire Aiguë incluant les infections par VRS, Influenza virus et Rhinovirus.

Des études pour établir une signature microbiotique associée aux IRA virales chez les enfants ont montré que les enfants atteints d'infections virales présentaient une densité et une fréquence de colonisation plus élevées de *S. pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* et *H. influenzae* au niveau du nasopharynx alors que les profils dominés par *Corynebacterium*, *Dolosigranulum* ou *S. aureus* étaient plutôt retrouvés chez les nourrissons ne présentant pas d'IRA virales^{290,310,318,319,322,323,333}.

Cependant les données de la littérature sont parfois contradictoires. En effet, dans une autre étude portant sur 307 enfants hospitalisés avec une IRA et 154 témoins sains, les profils de microbiome nasopharyngé dominés par *Moraxella catarrhalis* étaient associés à une santé relativement stable³¹⁸. Néanmoins dans cette même étude, les profils de microbiome nasopharyngé dominés par *H. influenzae* et *S. pneumoniae* étaient significativement associés aux IRA et ceux dominés par *Corynebacterium* et *Dolosigranulum* étaient associés à une santé stable comme retrouvé dans la majorité des études³¹⁸.

Etude sur le microbiome respiratoire bactérien et le VRS

Dans l'ensemble, les données sur le microbiome nasopharyngé bactérien montrent une association entre sévérité de l'infection à VRS et les profils dominés par *Moraxella catarrhalis*^{310,314,316,320,330}, *H.influenzae*^{244,310,314,316,318,320,321,324,326–331} et/ou *S.pneumoniae*^{310,314,316,318,321,324,330–332}. A l'inverse, un profil dominé par *S. aureus*^{310,316,320,321}, *Corynebacterium*^{315,316} ou *Dolosigranulum*^{310,315,316} était plutôt corrélé négativement à la sévérité des bronchiolites à VRS.

De plus, la réalisation d'un dosage de cytokines et chémokines pro-inflammatoires (IL8 et CXCL8) et d'études intégratives de transcriptomique ont également permis d'associer des profils de bactériome dominés par *H. influenzae* ou *S. pneumoniae*, à une inflammation accrue caractérisée par une surexpression des gènes liés à l'activation et à la signalisation des neutrophiles/macrophages^{321,331,332}.

Cependant, il reste difficile de tirer des conclusions claires car les populations étudiées et les échantillons utilisés sont hétérogènes, ce qui explique que certaines études aboutissent

à des résultats différents^{315,317,318}. Par exemple contrairement aux études citées ci-dessus^{310,314,316,320,330}, Biesbroek et al, ont montré qu'un profil dominé par *Moraxella catarrhalis* à 1,5, 6 et 12 mois était associée à une réduction des infections par VRS des voies respiratoires supérieures au cours des 6 mois suivants³¹⁵. Conformément à cette observation, des études ont montré que les enfants dont le profil était dominé par *Moraxella catarrhalis* présentaient moins de risque d'hospitalisation en soins intensifs et des durées d'hospitalisation plus courtes^{328,329,334}.

Etude sur le microbiome respiratoire bactérien et la grippe

Les infections virales peuvent favoriser la croissance de certaines bactéries pathogènes, comme une augmentation significative de la charge nasopharyngée de *S. pneumoniae* chez les enfants atteints de grippe³³⁵.

Dans une étude de notre laboratoire, un profil de microbiome nasopharyngé dominé par *S. aureus* était corrélé négativement à la sévérité de la grippe. L'augmentation de la diversité bactérienne et la présence de certaines bactéries (telles que *H. influenzae*) étaient quant à elles associées à la gravité de symptômes. Ces observations pourraient s'avérer utile pour la prédiction de formes graves de grippe chez les enfants²⁸⁴. Un brevet avait d'ailleurs pu être déposé suite à cette étude rétrospective (réalisée sur 36 enfants de moins de 5 ans hospitalisés pour grippe) qui avait permis de mettre en évidence une signature particulière permettant de calculer un score prédictif en fonction de la sévérité de l'évolution clinique d'une infection grippale (complications respiratoires et neurologiques)²⁸⁴. Wen et al, ont également mis en avant une diversité accrue accompagnée d'une diminution des bactéries commensales habituelles (c'est-à-dire *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* et *Dolosigranulum*) et d'une augmentation du genre *Streptococcus*³¹⁷.

Etude sur le microbiome respiratoire bactérien et les rhinovirus

Comme pour le VRS, le risque de forme sévère d'IRA est considérablement accru lorsque le rhinovirus est détecté en même temps que *Moraxella*, *Streptococcus* ou *Haemophilus*^{310,325,330}. Mansbach et al, ont retrouvé une surreprésentation de la bactérie

M. catharralis dans les bronchiolites à Rhinovirus³²⁴. Enfin, Toivonen et al, ont constaté que les nourrissons ayant un profil de microbiome dominé par *Haemophilus* seraient plus susceptibles d'être infectés par des rhinovirus A, tandis que les nourrissons ayant un profil de microbiome dominé par *Moraxella* seraient plus susceptibles d'être infectés par des rhinovirus C³³³.

Ces différentes études montrent que la composition du bactériome respiratoire peut être associée à la sévérité et/ou la susceptibilité aux IRA. La question est de savoir si les différents profils de communautés bactériennes observés lors d'une IRA virale peuvent être une cause ou seulement une conséquence de cette infection virale, et si des profils de communautés bactériennes peuvent prédisposer à une IRA virale.

3.7 Impact clinique du bactériome respiratoire

Utilisation de probiotiques

Lors de l'apparition d'une maladie ou d'une infection, les microbiomes intestinal et respiratoire sont considérablement modifiés, avec parfois l'éradication de certaines espèces commensales. Cette altération du microbiome initial peut être due à l'infection en elle-même ou encore à l'administration d'antibiotiques²⁷⁷. Étant donné que l'efficacité de la réponse immunitaire dans les poumons semble être en corrélation avec la composition du microbiome, il est important de trouver un moyen de restaurer le microbiome respiratoire après une infection³³⁵. Il existe donc un intérêt croissant pour l'utilisation potentielle des probiotiques. En effet, les probiotiques ont pour rôle de restaurer le microbiome en réintégrant des bactéries qui peuvent avoir été éradiquées lors de maladie chronique ou d'infection²⁷⁷. De la même manière qu'avec certaines thérapies du tractus gastro-intestinal (notamment via la transplantation fécale), il semble envisageable de moduler le microbiome respiratoire. Des études se sont centrées sur l'impact de l'utilisation de probiotiques dans le cadre d'IRA puisque le rôle du microbiome respiratoire dans la défense contre l'infection par des virus respiratoires est de plus en plus étudié³³⁶.

Lors d'une infection par le virus influenza sur modèle murin, l'administration par aérosols de composant bactériens, tel que le lipopolysaccharide (LPS), serait responsable d'une réduction de l'infection des voies aériennes via une accélération de la réponse inflammatoire, d'une amélioration du taux de survie chez les animaux exposés ainsi qu'une élimination plus rapide du virus en cas de contact ultérieur avec ce même virus²⁷⁸. L'administration intranasale de *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* chez des souris a mis en évidence un effet protecteur via une activation de l'immunité innée médiée par le TLR-3 contre l'infection par le VRS et l'infection secondaire par la pneumonie à pneumocoques³³⁵. De façon similaire, l'administration intranasale de simples toxines inactivées d'*Escherichia Coli* protège contre l'infection par le VRS et les virus *Influenza* en réduisant l'inflammation cellulaire dans le poumon, la perte de poids et le taux d'éosinophile pulmonaire³³⁷. De nombreuses études ont également été réalisées concernant différentes souches de *Lactobacillus*³³⁸. Par exemple, les souches de *Lactobacillus rhamnosus* CRL1506 administrées par voie nasale modulent différemment les réponses immunitaires antivirales respiratoires et induisent une protection contre l'infection par le VRS chez la souris³³⁹.

Une autre étude réalisée cette fois ci sur des porcelets a mis en évidence une augmentation du nombre de cellules dendritiques, de cellules B et T dans la muqueuse nasale et les amygdales, ainsi qu'une augmentation de l'expression des ARNm des récepteurs TLR-2 et TLR-9 à la suite de l'administration intranasale de *Bacillus subtilis*³⁴⁰. Une étude plus approfondie sur l'administration intranasale de *B. subtilis* chez l'homme afin de renforcer l'immunité de la muqueuse nasale humaine contre les maladies respiratoires serait intéressante.

Peu d'essais cliniques sur l'homme ont été réalisés à ce jour afin d'examiner l'efficacité des probiotiques intranasaux pour prévenir les IRA. D'une manière générale, il semble que les probiotiques seraient capables de limiter les infections des voies respiratoires (de la même manière que les infections gastro-intestinales) par la modulation de l'immunité locale et

systémique. Globalement les effets observés peuvent comprendre l'augmentation de l'activité phagocytaire des leucocytes, l'augmentation de la sécrétion d'immunoglobulines (IgA, IgG et IgM) et l'augmentation de la production de cytokines (par exemple, les interleukines, le TNF- α et l'IFN- α)³⁴¹. De récentes études ont cherché à comprendre les mécanismes d'actions, liés à l'utilisation de souches probiotiques uniques ou de cocktails de souches, responsables de l'amélioration des paramètres cliniques chez les patients. Par exemple, De Grandi *et al.*, ont mis en évidence sur une cohorte d'adulte, une diminution significative de l'abondance de *S. aureus* après l'administration intranasale d'une combinaison de *Streptococcus salivarius* 24SMBc et *Streptococcus oralis* 89a. De plus, une augmentation du nombre de micro-organismes « bénéfiques » a également été révélé et pourrait limiter la surcroissance de pathogènes potentiels³⁴².

Notions de biomarqueurs

Bien qu'elles soient encore limitées, des données de plus en plus nombreuses suggèrent une association entre la composition du microbiome nasopharyngé et la sévérité des IRA ou encore la prédisposition à développer des formes sévères de bronchiolite à VRS pendant la petite enfance⁴⁶. Les modifications dans la composition du microbiome respiratoire induites par l'infection virale chez les patients peuvent être considérées comme des biomarqueurs. Ces biomarqueurs peuvent être utilisés pour le diagnostic ou le suivi des maladies, la sélection de la thérapie ciblée et la prévision du pronostic. Malheureusement, il est encore difficile d'identifier des biomarqueurs totalement fiables car différents facteurs tels que la génétique de l'hôte ou l'environnement peuvent entrer en jeu dans les modifications et diffèrent considérablement d'un patient à l'autre³⁴³.

Quelques biomarqueurs bactériens ont cependant été identifiés dans le cas de certaines infections virales. Par exemple, le portage nasopharyngé de *S. pneumoniae* chez des nourrissons a été positivement associé à la séroposativité accrue au hMPV. Après vérification au moyen d'un modèle cellulaire, l'étude a permis de conclure que l'exposition à *S.pneumoniae* pouvait moduler l'infection par hMPV³⁴⁴. Plusieurs études sur le

microbiome nasal et les infections à VRS ont mis en évidence qu'une abondance de *Moraxella catarrhalis*, *H. influenzae* et *S. pneumoniae* était associée à la sévérité de ces infections⁴⁶.

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. A l'avenir, l'application des progrès récents des technologies de séquençage conduira probablement à l'identification de nouveaux biomarqueurs dans le microbiome des voies respiratoires des patients.

3.8 Impact du bactériome digestif sur les IRA

Les données disponibles suggèrent que le tube digestif et le système respiratoire, ainsi que leurs microbiomes respectifs, communiquent entre eux et s'influencent mutuellement, une relation désignée sous le nom d'axe de communication entéro-respiratoire. En effet, le bactériome de l'intestin peut altérer la réponse aux infections respiratoires, de la même manière qu'une infection virale respiratoire peut altérer le microbiome bactérien intestinal^{335,341,345–347}. Un certain nombre de médiateurs pourraient être impliqués dans cette communication entéro-respiratoire. Par exemple des métabolites bactériens sont capables de modifier la signalisation de l'interféron dans les poumons conférant ainsi une protection contre le VRS et le virus *influenza A* dans des modèles murins^{348,349}. Les métabolites fabriqués par la communauté bactérienne intestinale peuvent également déstabiliser les virus respiratoires comme le virus *influenza A* ou les coronavirus³⁴⁵. Par exemple, chez des souris traitées par antibiotiques puis infectées par le virus de la grippe, la charge virale et la sévérité des lésions épithéliales au niveau pulmonaire étaient significativement diminuées en présence de desaminotyrosine (DAT) produite par la bactérie commensale digestive *Clostridium orbiscindens*³⁵⁰.

L'une des études les plus prometteuses sur le rôle de l'axe intestin-poumon dans les maladies respiratoires est l'étude allemande en cours LoewenKids. Depuis 2015, 782

nouveau-nés ont été recrutés, dans le but d'obtenir pour chaque enfant l'historique complet de l'infection ainsi que les données sur le développement de son microbiote gastro-intestinal et nasal, son background génétique et son environnement. Les données cliniques, les différents symptômes, un écouvillonnage nasal ou fécal sont collectés chaque fois qu'un symptôme respiratoire ou gastro-intestinal est référé. De plus, des échantillons nasaux, de selles et de sang sont également prélevés tous les 2 à 4 fois par an chez les enfants asymptomatiques³⁵¹. Cette étude pourra probablement aider à mieux comprendre le rôle du microbiote intestinal dans le développement du système immunitaire et son lien avec les infections respiratoires.

Le rôle thérapeutique potentiel de la modulation du microbiote intestinal pour prévenir et/ou traiter les IRA a été évalué dans différentes études^{338,346–350,352–357}.

Des données prometteuses provenant d'un modèle de rongeur infecté par la grippe ont révélé que l'ingestion de la souche probiotique *Lactobacillus paracasei* CNCM I-1518 réduisait la sensibilité à l'infection grippale, diminuait les infiltrations de cellules inflammatoires dans les poumons et accélérait la clairance virale³⁵³. Ji et al., ont évalué les effets thérapeutiques d'un mélange de probiotiques (*Lactobacillus rhamnosus* et *Escherichia coli*) sur des souris néonatales infectées par le VRS. Administrés par voie orale quotidiennement avant ou après l'infection par le VRS, ces probiotiques permettraient la protection contre la pathologie pulmonaire induite par le VRS grâce à une élimination rapide du virus et l'activation d'une réponse antivirale par l'intermédiaire de l'IFN- β dérivé des macrophages alvéolaires³⁵⁴. Une récente revue de 2022 a mis en lumière les différents effets bénéfiques apportés par l'administration de différents *Lactobacillus* sur les maladies respiratoires courantes en mettant l'accent sur les mécanismes de régulation de l'immunité respiratoire³³⁸. Parmi les différentes études répertoriées dans cette revue, les principaux effets observés sur modèle murins étaient une réduction de la charge virale et des blessures pulmonaires, une amélioration du taux de survie, une diminution de l'inflammation, une

absence de perte de poids et une régulation à la hausse significative de la voie Th1³³⁸. Les effets dépendent de la souche administrée³³⁸.

Des premières études sur l'homme ont été menées sur les maladies telles que la mucoviscidose, où il a été démontré que l'administration de probiotiques par voie orale, en particulier de *Lactobacillus rhamnosus*, entraînait une réduction du taux d'exacerbation pulmonaire^{358,359}. Il a également été démontré que l'administration de probiotiques, en particulier de *Lactobacillus rhamnosus*, au cours des deux premières années de vie, réduisait l'incidence de l'allergie chez les enfants³³⁵. Une réduction du risque d'asthme suite à l'administration de probiotiques tels que *Lactobacillus paracasei* et *Lactobacillus fermentum* a été mise en évidence³⁶⁰. Cependant, il est nécessaire de valider sur des cohortes de plus grande taille l'efficacité de l'utilisation de ces probiotiques sur les pathologies chroniques. Plusieurs essais ont mis en évidence une réduction de l'incidence et des risques de développer des otites aiguës et des infections des voies respiratoires supérieures suite à l'administration de *Lactobacillus Rhamnosus GG* chez les enfants³⁵⁵⁻³⁵⁷. Du et *al.*, ont résumé les effets thérapeutiques de différents essais cliniques concernant l'administration de différentes souches de *Lactobacillus* dans l'amélioration des symptômes des IRA³³⁸. Les principales améliorations étaient une diminution de l'incidence des IRA mais aussi de la durée de celles-ci³³⁸. King et *al.*, ont évalué 20 essais impliquant l'administration de souches de *Bifidobacterium* et de *Lactobacillus* chez l'homme et ont signalé une réduction significative de la durée des IRA pour les patients ayant reçu le traitement³⁶¹. Une méta-analyse réalisée chez les enfants (23 essais, 6269 enfants) par Wang et *al.*, indique que la supplémentation en probiotiques réduit l'incidence des infections des voies respiratoires supérieures chez les enfants³⁶².

En conclusion, bien que les résultats sur l'utilisation de probiotiques soient encourageants pour prévenir ou guérir des infections respiratoires, il n'existe pas de recommandations médicales sur leur utilisation. D'autres études visant à comprendre quelles souches probiotiques, ou combinaisons de souches, pourraient permettre la modulation la plus

fiable du système immunitaire sont nécessaires afin de développer des thérapies probiotiques plus efficaces contre les IRA virales.

4 Virome respiratoire

4.1 Généralités

Le virome est la composante virale du microbiome. Il y a environ 10^{15} virus présents dans le corps humain, c'est 10 fois plus que la composante bactérienne. Le virome est composé de virus infectant les cellules eucaryotes, de traces de rétrovirus dérivés de virus anciens et intégrés au génome humain (plus de 8% de notre génome), et des virus infectant les cellules procaryotes (les bactériophages)³⁶³.

Au cours de la dernière décennie, de nombreuses études ont établi des liens entre le bactériome et son rôle dans la santé humaine. En revanche, l'étude du virome a pris beaucoup de retard et il existe relativement peu d'études sur le virome respiratoire par rapport aux études sur le bactériome respiratoire. L'une des principales explications est que l'analyse du virome présente des difficultés qui le rendent moins facile à détecter que le microbiome bactérien. En particulier l'absence de séquences conservées rend l'identification de tous les virus difficile. L'avènement de la métagénomique a considérablement amélioré notre capacité à détecter de manière plus précise les séquences virales connues et nouvelles, permettant ainsi d'établir des liens entre ces séquences virales et de nombreuses maladies telles que l'infection par le VIH, les maladies inflammatoires de l'intestin, la malnutrition, la maladie du greffon contre l'hôte ou encore le diabète de type 1. Cependant, on ne sait pas si le virome joue un rôle causal ou non²⁸⁸.

4.2 Caractérisation du virome respiratoire chez un individu sain

On distingue deux parties dans le virome : la partie extracellulaire et la partie intracellulaire. La partie intracellulaire du virome a été bien moins étudiée que la partie extracellulaire, elle se compose de prophages, de virus d'eucaryotes latents sous forme d'épisome (c'est le cas de certains *Herpesviridae* par exemple) et de virus intégrés dans le génome humain (notamment les rétrovirus endogènes). Dans cette partie nous nous intéresserons surtout

à la partie extracellulaire du virome qui a été la mieux caractérisée. Tout comme pour le bactériome, le virome qui a été le plus étudié est celui du tractus gastro-intestinal. Les communautés virales présentes dans l'organisme diffèrent en termes de composition et d'abondance en fonction des sites anatomiques⁵⁵. Au niveau du tractus respiratoire, en raison de la flore bactérienne résidente, un grand nombre de bactériophages sont retrouvés. Il est également retrouvé des virus d'eucaryotes et une partie appelée « la matière noire virale » qui correspond aux séquences non assignées. En effet, une grande partie des séquences obtenues par métagénomique au niveau du tractus respiratoire ne sont pas répertoriées dans les bases de données. Ces séquences peuvent représenter de nouveaux virus (notamment des bactériophages) qui ne sont pas encore référencés ou bien des séquences s'alignant sur de multiples références de différents règnes qui ne peuvent donc pas être assignées au niveau taxonomique.

Les principaux virus retrouvés au sein du virome extracellulaire humain chez un individu sain sont répertoriés dans le **tableau 9**.

Concernant la classification des phages, elle a beaucoup changé au cours des analyses de cette thèse. En effet, les familles basées sur la morphologie (*Myoviridae*, *Podoviridae* et *Siphoviridae*) et l'ordre des *Caudovirales* ont été supprimés et remplacés par la classe *Caudoviricetes* pour regrouper tous les virus bactériens et archéens à queue avec des capsides icosaédriques et un génome d'ADN double brin (voir **tableau 9** anciennes et nouvelles classifications)³⁶⁴. Les analyses de la partie virome ont été réalisées en 2021 et sont donc basées sur l'ancienne classification. Les bactériophages du virome respiratoire appartiennent majoritairement aux anciennes familles des *Siphoviridae*, des *Myoviridae* et des *Podoviridae* qui sont aussi les phages les plus abondants au niveau intestinal et oral. Ces phages sont majoritairement lysogéniques c'est-à-dire que leur génome s'intègre dans celui de la bactérie, pour ensuite se répliquer en même temps que le génome bactérien sans tuer la bactérie hôte^{55,270,291}.

Tableau 9 Principaux virus retrouvés au sein du virome extracellulaire humain dans le tractus respiratoire chez un individu sain

Adapté du Traité de virologie et de la nouvelle taxonomie adoptée par ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses)^{55,364,365}.

Génome	Classe	Ordre	Famille	Espèces
Bactériophages ancienne classification	ADNdb	Caudoviricetes	Caudovirales	Myoviridae 625 espèces
				Podoviridae 130 espèces
				Siphoviridae 1166 espèces
	ADNsb	Faserviricetes	na	Inoviridae 43 espèces
Bactériophages nouvelle classification (mars 2022)	ADNdb	Caudoviricetes	na	22 familles 30 sous familles 862 espèces
				Plectroviridae 6 espèces
	ADNsb	Faserviricetes	Tubulavirales	Inoviridae 43 espèces
Virus d'eucaryotes	ADNdb	Herviviricetes	Herpesvirales	Herpesviridae, Alphaherpesvirinae HSV-1, HSV-2
				Herpesviridae, Betaherpesvirinae CMV
				Herpesviridae, Gammaherpesvirinae HHV-6, HHV-7
				Herpesviridae, Gammaherpesvirinae EBV
		Papovaviricetes	Sepolyvirales	Polyomaviridae KIPyV, WUPyV
		Tectiliviricetes	Rowavirales	Adenoviridae HAdV A à G
		Pokkesviricetes	Chitovirales	Poxviridae MOCV
		Megaviricetes	Imitervirales	Mimiviridae 2 espèces infectant les amibes
			Algavirales	Phycodnaviridae 34 espèces infectant les algues
		na	na	Anelloviridae TTV (29 espèces)
	ADNsb	Papovaviricetes	Zurhausenvirales	TTMV (38 espèces)
				TTMVD (15 espèces)
				Papillomaviridae Alpha, bêta, gamma et autres papillomavirus
		Quintoviricetes	Piccovirales	Parvoviridae HBoV
	ARNsb (+)	Pisoniviricetes	Picornavirales	Picornaviridae Rhinovirus A à C, entérovirus A à D, parechovirus
			Nidovirales	Coronaviridae HCoV-229E, NL63, OC43, HKU1...
	ARNsb (-)	Monjiviricetes	Mononegavirales	Paramyxoviridae HPIV-1, HPIV-2, HPIV-3, HPIV-4
				Pneumoviridae HMPV, RSV
				Orthomyxoviridae Virus influenza A, B, et C

Abréviations : sb : simple brin ; db : double brin ; (-) : polarité négative ; (+) : polarité positive ; na : non assigné ; m : virus majoritaire du virome ; f : virus appartenant à la flore virale transitoire ou permanente ; p : virus pathogène.

Dans le tractus digestif, il a été constaté que les virus eucaryotes présentaient une faible diversité à la naissance et que leur nombre augmentait progressivement avec l'exposition environnementale jusqu'à atteindre un pic à 6-18 mois^{270,366,367}. En effet, chaque individu sain peut être infecté chroniquement par de nombreux virus d'eucaryotes que l'on retrouve alors dans le virome. Le virome respiratoire pourrait suivre la même règle. Parmi les virus d'eucaryotes au sein du virome respiratoire, on trouve des virus pathogènes opportunistes tels que *Herpesviridae*, *Polyomaviridae*, *Adenoviridae*, *Papillomaviridae*... Des études réalisées sur des enfants asymptomatiques en bonne santé ont mis en évidence la détection de nombreux virus respiratoires tel que les *rhinovirus*, les *bocavirus* humains, les *polyomavirus*, les *adénovirus* et les *coronavirus*^{2,368}. Dans une autre étude réalisée sur des aspirations nasales d'individus sains, Wylie et al, ont trouvé des séquences de *roseolovirus*, *herpesvirus*, *alpha-*, *beta-* et *gammapapillomavirus*, *polyomavirus*, *mastadenovirus*, *dependoparvovirus*, *alphatorquevirus*, et *astrovirus*³⁶³. Enfin une récente étude a rapporté que le virome respiratoire des enfants en bonne santé était composé d'une fréquence élevée de VRS et de CoV (229E, OC43 et NL63)²⁴⁴ (**Figure 9**).

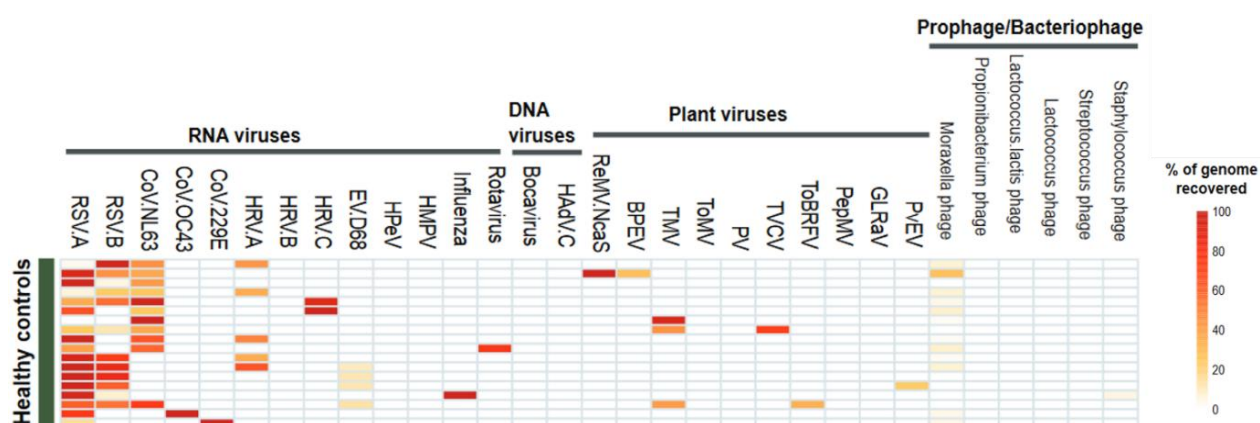


Figure 9 Heatmap montrant le profil du virome respiratoire d'enfants en bonne santé

Figure extraite de Rajagopala et al., 2020²⁴⁴.

Chaque ligne représente un échantillon et chaque colonne représente un virus identifié. Le gradient de couleur permet de distinguer le pourcentage de génome viral récupéré.

Dans cette étude, tous les échantillons contenaient de 1 à 3 virus à ARN humains identifiés (en moyenne deux virus par échantillon), dont, par exemple, le VRS, le CoV, le rhinovirus, les entérovirus (EV) et la grippe. Pour 79 % des échantillons, il a été retrouvé du génome du VRS-A ou du VRS-B, et pour 31% des échantillons, les deux génomes du VRS-A et du VRS-B seraient présents (**Figure 9**). Ce pourcentage de coinfections VRS-A/VRS-B est très élevé en comparaison à 3 études basées sur des données de PCR sur des enfants avec IRA où seulement 1,3%³⁶⁹, 1,6%³⁷⁰ et 4,8%³⁷¹ de coinfections étaient détectées. Bien que les auteurs aient exclu la possibilité d'une contamination croisée en réalisant des analyses phylogénétiques, la présence d'une contamination croisée qui aurait eu lieu lors de la préparation des échantillons reste fortement probable. En effet, avec une contamination majeure, les consensus générés peuvent être des mélanges de séquences de plusieurs virus et l'analyse phylogénétique n'est donc pas fiable pour exclure la possibilité d'une contamination croisée.

Il est intéressant de noter que des virus de plantes ont également été trouvés dans presque tous les échantillons, ce qui avait déjà été signalé dans des poumons humains et de souris. Enfin, grâce aux récents progrès de la métagénomique, des virus commensaux non pathogènes ont pu être identifiés notamment des virus de la famille de *Anelloviridae*, parmi lesquels trois genres majeurs : *Torque Teno Virus* (TTV), *Torque Teno Mini Virus* (TTMV) et *Torque Teno Midi Virus* (TTMDV)^{55,372,373}. Les *Anelloviridae* représentent la famille de virus la plus répandue dans le virome respiratoire bien que leur rôle reste à définir^{291,374}.

Le virome extracellulaire respiratoire est hautement variable d'un individu sain à un autre. De plus, il semble que la diversité et l'abondance virale diminue lorsque l'on descend le long de l'arbre trachéo-bronchique³⁷⁴. Il semble également que la diversité virale soit hautement dépendante de la région échantillonnée³⁷⁵. Des variabilités peuvent également être

observées en fonction de l'âge, du statut immunitaire, de l'exposition face à certains facteurs environnementaux, alimentaires ou héréditaires.

Une étude caractérisant le virome respiratoire a mis en évidence que le virome pulmonaire résident est probablement établi chez les enfants en bonne santé au cours des deux premières années de vie, ce qui peut également avoir un impact sur le développement du système immunitaire³⁷³. Cependant, les dynamiques d'acquisition du virome ne sont pas encore totalement élucidées.

4.3 Rôle du virome chez l'individu sain

Les rôles potentiels du virome dans la santé ne sont pas encore clairement définis. Initialement les virus d'eucaryotes n'étaient considérés que comme des pathogènes, alors que désormais la notion de virus commensaux voire mutualistes est de plus en plus mise en évidence. En effet, alors que les virus d'eucaryotes pathogènes pour l'homme sont bien étudiés, des virus d'eucaryotes du virome notamment les *Anelloviridae*, ne sont pas considérés comme pathogène et pourraient même avoir un lien étroit avec le système immunitaire^{289,376}. De plus, il semble exister un rôle protecteur du virome eucaryote face aux infections bactériennes. Une étude réalisée chez la souris montre par exemple que l'infection un *cytomégalo*virus (CMV) murin ou un *virus Epstein-Barr* (EBV) confère une protection contre *Listeria monocytogenes* et *Yersinia pestis*^{55,377}. Un autre exemple qui soutient cette hypothèse est celui du ralentissement de la progression du VIH chez les patients co-infectés avec le virus *GB virus type C* (GBV-C) ou virus de l'hépatite G (HGV)^{378,379}. Bien que l'on puisse observer des effets positifs à la suite des infections chroniques latentes, comme par exemple le CMV capable d'augmenter la réponse immunitaire antigrippale³⁸⁰, ou encore l'EBV qui pourrait avoir un rôle protecteur contre l'atopie^{381,382} ; il ne faut pas négliger le fait qu'en maintenant un état pro-inflammatoire chronique, certains virus seraient plutôt responsables d'une susceptibilité accrue aux infections par d'autres virus potentiellement plus virulents ou induire des effets oncogènes^{383–385}.

Le rôle des bactériophages du virome est mieux connu. Dans un premier temps, ils peuvent modifier par différents mécanismes, la composition des communautés bactériennes afin de maintenir un niveau élevé de diversité bactérienne. Une majorité de phages à cycle lytique vont éliminer via un phénomène de lyse les bactéries les plus abondantes, permettant à d'autres bactéries de se développer et induisant le maintien de la diversité. A l'opposé, les phages à cycle lysogénique, présent sous forme de provirus, auraient la possibilité d'être activés pour lyser leur bactérie hôte en cas de stress, permettant ainsi la restauration des capacités métaboliques du microbiote après des épisodes majeurs de perte de diversité. Les phages participent donc à la stabilisation du microbiote bactérien ainsi qu'au rétablissement de celui-ci après un déséquilibre. Par ailleurs, les phages lysogéniques participent à la constitution d'un réservoir de gènes dont des gènes de résistance aux antibiotiques et certains facteurs de virulence, grâce à leur propriété d'intégration dans le génome bactérien^{55,386}. Un autre rôle attribué aux phages du microbiote est celui de barrière contre les pathogènes bactériens. En effet, on trouve une forte concentration de phages à cycle lytique dans les muqueuses au niveau du mucus constituant notre première barrière de défense contre les bactéries qui s'attachent aux parois cellulaires. Les mécanismes de cette concentration de phages dans le mucus ne sont pas entièrement compris³⁸⁷. Une étude récente a montré que l'environnement muqueux permet une cohabitation stable entre les phages et les bactéries, et que les phages sont capables de s'adapter grâce à des mutations ou recombinaison génétique³⁸⁸. Enfin, les phages interagissent également directement avec le système immunitaire humain bien que les mécanismes de ces interactions soient encore mal connus.

4.4 Impact du virome sur l'évolution des IRA virales.

Les récentes études sur le virome ont mis en évidence qu'une dysbiose de celui-ci pourrait être impliquée dans les formes sévères de certaines maladies mais aussi dans plusieurs pathologies chroniques. Les premières études se sont concentrées sur les maladies chroniques inflammatoires de l'intestin, et ont permis de montrer une augmentation de l'abondance des phages entériques associée à une diminution de la flore bactérienne. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires afin de déterminer si ces différences d'abondance prédisposent à une pathologie inflammatoire ou sont plutôt la conséquence de l'inflammation⁵⁵. De plus en plus d'études se sont également intéressées à la caractérisation du virome chez les personnes immunodéprimées ou ayant subi une transplantation récente. Il a notamment été observé une augmentation de l'abondance du virome sanguin mais aussi dans les LBA en particulier des *Anelloviridae*^{55,389}. En effet, il a été démontré que les patients transplantés avaient une charge virale significativement plus élevée que les témoins sains dans les prélèvements oropharyngés et les LBA³⁸⁹. Cette augmentation de l'abondance était corrélée à l'immunosuppression et bien que l'impact réel de cette augmentation ne soit pas connu, cette famille virale pourrait être utilisée comme marqueur prédictif afin de déterminer les profils à risque infectieux élevé ou à risque de rejet de greffe par exemple. Des études sur population pédiatrique ont révélé que les enfants atteints d'une IRA sévère présentaient des charges de *TTV* visiblement plus élevées que les enfants souffrant d'une IRA moins grave³⁹⁰. Les charges élevées de *TTV* pourraient également contribuer aux déséquilibres lymphocytaires au cours des IRA³⁹¹. En effet, Maggi *et al*, ont mis en évidence une corrélation inverse entre les pourcentages de lymphocytes T totaux et de lymphocytes T auxiliaires et le taux de détection de *TTV* dans le sang de 40 enfants souffrant d'IRA. Par ailleurs, il y avait également une corrélation positive entre les pourcentages de lymphocytes B CD19 et le taux de détection du *TTV*³⁹¹.

Si le bactériome est modifié au cours des IRA, des études cliniques récentes ont montré que la composition du virome eucaryote était également modifiée. En effet, plusieurs études ont caractérisé le virome chez les personnes atteintes d'infections virales aiguës, et ont

montré une abondance excessive de l'organisme responsable de l'infection. Une étude chinoise du virome nasopharyngé d'enfants hospitalisés pour IRA, a mis en évidence une diversité plus importante du virome chez les enfants ayant une infection respiratoire. Leurs échantillons nasopharyngés étaient principalement colonisés par des *Paramyxoviridae*, *Coronaviridae*, *Parvoviridae*, *Anelloviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Picornaviridae* et *Adenoviridae*. En comparaison, chez les 15 enfants sains sans symptômes respiratoires, le virome était principalement composé d'*Anelloviridae*³⁷².

En caractérisant les changements de composition du virome respiratoire et du profil des cytokines de manière longitudinale dans des prélèvements d'enfants atteints d'une IRA ou d'IRA à répétition, Li et al, ont mis en évidence différents facteurs significativement associés à la susceptibilité de développer fréquemment des IRA³⁹². L'abondance relative des phages de *Propionibacterium* étaient significativement plus élevée dans le virome respiratoire des enfants présentant des IRA récurrentes, tandis que les phages de *Lactococcus* présentaient une tendance inverse³⁹². De plus, la présence des phages de *Propionibacterium* était associée à des niveaux plus élevés de TIMP-1 et de PDGF-BB, permettant ainsi d'utiliser ces deux cytokines comme biomarqueur potentiel d'IRA récurrentes³⁹².

La composition du microbiote avant, pendant et après une IRA virale, a un impact sur l'évolution et la sévérité des IRA. Par ailleurs, de nombreux mécanismes d'interactions trans-règnes (c'est-à-dire entre les différents composants du microbiome et la génétique de l'hôte) directs et indirects via le système immunitaire de l'hôte nécessitent d'être caractérisés. Ces études sont importantes puisque la perturbation globale du microbiome lors d'une IRA virale pourrait impacter le développement d'infections et de pathologies respiratoires ultérieures chez les jeunes enfants^{160,310,393,394}. Pour le moment, ces interactions ont été principalement décrites au niveau intestinal.

En conclusion, les années à venir seront sans aucun doute témoins de nombreuses autres études démontrant les associations du virome avec diverses maladies. Ces recherches supplémentaires pourraient aider à élucider le rôle et la composition du virome résident

entre les formes sévères et non sévères d'une infection ainsi que l'impact du virome sur la progression de la maladie. De plus, la majorité des études publiées sur le virome pulmonaire étant concentré sur la communauté des virus à ADN, peu de choses sont connues sur le rôle des virus à ARN, tant chez les individus sains que dans les états pathologiques. Enfin, il faut espérer que les prochaines études permettront également de réduire de manière significative la fraction de la matière noire virale.

5 Mycobiome

Alors que les maladies pulmonaires fongiques sont désormais répandues et constituent une préoccupation mondiale croissante, les études sur la composante fongique appelée "mycobiome" représente un domaine largement sous-étudié. A ce jour, quelques études se sont intéressées au mycobiome digestif ou cutané mais très peu se sont focalisées sur le mycobiome pulmonaire. Le développement de méthodes indépendantes des cultures a permis d'élargir nos connaissances sur les mycobiomes présents dans différents sites corporels et leur association avec les maladies^{286,395}. Cependant, une revue de littérature réalisée en 2017 cite l'existence de moins de dix études décrivant la composition fongique du microbiome à l'aide de techniques de séquençage NGS³⁹⁶. Malgré le peu de données disponibles dans ce domaine, il semble y avoir de nombreux parallèles entre les composants fongiques et bactériens du microbiome, comme la présence de certaines espèces fongiques chez des individus en bonne santé et l'existence d'une variabilité interindividuelle significative dans la diversité des espèces détectées^{396,397}.

Le mycobiome pulmonaire sain s'est avéré être principalement composé de membres des genres *Cladosporium*, *Eurotium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Candida* et *Pneumocystis*³⁹⁷. D'autres études ont également mis en évidence la présence des genres *Malassezia* et *Saccharomyces*^{244,395}. La communauté fongique semble plus stable que la communauté bactérienne, en particulier face à l'utilisation d'antimicrobiens³⁹⁸. Le mycobiome pulmonaire sain diffère de celui observé chez les patients souffrant de maladies respiratoires inflammatoires chroniques telles que l'asthme, la BPCO, la mucoviscidose et

la bronchectasie³⁹⁵. Chez les patients atteints d'asthme, de BPCO ou de mucoviscidose, une diminution de la diversité fongique a été observée^{395,397}. Cette faible diversité pourrait être liée à une fonction pulmonaire plus faible qui serait influencée par une prolifération fongique et/ou la perte de certaines espèces fongiques³⁹⁵⁻³⁹⁷. Cependant, certaines données expérimentales semblent contradictoires et il n'y a pour le moment à notre connaissance pas de données sur la composition du microbiote respiratoire fongique cours d'une IRA virale.

Rôle du mycobiome : bénéfique, commensal ou pathogène ?

Le rôle pathogène de certaines espèces fongiques a largement été étudié, notamment les cas de surinfection à *Aspergillus* lors d'infections virales^{399,400}. En revanche, les liens éventuels entre diversité du mycobiome et la progression de certaines pathologies respiratoires ne sont quant à eux pas clairement définis. Pour certaines pathologies, comme les maladies inflammatoires de l'intestin ou l'hépatite B chronique par exemple, la diversité des champignons présents est proportionnelle à la progression de la maladie alors que dans d'autres pathologies, comme la mucoviscidose ou les allergies, la diversité fongique est inversement proportionnelle à la progression de la maladie^{305,401}. Il est donc difficile de tirer une conclusion sur la corrélation entre les maladies et la diversité fongique. Chez les personnes atteintes de maladies infectieuses, la diversité fongique est plus susceptible d'avoir une corrélation positive avec le statut de la maladie, puisque les champignons peuvent exacerber l'infection. Cependant, il est également possible que la progression de la maladie et la diversité fongique soit inversement proportionnel dans le cas où l'environnement deviendrait moins adapté à la croissance fongique par dysfonctionnement pulmonaire notamment via le mucus comme observé pour la mucoviscidose²⁸⁶.

6 Réponse immunitaire et microbiome pulmonaire

Des études sur modèle murin ont montré que le microbiome pulmonaire pouvait influencer la réponse immunitaire de l'hôte au niveau local. En effet, lorsque le microbiome commensal était absent, l'activité antibactérienne exercée par les macrophages alvéolaires était compromise et la clairance des bactéries potentiellement pathogènes diminuée⁴⁰².

Le microbiome joue également un rôle important dans la réponse pulmonaire à une infection virale. Des études sur des modèles murins ont par exemple démontré que les bactéries commensales des voies aériennes supérieures protègent les souris de la mort suite à l'infection par le virus de la grippe grâce à l'activation des macrophages en macrophage M2, qui sécrètent des médiateurs anti-inflammatoires tels que l'IL-10 et le TGF- β ⁴⁰². Une récente étude a mis en évidence une inflammation plus précoce et plus importante dans le poumon de souris axéniques comparé à celui de souris sans pathogène spécifique après administration intranasale de LPS, un composant des bactéries Gram-négatives⁴⁰³. Dans cette même étude, des explants pulmonaires ont été infectés par le VRS, ce qui a entraîné une plus grande inflammation pour les explants des souris axéniques⁴⁰³. Chez l'homme, Diaz-Diaz et al., ont mis en évidence que l'abondance des profils d'*Haemophilus* et de *Streptococcus* était associée à une surexpression significativement plus importante des voies de signalisation des TLR et des neutrophiles ainsi qu'à une plus grande sévérité clinique de l'infection à VRS³³⁴. Ces différentes études suggèrent que le microbiote est impliqué dans la maturation du système immunitaire inné pulmonaire.

7 Interactions trans-règles

Lors d'une IRA virale, les virus pathogènes responsables de l'infection sont les principaux constituants du virome. Il existe des interactions trans-règles capables de modifier la pathogénèse virale de manière bénéfique pour l'hôte ou le virus mais il y a peu d'études sur les interactions dans les poumons sains, les études s'étant surtout concentrées sur l'étude des interactions au niveau digestif⁴⁰⁴.

7.1 Interactions Virome/Bactériome respiratoire

En dehors des études montrant le rôle du bactériome dans les IRA virales décrites paragraphe 3.6 de ce chapitre, des études récentes sur des modèles *in vitro* de cellules épithéliales respiratoires et murins de la pathogénèse virale ont mis en évidence des interactions directes et indirectes, entre le bactériome et les virus pathogènes capables de maintenir une immunité antivirale ou de favoriser la pathogénicité voire la sévérité des IRA virales^{278,345}. Cependant, toutes n'ont pas encore été prouvées chez l'homme.

L'exemple historique le plus connu d'interactions virus/bactérie dans les voies respiratoires est peut-être celui de la pandémie de grippe espagnole de 1918, au cours de laquelle des millions de personnes sont mortes d'une pneumonie bactérienne secondaire après une première infection par le virus de la grippe A⁴⁰⁵. L'un des principaux modes d'action par lequel les virus respiratoires prédisposent les individus aux infections bactériennes secondaires est la perturbation de la barrière épithéliale des voies respiratoires, qui facilite l'adhésion des pathogènes bactériens^{270,291,406}. *S. pneumoniae*, *H. influenzae* et *S. aureus*, sont les trois bactéries majeures, à la fois commensales et pathogènes retrouvées au niveau du microbiome respiratoire, et responsables des surinfections bactériennes suite à une infection par un virus influenza^{334,345}.

Des études plus fines afin de rechercher de potentielles interactions entre virus et bactéries pathogènes au niveau respiratoire ont été mises en place. Bien que moins étudiés que pour le virus influenza, d'autres virus pathogènes à tropisme respiratoire prédisposent également à un risque de surinfection bactérienne et à des formes respiratoires sévères. En

effet, comme pour le virus influenza, une infection à VRS prédispose les populations vulnérables à une seconde infection pulmonaire bactérienne via des interactions directes entre le VRS, *S. pneumoniae* et *H. influenzae*^{334,407}.

Par ailleurs, le bactériome peut également favoriser l'infection virale. Par exemple, *H. influenzae* pourrait faciliter l'entrée du Rhinovirus et du VRS dans la cellule respiratoire en induisant la surexpression du récepteur d'adhésion ICAM-1 à la surface de l'épithélium respiratoire et en régulant à la hausse la production de cytokines pro-inflammatoires, augmentant ainsi la sévérité de l'infection^{291,345,408}. Un autre exemple est celui des bactéries sécrétant des protéases qui vont en clivant la HA virale du virus influenza permettre la fixation au récepteur cellulaire³⁴⁵.

Des mécanismes décrits uniquement au niveau digestif pourraient également exister au niveau respiratoire comme par exemple l'interaction entre les LPS de certaines bactéries et les virus permettant d'accéder à certains TLR et favorisant ainsi leur propre passage par inhibition de la réponse antivirale⁴⁰⁹.

La présence d'espèces bactériennes spécifiques dans le bactériome respiratoire peut également entraver les infections virales. En effet, le microbiome bactérien est capable de favoriser une certaine immunomodulation ce qui permet de réguler la pathogenèse virale en limitant les dégâts tissulaires liés à l'exacerbation inflammatoire en réponse à l'infection par un virus. Drajac *et al*, ont étudié l'influence du microbiome pulmonaire sur la réponse cytokinique à la suite de l'infection par le VRS en utilisant des explants pulmonaires de souris axéniques ou élevées en conditions EOPS (exempt d'organisme pathogène spécifique). Le tissu pulmonaire dépourvu de flore bactérienne (souris axéniques) présentait une production de cytokines pro-inflammatoires significativement plus forte bien que la réplication virale était identique dans les deux types d'explants⁴¹⁰.

Plusieurs études sur modèle murin et sur le virus *Influenza* ont également pu montrer l'importance de l'intégrité du microbiome respiratoire sur la tolérance aux infections virales. En effet, Wang *et al*, ont prouvé que les souris EOPS étaient plus sensibles à l'infection que les souris sauvages (contrôle). De plus, via l'administration intranasale de

bactéries commensales, ils ont mis en évidence que les atteintes histopathologiques des souris EOPS était fortement réduites⁴¹¹. Une étude similaire a mis en évidence une réduction des altérations pulmonaires chez les souris sauvages possédant un microbiome sain⁴¹². En effet, après traitement par un cocktail d'antibiotiques induisant une dénaturation du microbiome, les souris infectées par le virus influenza A présentaient une forme sévère de la maladie associée à une diminution de la capacité de migration des cellules dendritiques ainsi que de la concentration en cellules lymphocytaires T spécifiques au niveau tissulaire. Ces deux facteurs contribuaient ainsi au maintien d'une charge virale élevée dans les poumons induisant une altération pulmonaire plus importante. Par ailleurs, il a été montré que l'administration de probiotique chez des souris préalablement traitées par antibiotique permettait une restauration du microbiome et de ce fait une restauration de la réponse immunitaire favorisant ainsi la clairance virale⁴¹³.

Ces différentes études prouvent que lorsque le microbiome est altéré, la pathogénèse est augmentée et la réponse immunitaire inadaptée.

7.2 Interaction Virus/Myco biome respiratoire

Si les interactions virus-bactéries sont les plus décrites dans la littérature, un nombre plus restreint d'études in vivo se sont intéressées aux interactions entre virus pathogènes respiratoires et surinfection fongique. Plusieurs études de cas ont mis en évidence une augmentation significative d'aspergillose pulmonaire invasive lors de la circulation de virus respiratoires notamment par le virus *influenza H1N1*, VRS et *adénovirus*^{345,414}. Il n'existe pas encore de données prouvées in vivo pour caractériser des mécanismes d'interactions directs ou indirects via l'immunité de l'hôte.

7.3 Interaction Virus/phageome respiratoire

Les bactériophages peuvent avoir un impact indirect sur les infections virales par le biais de la régulation du bactériome. Par ailleurs, il existe aussi des effets directs entre les bactériophages et les virus pathogènes. En effet, les bactériophages possèdent de nombreux motifs moléculaires caractéristiques des micro-organismes appelés « pathogen-

associated molecular pattern » (PAMP) communs aux virus pathogènes qui peuvent donc stimuler la réponse immunitaire de l'hôte³⁴⁵. Les bactériophages peuvent également limiter l'infection virale par compétition au niveau des récepteurs cellulaires, c'est le cas notamment du phage T4 qui entre en compétition avec l'EBV au niveau de la muqueuse intestinale par exemple⁴¹⁵. Jusqu'à présent les phages étaient uniquement utilisés pour les thérapies antibactériennes, mais il serait intéressant d'étudier leur potentiel antiviral également.

7.4 Interaction Bactériome/Mycobiome

Certaines études ont mis en évidence une corrélation positive entre l'apparition de bactéries et la présence de champignons, par exemple la surinfection par *Mycobacterium* se produit parfois en même temps que l'aspergillose²⁸⁶. Il a également été démontré *in vitro* et *in vivo* que la formation de biofilms par *S. aureus*, *S. pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* endommage les épithéliums respiratoires, ce qui permet aux biofilms fongiques de se développer, par exemple *Pseudomonas aeruginosa* stimule la croissance d'*Aspergillus fumigatus*²⁹¹.

Dans d'autres cas les bactéries entrent en compétition avec les champignons. Par exemple, la croissance des espèces de *Candida* est limitée en présence de *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose²⁸⁶. Cette inhibition de la croissance fongique peut s'expliquer par une compétition au niveau des besoins nutritionnels ainsi que des sites de fixation sur les cellules hôtes.

8 Conclusion

Les observations cliniques des surinfections respiratoires après une IRA virale ont largement motivé la recherche de mécanismes d'interactions directs et indirects entre les virus respiratoires et les microorganismes commensaux responsables d'une surinfection. Les études réalisées suggèrent que le microbiome peut jouer un rôle dans la régulation de l'immunité innée de l'hôte face aux infections virales, modulant ainsi la gravité des IRA. À côté du rôle du microbiome respiratoire, de nombreuses études suggèrent que le microbiome digestif est également impliqué dans les IRA. Cependant, il est important de noter que les différentes études réalisées n'ont fait qu'entrevoir une faible partie des mécanismes liant microbiome et réponse de l'hôte. En effet, jusqu'à présent, la majorité des études visant à explorer le microbiome respiratoire ont été réalisées de manière séquentielle, c'est-à-dire découpée selon les trois classes d'agents infectieux : bactérie, virus, champignons. Au vu des interactions complexes mises en évidence entre ces différents règnes, il est nécessaire de développer une approche plus globale afin d'étudier simultanément les différentes communautés microbiennes ainsi que la réponse de l'hôte face à l'infection au cours du temps. De plus, certains mécanismes d'interactions étant encore peu connus au niveau respiratoire, de futures études devraient s'intéresser aux interactions directes virome-mycobiome et mycobiome-bactériome, ainsi qu'au rôle du virome (de procaryote et d'eucaryotes) et du mycobiome dans l'immunité antivirale respiratoire. Enfin, les découvertes soulignent aussi la nécessité de développer de nouvelles thérapies à base de probiotiques et d'identifier de potentiels biomarqueurs prédictifs de sévérité.

Chapitre 4 Projet VIBRAFLU

1 Contexte et hypothèses

La gravité des infections respiratoires aiguës (IRA) est déterminée par des interactions complexes entre le/les virus infectants, les facteurs environnementaux et les facteurs liés à l'hôte. Ces interactions sont encore mal comprises et l'issue de la maladie n'est pas prévisible au moment de l'infection du patient.

Des études récentes suggèrent que le microbiome respiratoire est impliqué dans la détermination de l'incidence et de la gravité des IRA. La plupart des études sur le microbiome se sont concentrées sur sa composante bactérienne, et la composition et le rôle du virome respiratoire pendant l'IRA restent à identifier. L'impact de la composition du bactériome respiratoire sur la gravité de la bronchiolite est de plus en plus étudié mais reste controversé. Les interactions au sein du microbiome (interactions trans-règles) sont de plus en plus impliquées dans l'évolution de diverses maladies telles que le sida, les maladies inflammatoires de l'intestin ou les infections virales entériques mais n'ont pas été encore étudiées au niveau respiratoire.

En raison de l'hétérogénéité du microbiome respiratoire chez l'homme, de grandes études prospectives sont nécessaires pour établir un lien entre le microbiome respiratoire et la gravité des IRA chez les enfants.

Le projet ViBraFlu vise à identifier les interactions entre les communautés virales et bactériennes au sein du microbiome respiratoire et leur impact sur les réponses transcriptomiques de l'hôte lors d'IRA chez les enfants dans le but de définir des biomarqueurs pronostic de la sévérité.

Nos hypothèses sont que :

- Les interactions entre le virome et le bactériome influencent la réponse de l'hôte face à l'infection et déterminent ainsi l'issue de la maladie,
- Les signatures composées d'ADN/ARN humain, viral et bactérien pourraient être utilisées comme biomarqueurs pour identifier les patients risquant de développer des formes sévères.

2 Objectifs de la thèse

Les objectifs de ce travail de thèse ont donc été de caractériser les changements dans la composition du virome respiratoire (virus d'eucaryotes et de procaryotes) et du bactériome respiratoire associés aux IRA sévères afin 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 dès les temps précoces de la maladie. Les réponses transcriptomiques respiratoires de l'hôte face à l'infection ont également été étudiées pour déterminer un potentiel impact du microbiote dans la réponse aux IRA.

Dans un premier temps, nous avons analysé les dossiers cliniques des patients provenant d'une cohorte d'enfants de moins de 5 ans admis aux urgences pédiatriques des Hospices Civils de Lyon (HCL) pour un syndrome grippal aiguë pendant les hivers 2015-2017 afin de les classer en deux groupes : (1) ceux atteints d'une IRA des voies respiratoires supérieures (URTI ou infection bénigne), (2) ceux atteints d'une IRA des voies respiratoires inférieures (LRTI ou infection sévère) (**Partie Résultats, Chapitre 1**).

Ensuite, nous avons étudié les populations virales constituant le virome respiratoire des patients de la cohorte en les corrélant aux données cliniques (**Partie Résultats, Chapitre 2**).

De la même manière, nous avons étudié les populations bactériennes constituant le bactériome respiratoire des patients de la cohorte, en corrélant les données du microbiote bactérien aux données cliniques (**Partie Résultats, Chapitre 3**).

Enfin, les réponses transcriptomiques respiratoires de l'hôte face à l'infection ont également été étudiées et corrélées aux données cliniques (**Partie Résultats, Chapitre 4**).

L'analyse conjointe de ces données multi-omiques n'a pas pu être réalisé dans le cadre de cette thèse et sera poursuivi pour mettre en évidence d'éventuelles interactions trans-règles en lien avec la sévérité des bronchiolites.

Partie B : Résultats

Chapitre 1 : Cohorte VIBRAFLU

1 Méthodes

1.1 Type d'étude

Il s'agit d'une étude monocentrique et prospective menée en période épidémique au sein des services des urgences pédiatriques des Hospices Civils de Lyon (HCL) pendant les hivers 2015-2017 (de décembre à mars).

1.2 Echantillons et population

Les prélèvements respiratoires ont été recueillis de manière prospective pour 144 patients admis à l'unité d'hospitalisation de courte durée (UHCD) de l'Hôpital Femme Mère Enfant (HFME) pour un syndrome grippal aiguë pendant les hivers 2015-2017. Parmi ces 144 prélèvements, 138 aspirations nasopharyngées (ANP) et 6 nez-gorge (NG) ont été collectés par les infirmières du service puis aliquotés dans deux cryotubes : un avec seulement le prélèvement pour les axes d'études virome et bactériome respiratoire et un contenant du RNA later (Qiagen, Hilden, Allemagne) pour l'axe d'étude transcriptome humain. Les prélèvements ont été conservés à -80°C jusqu'à l'analyse.

Les **critères d'inclusion** étaient les suivants :

- Patients âgés de moins de 5 ans,
- Patients admis à l'unité d'hospitalisation de courte durée (UHCD) pour IRA pendant la saison hivernale (dates d'inclusions pour les deux saisons : de décembre à mars).

Les **critères d'exclusion** étaient les suivants :

- Enfants présentant une comorbidité significative associée (pathologie chronique respiratoire dont mucoviscidose et dysplasie bronchopulmonaire),
- Enfants présentant une cardiopathie congénitale mal tolérée (cyanogène, défaillance cardiaque avec traitement),
- Enfants présentant une immunodéficience connue.

1.3 Diagnostic virologique

Le diagnostic virologique a été réalisé sur des échantillons collectés dans un milieu de transport *virocult*® et envoyés immédiatement au laboratoire de virologie.

L'extraction des acides nucléiques a été réalisée avec l'automate *NucliSens easyMAG* (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) en sélectionnant le protocole spécifique B. La recherche de virus respiratoire a été réalisée par RT-PCR en temps réel, en utilisant le *kit Respiratory Multi Well system MWS r-gene*® (Biomerieux, Marcy l'étoile, France) sur la plateforme ABI 7500 (AppliedBiosystems, Foster City, Cal.) pour les VRS, Métapneumovirus, Grippe A/B et pour quelques échantillons pour les Picornavirus (Rhinovirus et Entérovirus).

Une estimation semi-quantitative de la charge virale a été obtenue, via la détermination d'un Cycle seuil de détection (« Cycle threshold » ou Ct). Une charge virale a été considérée comme élevée lorsque le Ct était inférieur à 20, comme indiqué dans la littérature¹⁶³.

1.4 Collecte des données cliniques et variables recueillies

Pour les patients inclus, les données suivantes ont été recueillies :

- Les caractéristiques démographiques (dont les facteurs exposant au risque d'évolution défavorable de la bronchiolite) : sexe, prématurité, âge à l'admission aux urgences, exposition à un tabagisme passif, fratrie, mode de garde, présence ou non d'un allaitement.
- Les caractéristiques cliniques lors de l'admission : SpO2, Fréquence respiratoire (FR) et poids.
- Les caractéristiques cliniques lors de la prise en charge : SpO2 la plus basse, FR la plus haute, nécessité de support ventilatoire et/ou alimentaire, nécessité de supplémentation en O2.
- Le lieu et la durée d'hospitalisation (unité d'hospitalisation de courte durée (UHCD) ou soin intensif).
- Les caractéristiques virologiques : présence ou non d'une co-infection virale, mesure de la charge virale.

Toutes les données n'ont pas pu être recueillies pour l'intégralité des patients admis. Le recueil de ces données a été réalisé via une fiche de renseignement remplie par les médecins ou étudiants des services lors de l'hospitalisation des patients, et quand nécessaire complété via les données mises à disposition dans le logiciel Easily.

1.5 Classification Clinique

En fonction de leur évolution clinique après la collecte de l'échantillon, les patients ont été classés en deux groupes : URTI (bénins : en l'absence de complication) ou LRTI (sévères : présentant des complications respiratoires). Les critères utilisés pour classer les enfants dans le groupe LRTI étaient les suivants : infection respiratoire avec toux ou difficulté à respirer (signe de lutte intense), et fréquence respiratoire élevée selon les critères de l'OMS (si < 2 mois : > 60 respirations par minute ; si 2-12 mois : >50 respirations par minute ; si > 12 mois : > 40 respirations par minute)^{118,416} ou nécessité de supplémentation en oxygène avec ventilation invasive ou non invasive ou SpO2 <93%. Les patients hospitalisés en unité de soins intensifs pour complications respiratoires ont également été classés dans le groupe LRTI.

1.6 Ethique

Les échantillons respiratoires ont été collectés pour les analyses de routine nécessaires à la prise en charge de la maladie pendant le séjour à l'hôpital et aucun échantillon supplémentaire n'a été prélevé pour cette étude. Conformément à la législation française relative à ce type d'étude, le consentement écrit des participants n'était pas requis pour l'utilisation des échantillons cliniques collectés et anonymisés (loi de bioéthique numéro 2004-800 du 6 août 2004). Au cours de leur hospitalisation aux HCL, les patients ont été informés que leurs données, y compris les échantillons cliniques, pouvaient être utilisées à des fins de recherche sauf en cas d'opposition de leur part.

2 Résultats

2.1 Caractéristiques démographiques de la cohorte

La moyenne d'âge était de 6 mois dont 77,8% avaient moins de 7 mois, 53,5% moins de 3 mois et 20,1% moins d'un mois. Il existait une prédominance masculine avec 56,3% de garçons. Seuls 21 patients (14,6%) présentaient un terme de naissance < 36 SA (semaines d'aménorrhée). 24,3% des patients bénéficiaient d'un allaitement maternel, 34% d'un allaitement artificiel et 18,1% d'un allaitement mixte. A noter que 22,9% des patients en étaient déjà à l'étape de diversification alimentaire. La majorité était gardée de manière individuelle (81,2%) et il y avait seulement 22,2% d'enfant unique. 63% des foyers déclaraient la présence d'un tabagisme passif.

Les données concernant les caractéristiques démographiques des patients contenus dans les groupes URTI et LRTI sont décrits dans le **Tableau 10**. Aucun des critères observés (Sexe masculin, prématurité, type d'allaitement, mode de garde, présence de fratrie et tabagisme passif) n'étaient significativement associés à la sévérité, excepté l'âge (inférieur à 2,8 mois) qui avec une p-value égale à 0,0324 était associé à la sévérité.

Tableau 10 Caractéristiques des patients inclus dans la cohorte ViBraFlu

		URTI n=47 (32,6%)		LRTI n=97 (67,4%)		p-value
	Variables	N (%)	NA (%)	N (%)	NA (%)	
Démographie	Sexe masculin	24 (51,1)		57 (58,8)		0,4876
	Age < âge médian 2,8 mois	30 (63,8)		42 (43,3)		0,0324
	Prématurité < 36 SA	4 (8,5)		17 (17,5)		0,2358
	Maternel	10 (21,3)		25 (25,8)		
	Artificiel	16 (34)		33 (34)		
	Mixte	9 (19,1)		17 (17,5)		0,9161
	Diversification	12 (25,5)		21 (21,6)	1 (1)	
	Garde en collectivité	9 (19,1)		16 (16,5)	2 (2,1)	0,9160
A l'accueil	Ø Fratrie	15 (31,9)		17 (17,5)		0,0830
	Tabagisme passif	21 (44,7)	5 (10,6)	42 (43,3)	9 (9,3)	0,9563
	Saturation < 95%	3 (6,4)	1 (2,1)	23 (23,7)		0,0240
Hospitalisation	FR > 60/min	1 (2,1)	3 (6,4)	31 (32)	3 (3,1)	0,0002
	Saturation < 95%	6 (12,8)	1 (2,1)	68 (70,1)		5,67E-10
	FR > 60/min	3 (6,4)	3 (6,4)	49 (50,5)		1,63E-06
	Support ventilatoire	1 (2,1)		64 (66)		1,91E-12
	Supplémentation en O2	1 (2,1)		63 (64,9)		4,07E-12
	Support alimentaire	0 (0)		49 (50,5)		6,19E-09
	Durée d'hospitalisation > 3 jours	8 (17)	1 (2,1)	46 (47,4)	2 (2,1)	0,0008
	UHCD	47 (100)		91 (93,8)		0,1946
Virologie	Soins intensifs	0 (0)		5 (5,2)		0,2718
	Lieu d'hospitalisation					
	Retour à domicile	0 (0)		1 (1)		1
Virologie	VRS	13 (27,7)		70 (72,2)	1 (1)	6,66E-07
	Grippe	10 (21,3)		4 (4,1)		0,0031
	MPV	4 (8,5)		16 (16,5)	1 (1)	0,2872
	Picornavirus	2 (4,3)	39 (83)	3 (3,1)	82 (84,5)	1
	Sans étiologie retrouvée	1 (2,1)	17 (36,2)	0 (0)	10 (10,3)	0,5753

Abréviations : SA : semaines d'aménorrhée ; FR : fréquence respiratoire ; UHCD : unité d'hospitalisation de courte durée ; RAD : retour à domicile.

2.2 Présentation clinique à l'admission et évolution clinique

Concernant la présentation initiale, 18,1% de patients présentaient une hypoxémie (SpO₂ (Saturation pulsée mesurée avec un oxymètre de pouls) inférieure à 95%) et 22,2% étaient polypnéiques avec une FR supérieure à 60/min.

L'hospitalisation a majoritairement eu lieu en UHCD (95,8%) et la durée d'hospitalisation était de 3,3 jours en moyenne avec une médiane de 2 jours (0 - 11 jours). 3,5% des nourrissons ont été transférés en unité de soins intensifs. L'hospitalisation en unité de soins intensifs durait en moyenne 7,4 jours, avec une médiane à 7 jours (5 – 11 jours). Parmi les 144 patients, 32,6% (n=47) ont été classé LRTI et 67,4% (n=97) étaient classé URTI. La saturation et la FR à l'accueil et pendant l'hospitalisation, la présence d'un support ventilatoire ou alimentaire, la nécessité d'une supplémentation en oxygène et la durée d'hospitalisation étaient significativement associés à la sévérité.

Les caractéristiques des patients inclus dans chacun des groupes sont résumées dans le **Tableau 10**.

2.3 Prévalence des différents virus respiratoires

Les 144 patients ont été testés pour la grippe et seulement 9,7% (n=14) d'entre eux étaient positifs avec un Ct moyen de 22,26. Parmi eux, 28,6% (n=4) des enfants présentaient une charge virale élevée. En ce qui concerne le VRS, 143 patients de la cohorte ont été testés et 58% (n=83) étaient positifs avec un Ct moyen de 20,95. Parmi eux, 39% (n=32) des enfants présentaient une charge virale élevée. 143 patients de la cohorte ont été testés pour le MPV et 14% (n=20) étaient positifs avec un Ct moyen de 25,16. Parmi eux, 5% (n=1) des enfants présentaient une charge virale élevée. Enfin, pour les Picornavirus, seulement 23 patients ont été testés et 21,7% (n=5) étaient positifs avec un Ct moyen de 27,88. Parmi eux, 20% (n=1) des enfants présentaient une charge virale élevée. Parmi les patients pour lesquels nous disposons de données virologiques, 4,2% (n=6) présentaient une co-infection virale respiratoire. Il pouvait s'agir d'une co-infection à VRS/MPV (n=1), VRS/Picornavirus (n=2), VRS/Influenza (n=2) et MPV/Picornavirus (n=1).

A noter que parmi les patients de la cohorte, pour 0,7% (n=1) des patients, aucun virus (Influenza, VRS, MPV, Picornavirus) n'a été détecté ; pour 0,7% (n=1) des patients, seul le virus Influenza avait été recherché et enfin pour 18% (n=26) des patients ni le VRS, ni le MPV ni le virus Influenza n'ont été détectés.

Les données virologiques des patients des 2 groupes sont décrits dans le **Tableau 10**.
 L'infection par le virus Influenza ou par le VRS était significativement associée à la sévérité.
 La répartition du nombre de cas par semaine pour chaque virus est représentée sur la **Figure 10**.

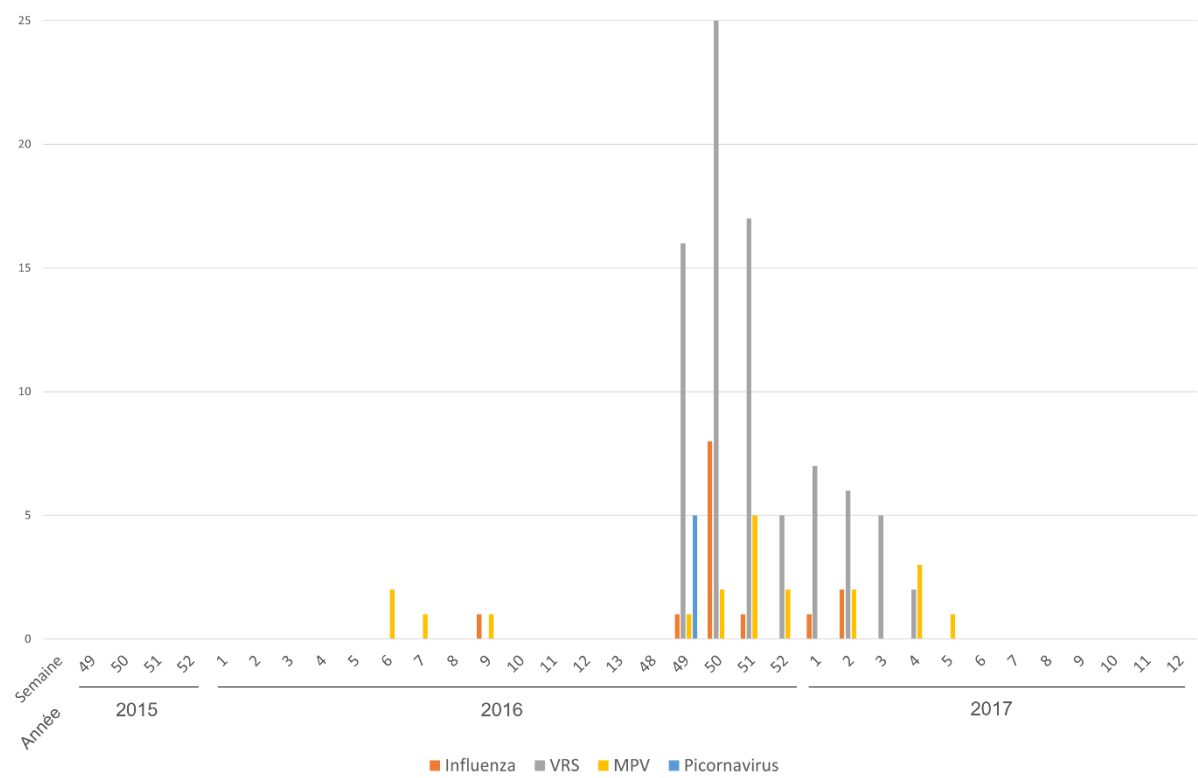


Figure 10 Répartition du nombre de cas par semaine pour chaque virus.
 Abréviations : VRS : Virus respiratoire syncytial ; MPV : Métapneumovirus.

3 Discussion/Conclusion

L'étude sur une population pédiatrique a été privilégiée pour plusieurs raisons : (1) les infections respiratoires aiguës virales sont la principale cause de morbidité et de mortalité chez les enfants, (2) la composition du microbiome respiratoire varie avec l'âge, de ce fait, les études portant sur le microbiome doivent être stratifiées par âge, (3) les enfants ont moins de maladies sous-jacentes que les adultes et constituent donc une population plus homogène.

Nous n'avons pas pu inclure un groupe d'enfants en bonne santé comme groupe témoin car cela aurait qualifié cette étude de recherche biomédicale selon la loi Huriet. Ceci nous aurait contraint à obtenir un consentement écrit des deux parents avant l'inclusion des enfants, ce qui n'était pas possible dans le cadre d'une étude mise en place dans l'unité d'urgence. Il s'agira d'une limite pour l'analyse de toutes les données issues de cette thèse puisque les modifications du microbiome et du transcriptome ne pourront être analysées qu'en rapport avec la sévérité de l'IRA et non pas la survenue d'une IRA.

Le virus le plus retrouvé dans notre cohorte est le VRS (n= 83 ; 58%), ce qui correspond aux données répertoriées dans la littérature puisque le VRS est le virus le plus fréquemment retrouvé lors d'hospitalisation pour IRA chez l'enfant de moins de 5 ans¹¹. Les autres virus identifiés dans notre cohorte sont le virus de la grippe, le MPV et les *Picornavirus* qui ont également des virus retrouvés dans d'autres études pédiatriques¹¹. Par ailleurs, seulement 4,2% présentaient une co-infection virale respiratoire alors que les chiffres rapportés dans la littérature indiquent 26,9% de cas de co-infections¹¹. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'un grand nombre de patients n'ont pas été testés pour la détection de *Picornavirus* ou encore par une charge virale faible donnant lieu à de faux négatifs en PCR.

Comme indiqué dans la littérature^{11,29,31}, le jeune âge était associé à la sévérité dans notre cohorte. Aucune des autres variables démographiques n'étaient associées significativement à la sévérité des IRA contrairement à dans la littérature où le sexe^{29,30,51}, la prématurité³⁰,

le type d'alimentation^{35,39}, la garde en collectivité²⁹, la présence de fratrie²⁹ et le tabagisme passif^{52,53} ont été identifiés comme facteur de risque de développer des formes sévères. Cette différence peut s'expliquer par la faible taille de notre cohorte mais aussi par une différence de classification de la sévérité utilisée dans ces études. Les variables cliniques observées à l'accueil et pendant l'hospitalisation ont quant à elles, toutes été associées significativement au groupe LRTI. Ceci n'est pas étonnant puisqu'une FR > 60 cycles/minutes, une SpO2 < 95%, l'utilisation de support ventilatoire ou alimentaire sont des critères observés afin d'évaluer la gravité de la maladie et ainsi orienter la prise en charge du nourrisson¹¹⁸.

Enfin, le principal problème rencontré lors de cette étude a été le manque de puissance pour obtenir des statistiques significatives. En effet, la taille de notre cohorte est relativement faible par rapport au nombre de variables examinées. Cependant, cette étude descriptive et exploratoire pourra permettre de calibrer de plus importantes études sur de plus grandes cohortes à l'avenir.

Chapitre 2 : Caractérisation du virome respiratoire chez l'enfant

1. Choix du type d'extracteur d'acides nucléiques

1.1 Introduction

Le développement des techniques de séquençage NGS a permis l'étude de population microbienne entière contenue dans un échantillon clinique permettant ainsi de détecter des agents pathogènes non ciblés par la PCR conventionnelle et d'identifier les virus émergents^{417–421}. Plusieurs études ont utilisé différents protocoles de métagénomique pour caractériser le virome de différents échantillon (selles humaines, sang, aspirations nasopharyngées...) ^{374,392,422,423}, mais l'absence de méthode standard limite considérablement la mise en place de ces techniques dans les laboratoires de routine⁴²⁴. Une étape cruciale pour la détection des virus à partir d'échantillons cliniques est celle de l'extraction des acides nucléiques⁴²⁵. Bien qu'il existe de nombreuses méthodes d'extraction manuelles et automatiques, des études ont mis en évidence des différences de performance entre elles. En effet, les méthodes d'extraction peuvent avoir un impact sur les résultats de qPCR (calcul de charge virale), sur les profils du bactériome ainsi que sur la détection de certains virus^{425–430}. De plus, en fonction des méthodes choisies, d'autres problèmes sont observés tels que les « cross-contamination » (contamination d'un échantillon à un autre) ou les contaminations liées au kitome (contaminations provenant de l'environnement ou des réactifs de biologie moléculaire sont observés et peuvent avoir un impact sur la caractérisation du virome humain dans les études de métagénomique^{431–433}.

L'objectif de notre étude était de comparer deux plateformes d'extraction automatisées couramment utilisées dans les laboratoires de diagnostic, l'eMAG (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) et le MagNA Pure 24 (MP24) (Roche, Bâle, Suisse), et une méthode d'extraction manuelle QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Allemagne), qui figure parmi les méthodes les plus populaires utilisées dans les laboratoires de recherche. Les performances de chaque kit d'extraction ont été évaluées en fonction (1) de leur capacité à

détecter différents virus à ADN et à ARN dans un échantillon fictif et dans des échantillons cliniques, (2) de leur taux de cross-contamination et (3) de la détection du kitome.

1.2 Article publié

Article

Comparison of Nucleic Acid Extraction Methods for a Viral Metagenomics Analysis of Respiratory Viruses

Marina Sabatier ^{1,2,3}, Antonin Bal ^{1,2,3}, Grégory Destras ^{1,2,3}, Hadrien Regue ¹, Grégory Quéromès ², Valérie Cheynet ⁴, Bruno Lina ^{1,2,3}, Claire Bardel ⁵, Karen Brengel-Pesce ⁴, Vincent Navratil ^{6,7} and Laurence Josset ^{1,2,3*}

¹ Laboratoire de Virologie, Institut des Agents Infectieux (IAI), Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Nord, F-69004, Lyon, France; marina.sabatier@chu-lyon.fr (M.S.); antonin.bal@chu-lyon.fr (A.B.); gregory.destras@chu-lyon.fr (G.D.); hadrien.regue@univ-lyon1.fr (H.R.); bruno.lina@chu-lyon.fr (B.L.)

² CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Team VirPath, Univ Lyon, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon, F-69007, Lyon, France; gregory.queromes@univ-lyon1.fr

³ Centre National de Référence France-Sud des Virus des Infections Respiratoires, Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Nord, F-69004, Lyon, France

⁴ Laboratoire Commun de Recherche Hospices Civils de Lyon - bioMérieux, Centre Hospitalier Lyon Sud, F-69310, Pierre-Bénite, France; valerie.cheynet@biomerieux.com (V.C.); Karen.BRENGEL-PESCE@biomerieux.com (K.B.-P.)

⁵ Université Lyon 1, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, CNRS UMR5558, F-69100, Villeurbanne, France; claire.bardel-danjan@univ-lyon1.fr

⁶ PRABI, Rhône Alpes Bioinformatics Center, UCBL, Université Claude Bernard Lyon 1, F-69000 Lyon, France; vincent.navratil@univ-lyon1.fr

⁷ European Virus Bioinformatics Center, Leutragraben 1, D-07743 Jena, Germany.

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

Received: 22 September 2020; 5 October 2020: date; Published: date

Abstract: Viral metagenomics next-generation sequencing (mNGS) is increasingly being used to characterize the human virome. The impact of viral nucleic extraction on virome profiling has been poorly studied. Here, we aimed to compare the sensitivity and sample and reagent contamination of three extraction methods used for viral mNGS: two automated platforms (eMAG; MagNA Pure 24, MP24) and the manual QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAamp). Clinical respiratory samples (positive for Respiratory Syncytial Virus or Herpes Simplex Virus), one mock sample (including five viruses isolated from respiratory samples), and a no-template control (NTC) were extracted and processed through an mNGS workflow. QIAamp yielded a lower proportion of viral reads for both clinical and mock samples. The sample cross-contamination was higher when using MP24, with up to 36.09% of the viral reads mapping to mock viruses in the NTC (vs. 1.53% and 1.45% for eMAG and QIAamp, respectively). The highest number of viral reads mapping to bacteriophages in the NTC was found with QIAamp, suggesting reagent contamination. Our results highlight the importance of the extraction method choice for accurate virome characterization.

Keywords: viral metagenomics; next-generation sequencing; acid nucleic extraction; sample cross-contamination; kitome

1. Introduction

The development of metagenomics next-generation sequencing (mNGS) has enabled the exploration of whole viral nucleic acids within a clinical sample (human virome) in order to detect pathogens not targeted by conventional PCR and to identify emerging viruses [1–8]. Several studies have used various mNGS protocols to explore the human virome in diverse clinical samples, including human stools [9,10], blood [11,12], cerebrospinal fluid [13,14], human tissues [15,16], and respiratory tract samples [17–21]. However, the lack of standardization, the cost and duration of sequencing, and the complexity of bioinformatics analysis critically limit the wide implementation of mNGS approaches in clinical labs [22].

In particular, the extraction of viral nucleic acids is a crucial step in the molecular detection of viruses from clinical samples [23]. While there are many manual and automatic extraction methods available, it is important to choose the most sensitive and reliable one for mNGS. Numerous studies evaluating different extraction platforms in terms of their viral qPCR performance have found that the choice of extraction platform has a major impact on the reliability of the diagnostic results [24–29]. Furthermore, nucleic acid extraction methods can also impact bacteriome profiles [30–32] as well as the detection of particular viruses with mNGS [16,23,27,29].

Other potential issues related to extraction methods are sample cross-contamination (contamination from one sample to another) [24,33,34] and contamination by sequences present in the environment [32,34] or in the molecular biology reagents (referred to as the kitome) [35–37]. In viral mNGS studies, these two aspects constitute a major concern and must be precisely evaluated [38–40]. The impact of nucleic acid extraction methods on human virome characterization, kitome, and cross-contamination has thus far been poorly studied [41,42].

The aim of this study was to compare two automated extraction platforms commonly used in diagnostic laboratories, the eMAG (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) and the MagNA Pure 24 (MP24) (Roche, Basel, Switzerland), and one manual QIAamp Viral RNA Mini Kit extraction (Qiagen, Hilden, Germany), which is among one of the most popular methods used in research laboratories. The performance of each extraction kit was evaluated in terms of (1) their ability to detect different DNA and RNA viruses in one mock sample and in clinical samples, (2) their sample cross-contamination rate, and (3) the detection of the kitome.

2. Materials and Methods

2.1. Design of the Mock Virome

The mock virome included known concentrations of five viruses isolated from respiratory samples (Table 1). These viruses were selected as representatives of a wide range of virus characteristics, such as different virion sizes (ranging from 30 to 300 nm), the presence or absence of an envelope, different genome lengths (ranging from 7 to 150 kb), different genome types (dsDNA, ssRNA), and different genome compositions (linear, segmented). All the viruses were provided by the virology laboratory at the university hospital of Lyon (Hospices Civils de Lyon). This mix contained the cell culture supernatant of Adenovirus 31 (AdV), respiratory syncytial virus A (RSV-A), herpes simplex virus 1 (HSV-1), influenza A virus, and rhinovirus. For each virus, clinical samples obtained from hospitalized patients were cultured with the appropriate cell line and media, for which the viral supernatant was then collected (Table 2).

Table 1. List of the five selected viruses included in the mock virome and the clinical respiratory samples. The mock virome consists of known concentrations of five viruses isolated from respiratory samples, selected as representatives of a wide range of virus characteristics (virion size, the presence or absence of an envelope, genome length, genome type (dsDNA, ssRNA), and genome composition (linear, segmented)). All the viruses were provided by the virology laboratory (Hospices Civils de Lyon). Human clinical respiratory samples were obtained from hospitalized patients. dsDNA : double stranded DNA; ssRNA : single stranded RNA.

Samples	Virus	Virus Family	Molecular typing	Baltimore Classification	Genome Composition	Genome size (kb)	Virion size (nm)	Enveloped	Ct value
Mock Virome	Adenovirus	<i>Adenoviridae</i>	ADV-A31	Group I: dsDNA	Linear	34	65/80	No	21,1
	Respiratory Syncytial Virus	<i>Paramyxoviridae</i>	RSV-A	Group V: ssRNA (-)	Linear	15	150	Yes	22,1
	Herpes Simplex Virus	<i>Herpesviridae</i>	HSV-1	Group I: dsDNA	Linear	150	120/300	Yes	26,2
	Influenza Virus	<i>Orthomyxoviridae</i>	IAV	Group V: ssRNA (-)	Segmented	13	80/120	Yes	20,4
	Rhinovirus	<i>Picornaviridae</i>	HRV-A13	Group IV: ssRNA (+)	Linear	7	30	No	29
Clinical samples	Herpes Simplex Virus	<i>Herpesviridae</i>	HSV-1	Group I: dsDNA	Linear	150	120/300	Yes	16,6
	Respiratory Syncytial Virus	<i>Paramyxoviridae</i>	RSV	Group V: ssRNA (-)	Linear	15,2	150	Yes	19,3

Table 2. Cell culture and media. The different types of cells used for culture are HEp-2 cells (human liver cancer cells, ATCC CCL-23), Vero cells (monkey kidney epithelial cells, ATCC CCL-81), MRC-5 cells (human fetal lung fibroblasts, Biowhittaker, 25-10-1995 produced by RD-Biotech (Besançon, France)), and MDCK cells (canine kidney epithelial cells, ATCC CCL-34). FBS: Foetal Bovine Serum; HEp-2: Human Epithelial cell line type 2; MDCK: Madin-Darby Canine Kidney; MEM: Minimal Essential Medium.

Virus	Cells	Nature of the sample	Culture media	Additional elements	Number of days in culture	Cryoprotectant medium
Adenovirus	Hep	stool	MEM	2% penicillin-streptomycin + 1% L-glutamine + 0,05% neomycin + 2% FBS + 2% Hepes Buffer	4	Yes
Respiratory Syncytial Virus	Hep	nasal throat	MEM	2% penicillin-streptomycin + 1% L-glutamine + 0,05% neomycin + 2% FBS + 2% Hepes Buffer	4	Yes
Herpes Simplex Virus	Vero	vaginal swab	MEM199	2% penicillin-streptomycin	3	No
Influenza A	MDCK	bronchoalveolar lavage	MEM	2% penicillin-streptomycin + 1% L-glutamine + 0,05% neomycin + 0,05% Trypsine + 2% Hepes Buffer	5	Yes
Rhinovirus	MRC5	tracheobronchial aspiration	MEM	2% penicillin-streptomycin + 1% L-glutamine + 0,05% neomycin + 2% FBS + 2% Hepes Buffer	5	Yes

Using the Ct values obtained by semi-quantitative real-time PCR assays (r-gene, bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) a mix with an identical Ct value for each virus was prepared. Individual aliquots of 250 µl were prepared in triplicate for each extraction method to evaluate (9 aliquots). Aliquots were stored at -80 °C (Figure 1).

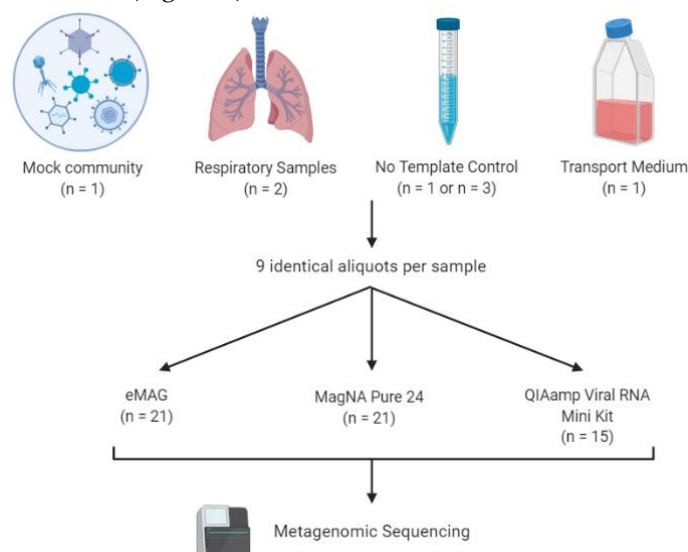


Figure 1. Overview of the study design. A mock virome containing five viruses isolated from respiratory samples representative of a wide range of virus characteristics (adenovirus 31, respiratory syncytial virus A, herpes simplex virus 1, influenza A virus, and rhinovirus) was prepared. Human clinical samples were obtained from hospitalized patients (one bronchoalveolar lavage positive for herpes simplex virus 1 (HSV-1) and one nasopharyngeal aspiration positive for respiratory syncytial virus A (RSV-A)). No template controls (NTCs) and transport medium samples were implemented in the process to control for sample and kitome cross-contamination. For the automatic extractors, NTCs were interspersed between the samples of each batch (n=3 per batch), whereas for the manual method only 1 NTC was included per batch (n = 1). To assess the reliability and reproducibility of the experimental results, the extractions and Nest Generation Sequencing (NGS) workflow were set up in triplicate (for the mock and respiratory samples), using the same amount of sample input. Finally, libraries were sequenced in the same run with Illumina NextSeq 500 TM using a 2 x 150 Paired-End (PE) high-output flow cell.

2.2. Sample Collection

Two additional patient samples—one positive for a DNA virus and one positive for an RNA virus—that were initially sent to our laboratory for routine viral diagnosis were also selected (Table 1). These clinical samples were a bronchoalveolar lavage (BAL) positive for HSV-1 and a nasopharyngeal aspiration (NPA) positive for RSV-A. These samples were stored at +4 °C for initial diagnosis and then diluted in transport medium (MEM medium + 1% L-glutamine + 1% fetal bovine serum + 2% Hepes) in order to obtain a sufficient volume for all the tests (up to 2.3 mL). Then, 250 µL aliquots were prepared in triplicate for each extraction method to evaluate (9 replicate samples in total). The aliquots were stored at -80°C (Figure 1).

2.3. Nucleic Acid Extraction

The selection of the manual kits and the different platforms was based on their commercial and hospital availabilities. The 3 different methods chosen were the NucliSENS eMAG platform (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France), the magNA Pure 24 platform (Roche, Basel, Switzerland), and the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)—all methods widely used in diagnostic laboratories. Frozen samples were thawed and homogenized by vortexing. Nucleic acids were extracted in parallel from 220 µL of the aliquot in triplicate for each kit, according to the

manufacturer's instructions. For the NucliSENS eMAG platform, specific protocol B 2.0.1 was selected. For the MP24 platform, protocol pathogen 1000 was selected. In addition, in order to evaluate the cross-contamination during automated extractions, no-template controls (NTC) were regularly interspersed between samples (i.e., 7 samples per series) (Figure 2). The QIAamp Viral RNA Mini Kit was used following the manufacturer's recommendation with the addition of an inert Linear Acrylamide (LA) carrier (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) to ensure the maximum recovery of nucleic acids. To assess the reproducibility of the experimental results, the extraction and NGS analysis were set up in triplicate (for mock and respiratory samples) using the same amount of sample input.

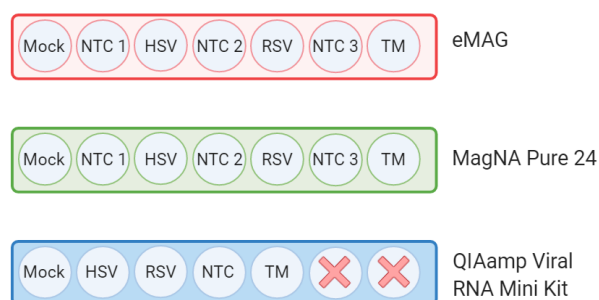


Figure 2. Arrangement of the samples on the extraction platforms. The three different extraction methods used here were the NucliSENS eMAG platform (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), MagNA Pure 24 platform (Roche, Basel, Switzerland), and manual QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Nucleic acids were extracted in triplicate from the same aliquot for each kit according to the manufacturer's instructions. In order to evaluate cross-contamination during the automated extractions, an NTC was regularly interspersed between samples (7 samples per series). To evaluate the kitome contamination, a transport medium sample was added in addition to NTC. Here, each color represents a different extraction method. NTC: No Template Control; HSV: Herpes Simplex Virus; RSV: Respiratory Syncytial Virus; TM: Transport Medium.

2.4. Metagenomic Workflow

As previously described, we used an mNGS protocol optimized in our lab [43]. Briefly, after thawing all the samples were supplemented with MS2 bacteriophage (Leviviruses genus) from a commercial kit (MS2, IC1 RNA internal control; r-gene, bioMérieux) to check the validity of the process. Only the RNA internal control MS2 was added because it validates all the steps of our protocol (including RT stage during amplification) in contrast to a DNA internal control. A no-template control (NTC) consisting of RNase free water was implemented to evaluate the contamination during the process. An additional negative control consisting of viral transport medium was added. For sample viral enrichment, a 3-step method was applied to 220 μ L of vortexed sample spiked with MS2 (low-speed centrifugation, followed by the filtration of the supernatant and then Turbo DNase treatment), as described in detail in Bal et al. [43]. After viral enrichment, the total nucleic acids were extracted using one of the three methods selected for the study described above. After random nucleic acid amplification using modified whole transcriptome amplification (WTA2, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), libraries were prepared using the Nextera XT DNA Library kit and sequenced with Illumina NextSeq 500 TM using a 2 x 150 PE high-output flow cell (Illumina, San Diego, CA, USA).

2.5. Bioinformatic Analysis

High-quality reads were filtered using trimmomatic PE and were further analysed using Kraken 2, followed by Bracken for a taxonomic abundance estimation [44]. A custom kraken 2 database made up of (1) human, bacteria, fungi, archaea, and plasmid genome sequences given by kraken 2 and (2) an in-house viral genome database was used (viromedb, personal communication). The viromedb

consists of complete viral genome sequences extracted from genbank and refseq subjected to vecscreen and seqclean softwares to remove the vectors and adaptor sequences and dustmasker to remove the low-complexity sequences.

2.6. Statistical Analyses

To compare the sensitivity of the three extraction methods, the mean proportion of total viral reads and specific viral abundance were determined. Kitome and sample cross-contamination were assessed by normalizing reads in reads per million (RPM), mapping the reads, and transforming them in $\log_{10}$ (RPM). For the kitome assessment, a sample was considered to be positive for a particular virus when the $\log_{10}$ (RPM) of this virus exceeded 1. Analyses were performed at the genus taxonomy level, except for the kitome, for which analyses were performed at the family taxonomy level. All the plots were constructed via ggplot2 and statistical analyses were performed with Rstatix using R (version 3.6.1). For all the statistical tests, the Student's t-test was used.

2.7. Data availability

The raw sequence data were deposited at SRA (PRJNA665071).

2.8. Ethics

Respiratory samples were collected for regular disease management during hospital stay and no additional samples were taken for this study. In accordance with the French legislation relating to this type a study, written informed consent from participants was not required for the use of de-identified collected clinical samples (bioethics law number 2004-800 of August 6, 2004). During their hospitalization in the Hospice Civils de Lyon (HCL), patients were made aware that their de-identified data including clinical samples may be used for research purposes, and they could opt out if they objected to the use of their data.

3. Results

Three different extraction methods were evaluated: two automated extraction platforms (eMAG and MP24) and a manual extraction kit (QIAamp) (Figure 1).

3.1. Sensitivity for the Detection of the Targeted Viruses

To evaluate the sensitivity of each method, the mean proportion of viral reads out of the total reads generated was first compared (Figure 3).

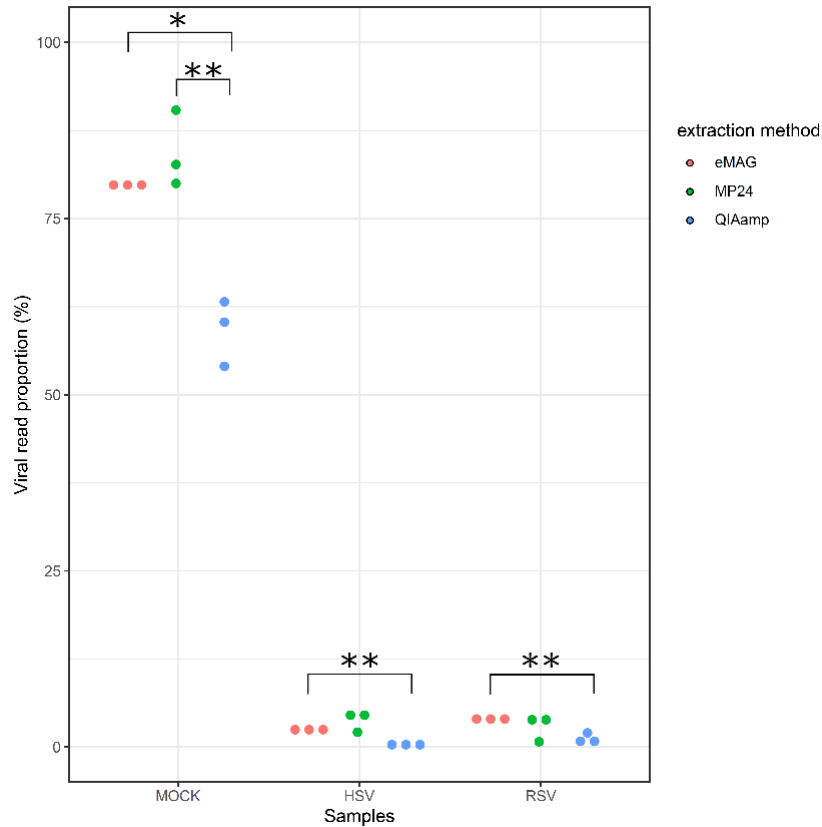


Figure 3. Distribution of the viral read proportion (%) according to the three extraction methods. QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAamp, blue dots), MagNA Pure 24 (MP24, green dots), and eMAG (eMAG, red dots) extraction methods for mock and clinical samples (HSV and RSV). HSV: herpes simplex virus; RSV: respiratory syncytial virus. The average of viral read proportions was compared two by two using a Student's t test (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

For the mock sample, both eMAG and MP24 yielded significantly higher proportions of viral reads (79.9% and 84.5%, respectively) in comparison with QIAamp (59.4%; $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). For the HSV-positive BAL, eMAG yielded a higher proportion of viral reads (2.6%) compared with QIAamp (0.5%, $p < 0.01$), but did not significantly differ with the MP24 (3.9% viral reads). For the RSV-positive NPA, a similar trend was observed, with an average of 4.3%, 3%, and 1.4% viral reads for eMAG, MP24, and QIAamp, respectively.

To determine potential bias in the detection of DNA or RNA viruses, the relative abundance of *Levivirus* (Internal Quality Control) and targeted viruses in each triplicate were then compared (Figure 4).

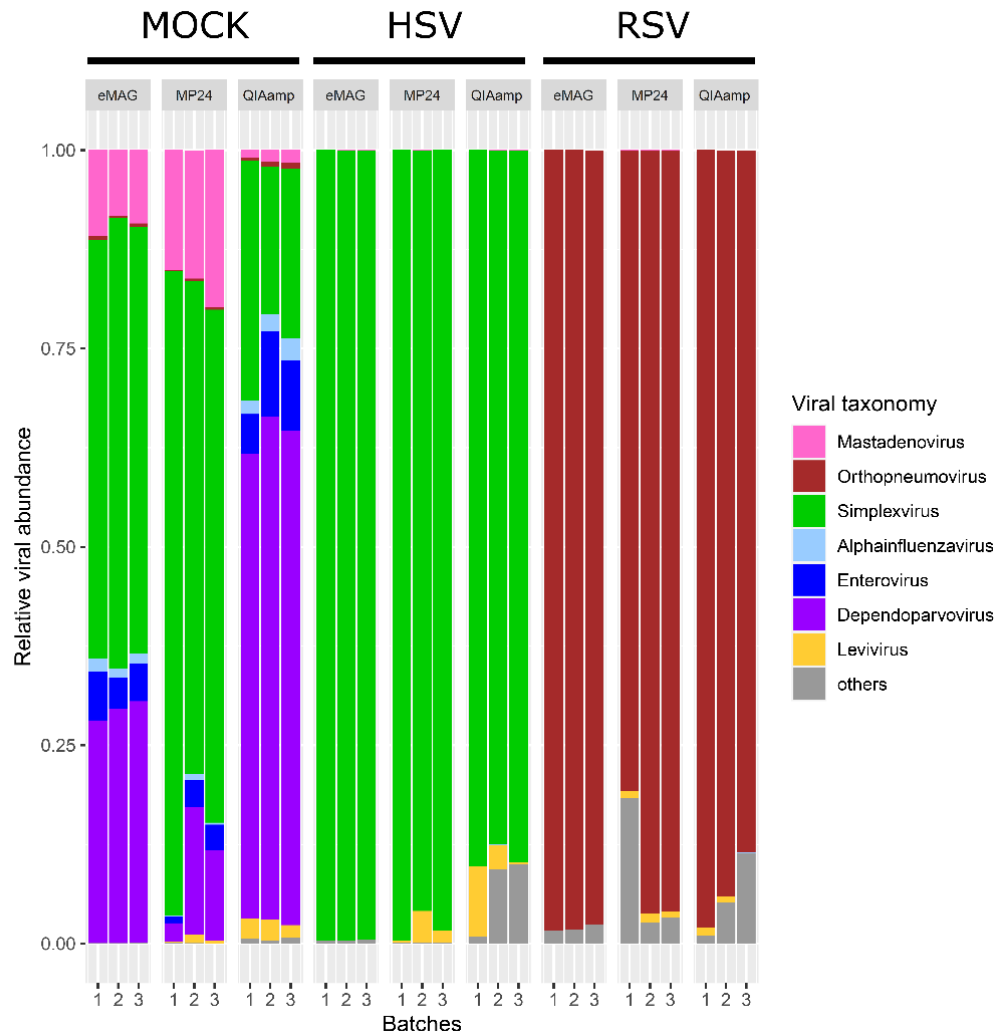


Figure 4. Taxonomic distribution (relative abundance) of triplicates for mock and clinical samples according to the three extraction methods. The relative distribution is described at the genus taxonomic level. Only major viral sequences are illustrated with different colours. HSV: herpes simplex virus; RSV: respiratory syncytial virus.

Levivirus was detected in all samples for MP24 and QIAamp, and in 8/9 samples for eMAG. For the targeted viruses, all the viruses were detected with all the extraction methods (Figure 4).

For the mock sample, a difference in the relative abundance of both the RNA and DNA viruses was noted when comparing the extraction methods.

The highest relative abundance of RNA viruses was observed using the QIAamp method (8.2% *Enterovirus*, 2.2% *Alphainfluenzavirus*, and 0.6% *Orthopneumovirus*), which was not significantly different from that of eMAG (5% *Enterovirus*, 1.4% *Alphainfluenzavirus*, and 0.4% *Orthopneumovirus*). The lowest relative abundance was obtained with MP24 (2.5% *Enterovirus*, 0.4% *Alphainfluenzavirus*, and 0.2% *Orthopneumovirus*; $p < 0.05$ only for *Alphainfluenzavirus* and *Orthopneumovirus* compared to the QIAamp method).

For DNA viruses, the highest relative abundance was obtained using eMAG and MP24 (54.4% and 69.3% for *Simplexvirus*, respectively, vs. 23.4% with QIAamp; 9.5% and 17.1% for *Adenovirus*, respectively, vs. 1.3% with QIAamp; $p < 0.01$).

Surprisingly, many reads associated with *Dependoparvovirus*, an ssDNA virus, were observed in the mock sample after the QIAamp extraction (29.4% with eMAG, 9.9% with MP24, and 61.4% with the QIAamp extraction).

3.2. Sample Cross-Contamination

The impact of the different extraction methods on sample cross-contamination was then evaluated from the NTC samples included between each sample during the extractions (Figure 2) by mapping the read count of viruses that were present in samples from the same batch: internal quality control (MS2, *Levivirus*) and targeted viruses (*Adenovirus*, *Orthopneumovirus*, *Simplexvirus*, *Alphainfluenzavirus*, *Enterovirus*, and *Dependoparvovirus*) (Figure 5).

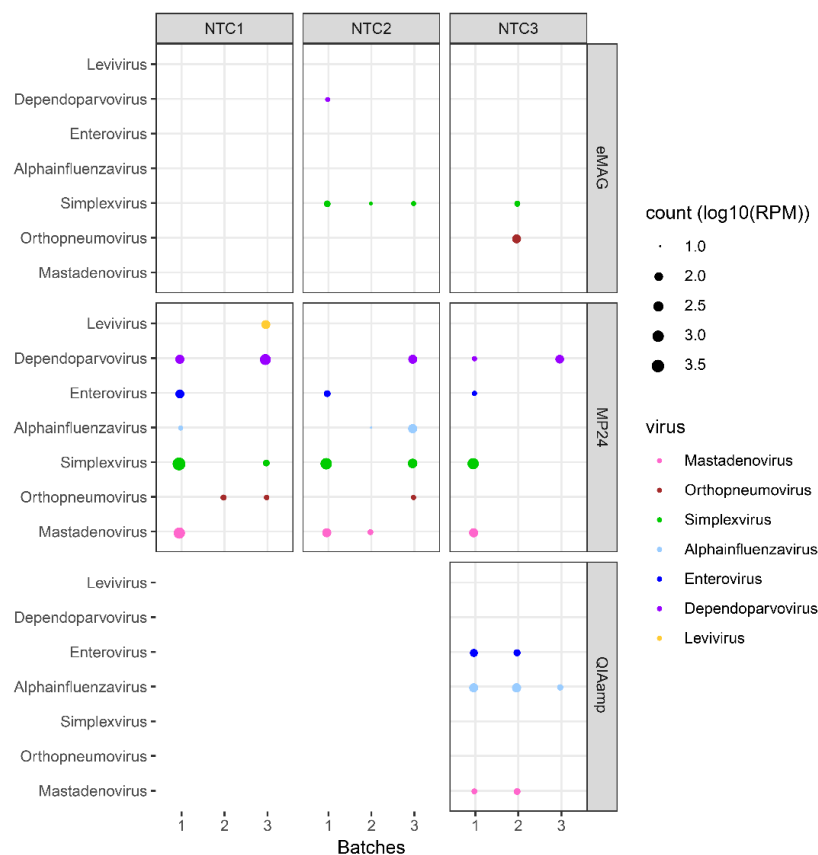


Figure 5. Sample cross-contamination. Bubble plot showing the normalized abundance in $\log_{10}(\text{RPM})$ of the targeted viruses in each NTC and for the different extraction methods. During the automated extractions, NTCs were interspersed between samples (i.e., 3 NTCs per batch). For manual extraction, only one NTC was added. Analyses were performed at the genus level. Each genus is represented by coloured dots. The size of the dots represents the abundance normalized in $\log_{10}(\text{RPM})$ for viral reads associated with sample cross-contamination. HSV: herpes simplex virus; RSV: respiratory syncytial virus; NTC: no template control; RPM: reads per million.

Levivirus was not found in any NTC extracted by eMAG and QIAamp but was found in 1/9 NTCs extracted by MP24 (MS2 $\log_{10}(\text{RPM}) = 2.1$).

For the two automatic extractors, the main contaminant was *Simplexvirus* (HSV1), found in 4/9 NTCs (up to $1.5 \log_{10}(\text{RPM})$) and in 5/9 NTCs (up to $3.7 \log_{10}(\text{RPM})$) extracted with eMAG and MP24, respectively. For eMAG, there was also a high level of *Dependoparvovirus* contamination in 1/9 NTCs ($\log_{10}(\text{RPM}) = 1.2$) and of *Orthopneumovirus* in 1/9 NTCs ($\log_{10}(\text{RPM}) = 2.1$). For MP24, cross-contamination was noted in the NTC, with all viruses contained in the mock 4/9 NTCs with *Mastadenovirus* (up to $2.9 \log_{10}(\text{RPM})$), 5/9 NTCs with *Dependoparvovirus* (up to $2.8 \log_{10}(\text{RPM})$), 3/9 NTCs with *Enterovirus* (up to $2.1 \log_{10}(\text{RPM})$), 3/9 NTCs with *Alphainfluenzavirus* (up to $2.1 \log_{10}(\text{RPM})$), and 3/9 NTCs with *Orthopneumovirus* (up to $1.3 \log_{10}(\text{RPM})$).

For the QIAamp manual extractor, the main contaminant was *Alphainfluenzavirus* (3/3 NTC, up to 2.2 log₁₀(RPM)). There were also contaminations with *Mastadenovirus* (2/3 NTC, up to 1.5 log₁₀(RPM)) and with *Enterovirus* (2/3 NTC, up to 1.8 log₁₀(RPM)).

Overall, the viral sample cross-contamination represented on average 0.002%, 0.107%, and 0.015% of the total reads generated from the NTC for the eMAG, MP24, and QIAamp extraction methods, respectively (corresponding to 1.53%, 36.09%, and 1.45% of the viral reads for the eMAG, MP24, and QIAamp extraction methods, respectively).

Importantly, for MP24 we also noted that sample cross-contamination was more associated with a batch effect than with the position of the sample in the extraction cartridge. Hence, while NTC#1, #2, and #3 were all contaminated, there was less contamination in all NTCs from batch #2 than in the NTCs from the two other batches of extractions (Figure 5).

3.3. Kitome Assessment

The impact of the different extraction methods on the viral kitome contamination was then evaluated by detecting in the NTC and TM the presence of reads associated with viruses other than the targeted viruses. The log₁₀(RPM) of the kitome was significantly higher with the QIAamp extraction compared to the eMAG and MP24 extractions ($p < 0.01$).

The viral kitome contamination generated from the NTC represented an average of 11.31 log₁₀(RPM), 16.88 log₁₀(RPM), and 70.77 log₁₀(RPM) with the eMAG, MP24, and QIAamp extraction methods, respectively (Figure 6a).

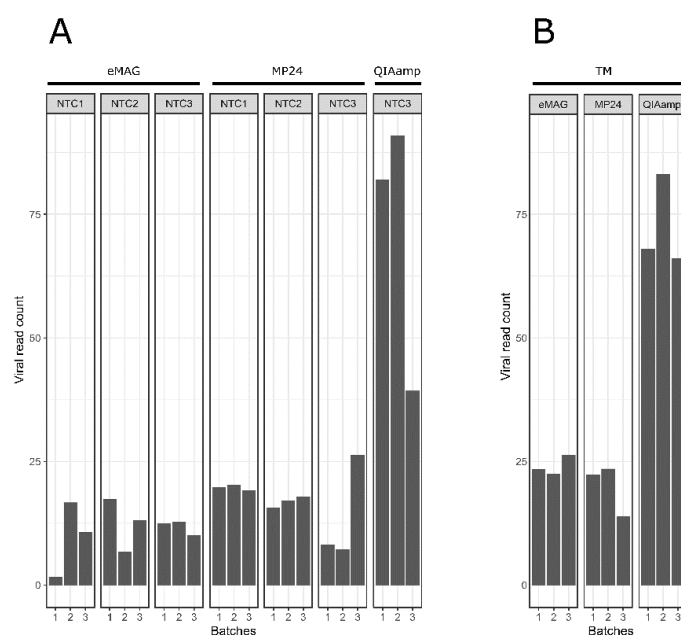


Figure 6. Proportion of Kitome contained in each triplicate from the different extraction methods (A) in NTC and (B) in the transport medium. Bar plot showing the sum of the viral read count normalized in log₁₀(RPM), associated with reagent contamination (i.e., reads associated with other viruses than the targeted viruses: kitome) for each NTC and TM compared between different extraction methods. During automated extractions, NTCs were interspersed between samples (i.e., 3 NTCs per batch). For manual extractions, only one NTC was added. In addition to the NTC, a transport medium was added. Analyses were performed at the family taxonomy level. A sample was considered to be positive for a particular virus when the log₁₀(RPM) of this virus exceeded 1. HSV: herpes simplex virus; RSV: respiratory syncytial virus; NTC: no template control; TM: transport medium; RPM: reads per million.

A total of 19, 28, and 55 different viral families were detected in the NTC with the eMAG, MP24, and QIAamp methods, respectively (Figure 7a).

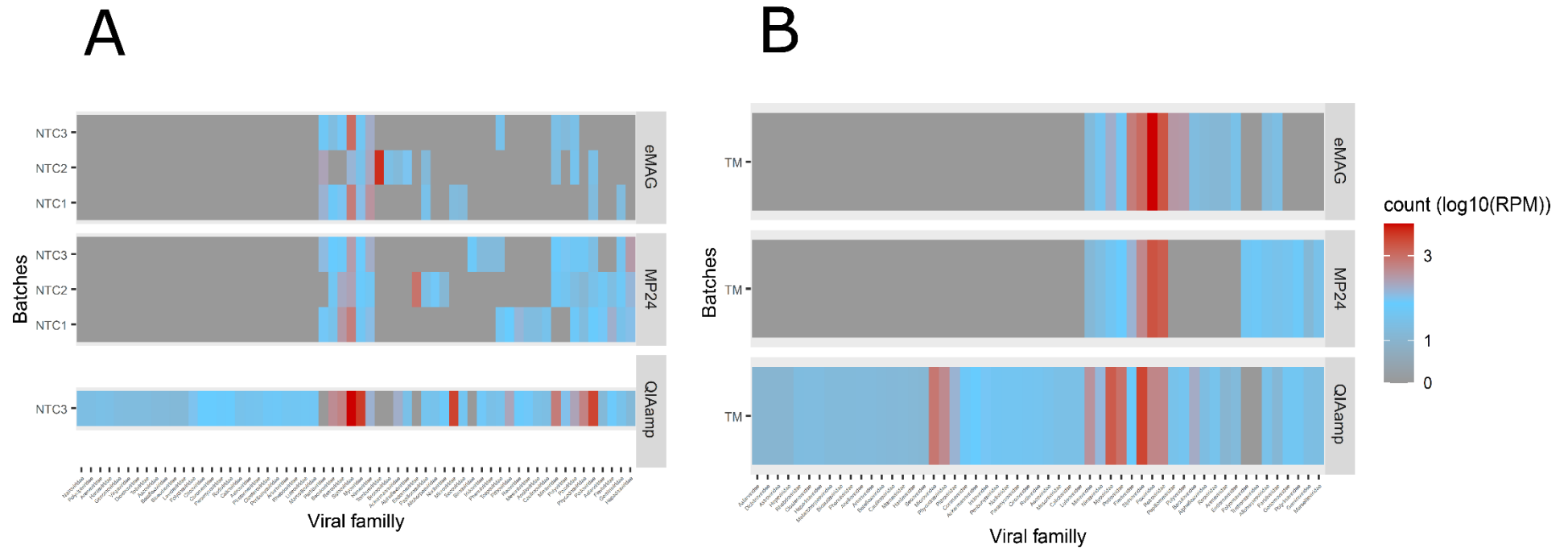


Figure 7. Virus family presence contained (A) in NTC and (B) in TM (other than the target virus) in each triplicate from the different extraction methods. The heatmap showed the viral family read count associated with the kitome (the presence of reads associated with other viruses than the targeted viruses) normalized in $\log_{10}(\text{RPM})$ in each NTC and TM between the different extraction methods. A gradient of colors was defined from gray (no count) to blue (few counts) to red (highest counts). During the automated extractions, the NTCs were interspersed between samples (i.e., 3 NTCs per batch). For manual extraction, only one NTC was added. In addition to the NTC, transport medium was added. Analyses were performed on the family taxonomical level. A sample was considered to be positive for a particular virus when the $\log_{10}(\text{RPM})$ of this virus exceeded 1. HSV: herpes simplex virus; RSV: respiratory syncytial virus; NTC: no template control; TM: transport medium; RPM: reads per million.

The contaminants derived mainly from bacteriophage families. In particular, *Siphoviridae* was found in all three methods (ranging from 2.32 to 3.39 log₁₀(RPM)), corresponding to 21.4%, 13.7%, and 4.8% of the total viral kitome reported with the eMAG, MP24, and QIAamp extraction methods, respectively.

Regarding the transport medium, the viral kitome contamination represented an average of 24.11 log₁₀(RPM), 19.94 log₁₀(RPM), and 72.45 log₁₀(RPM) with the eMAG, MP24, and QIAamp extraction methods, respectively (Figure 6b). The same main viral families associated with kitome were found for the two automatic extractors with a majority of *Poxviridae*, while for the manual extractor the main family found was *Siphoviridae* (Figure 7b).

Overall, the kitome contamination was higher with the QIAamp extraction ($p < 0.01$). *Siphoviridae* bacteriophages were found in the three methods, while other contaminants such as *Poxviridae* were specifically found in the transport medium extracted by the automated methods.

4. Discussion

In this study, we compared the performance of three extraction methods commonly used in clinical laboratories for viral mNGS analysis (eMAG, MagNA Pure 24, and QIAamp Viral RNA Mini Kit). The extractors yielding the highest proportion of viral reads were the two automatic extractors, eMAG and MP24. A previous study found that Qiagen kits tend to extract a high proportion of human nucleic acids, which could explain the lower viral proportion reported in the present study [29].

Despite this difference, all the viruses present in the mock or clinical samples could be detected with all the methods evaluated herein. Nonetheless, a difference in the relative abundance of RNA and DNA viruses was noted in the mock sample. The highest relative abundance of RNA viruses was reported with QIAamp, and the highest relative abundance of DNA viruses was reported with the eMAG and MP24 platforms. This bias should be taken into account during the interpretation of mNGS studies and underlines the importance of the extraction method choice, depending on the virus to be explored.

These differences could be due to the various properties of viruses, including the presence of an envelope, the type of genome, or the size of the virions. Yang et al. showed a better performance of RNA virus recovery with EasyMag (identical silica extraction technology and similar performance to that of Emag [45]) compared to the MagNA Pure Compact. They explained this difference by a possible RNA degradation or by an ineffective binding of RNA to the magnetic beads [30]. Finally, the higher sensitivity of the QIAamp kit for the detection of RNA viruses might be explained by the kit having been initially intended for the extraction of RNA viruses. The detection of DNA viruses would still be possible through the capture of the RNA transcripts of DNA viruses. Meanwhile, a higher number of reads on RNA viruses for the QIAAMP method was noted from the mock sample including both RNA and DNA viruses at equi-Ct; the supplementation of both DNA and RNA internal controls in NTCs would have been interesting for evaluating also the extraction bias in low-biomass samples. In addition to the differences related to the extraction methods, certain types of viruses or genomes can be preferentially amplified as described for the *Poliovirus* by Lewandoska et al. [23].

Moreover, bioinformatics analysis of mNGS data can also impact the viral reads annotation. The presence of gaps at the level of taxonomic classification (genus) can bias the interpretation for these given taxonomic groups (notably phages). The choice of the viral reference database is therefore crucial in order to limit viral misclassifications or the lack of detection of new emerging viruses [46]. Moreover, short reads reduce the accuracy of viral read assignation. As there is currently no gold standard in de novo assembly software for virome assessment, extensive benchmarking will be necessary in order to choose the most adapted method for future studies. With the new advances in third-generation sequencing and the improvement in sequence quality generated by this approach, we expect that the use of longer reads will lead to an increase in specificity as compared to short-read technology.

Interestingly, we observed many reads associated with *Dependoparvovirus* only in the mock sample, especially with the QIAamp extraction. This can be explained by the presence of ADV in the mock, which might be associated with *Adeno-associated dependoparvovirus* [47] or with contaminants from the

QIAamp column [35,48]. Our internal control (MS2, *Levivirus*) was detected for all replicates extracted with the three methods, except for two extracts with eMAG. As previously described, competition between the target viruses and MS2 might be observed during the process, leading to undetected MS2 [43].

To date, few studies have assessed the impact of different extraction methods on the performance of metagenomics. Klenner et al. evaluated four manual QIAamp nucleic acid extraction kits (QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAamp DNA Blood Mini Kit, QIAamp cador Pathogen Mini Kit, and QIAamp MinElute Virus Spin Kit) with four different viruses (including *Reovirus*, *Orthomyxovirus*, *Orthopoxvirus*, and *Paramyxovirus*), and reported that the selection of the kits has only a minor impact on the yield of viral reads and the quantity of reads obtained by NGS [28]. However, this study only evaluated manual kits from the same manufacturer and with separate RNA and DNA extraction methods.

Conversely, several studies have highlighted the importance of the nucleic acid extraction protocol in producing high-quality extracts suitable for sequencing [23,27,29]. Lewandoska et al. compared the impact of three extraction methods (QIAamp Viral RNA mini Kit, PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit, and automated NucliSENS EasyMAG) on the recovery of different viral genomes (*adenovirus*, *poliovirus*, HHV-4, *influenza A virus*). The EasyMAG extraction was more efficient for both RNA and DNA viruses, leading to a higher recovery of viral genomes. The mNGS results are highly susceptible to inaccurate conclusions resulting from the sequencing of contaminants [36]. In the present study, the viral contamination was higher with MP24 than with eMAG and QIAamp. Automated extraction platforms may lead to sample cross-contamination due to the generation of aerosols or robotic errors. Knepp et al. compared two automated extractors (BioRobot M48 instrument (Qiagen, Inc.) and MagNA Pure) and did not show contamination with the automated instruments [24]. However, they only investigated cross-contamination related to *enterovirus* (RNA virus), unlike our study, which evaluated a panel of RNA and DNA viruses.

The second source of contamination may come from the reagents (kitome) used throughout the process or from laboratory contaminants. The extractor for which the kitome abundance was highest was the QIAamp. The main contaminants were *Siphoviridae*, *Myoviridae*, *Microviridae*, and *Podoviridae*, which is consistent with other studies that have reported similar findings with spin columns [34]. In order to monitor the kitome and avoid misinterpretation, it is important to implement negative controls at different steps of the process [38,42,49]. Here, we did not add any internal controls in the NTC in order to get the highest sensitivity in detecting the kitome (without using reads to sequence MS2). On the other hand, the internal control MS2 was added in the TMs and was detected in all except one batch of the eMAG extraction in order to estimate the potential contaminants present in the transport medium, as it was previously published that fetal bovine serum contains DNA [50,51].

Furthermore, a computational approach for removing contaminants of viral origin should be developed, as previously described for bacteriome data [34,52].

Although the results show higher sample cross-contamination with the MP24 and higher kitome-related contamination with the QIAamp, other steps throughout sample processing can produce contamination. Here, we did not include an NTC at each step of the process to control for other sources of contamination. In addition, only a few respiratory samples were tested herein, and so further studies on a larger number of respiratory samples, as well as on other types of samples (stool, blood, and tissue) or other respiratory viruses (such as the SARS-CoV-2, which has the largest human RNA virus genome), should be performed. While three commonly used extraction methods have been evaluated in this study, it could be interesting to test others.

5. Conclusions

Our findings highlight the importance of extraction method choice for viral mNGS analysis. The eMAG platform yielded a higher proportion of viral reads, with a limited impact of reagents and sample cross-contamination compared to the QIAamp and MP24 extractors.

Author Contributions: Conceptualization, M.S., A.B., and L.J.; formal analysis, M.S., H.R., V.N., and L.J.; methodology, M.S.; resources, V.C and K.B-P.; software, H.R and V.N.; supervision, V.N and L.J.; writing—original draft, M.S.; writing—review and editing, M.S., A.B., G.D., G.Q., B.L., V.N., and L.J. All the authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Funding, eMAG®. The eMAG consumables and R-gene® kits necessary for this evaluation were provided by bioMérieux France. However, the data obtained during the evaluation were independently analyzed in the virology department of Lyon University Hospital, which possesses the entire final data bank. BioMérieux had no role in the study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Acknowledgments: This work was supported by the LABEX ECOFECT (ANR-11-LABX-0048) of Université de Lyon, within the program “Investissements d’Avenir” (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency (ANR). We are grateful to Florence Morfin, who provided culture strains of the different viruses in the study. The bioinformatics analysis was performed using the computing facilities of the CC LBBE/PRABI-AMSB.

Conflicts of Interest: Valérie Cheynet and Karen Brengel-Pesce are employees of Biomérieux. Antonin Bal has received a research grant from bioMérieux and has served as a consultant for bioMérieux. The other authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analysis, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Graf EH, Simmon KE, Tardif KD, Hymas W, Flygare S, Eilbeck, K., et al. Unbiased Detection of Respiratory Viruses by Use of RNA Sequencing-Based Metagenomics: A Systematic Comparison to a Commercial PCR Panel. *J. Clin. Microbiol.* **2016**, *54*, 1000–7. <https://doi.org/10.1128/JCM.03060-15>.
2. Xu L, Zhu Y, Ren L, Xu B, Liu, C., Xie, Z., Shen, K. Characterization of the nasopharyngeal viral microbiome from children with community-acquired pneumonia but negative for Luminex xTAG respiratory viral panel assay detection. *J. Med Virol.* **2017**, *89*, 2098–107. <https://doi.org/10.1002/jmv.24895>.
3. Yang Y, Walls SD, Gross SM, Schroth GP, Jarman RG, Hang, J. Targeted Sequencing of Respiratory Viruses in Clinical Specimens for Pathogen Identification and Genome-Wide Analysis. In: *The Human Virome*; Moya, A., Pérez Brocal, V., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2018; Volume 1838, p. 125–140. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8682-8_10.
4. Cummings MJ, Tokarz R, Bakamutumaho B, Kayiwa J, Byaruhanga T, Owor, N., et al. Precision Surveillance for Viral Respiratory Pathogens: Virome Capture Sequencing for the Detection and Genomic Characterization of Severe Acute Respiratory Infection in Uganda. *Clin. Infect. Dis.* **2019**, *68*, 1118–25. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy656>.
5. Paskey AC, Frey KG, Schroth G, Gross S, Hamilton T, Bishop-Lilly KA. Enrichment post-library preparation enhances the sensitivity of high-throughput sequencing-based detection and characterization of viruses from complex samples. *BMC Genomics* **2019**, *20*. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5543-2>.
6. Kufner, Plate, Schmutz, Braun, Günthard, Capaul, et al. Two Years of Viral Metagenomics in a Tertiary Diagnostics Unit: Evaluation of the First 105 Cases. *Genes* **2019**, *10*, 661. <https://doi.org/10.3390/genes10090661>.
7. Eibach D, Hogan B, Sarpong N, Winter D, Struck NS, Adu-Sarkodie, Y., et al. Viral metagenomics revealed novel betatorquevirus species in pediatric inpatients with encephalitis/meningoencephalitis from Ghana. *Sci. Rep.* **2019**, *9*. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38975-z>.
8. Chen L, Liu W, Zhang Q, Xu, K., Ye, G., Wu, W., Sun, Z.; Liu, F.; Wu, K.; Zhong, B.; et al. RNA based mNGS approach identifies a novel human coronavirus from two individual pneumonia cases in 2019 Wuhan outbreak. *Emerg. Microbes Infect.* **2020**, *9*, 313–319. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1725399>.
9. Moore NE, Wang J, Hewitt J, Croucher D, Williamson DA, Paine, S., et al. Metagenomic Analysis of Viruses in Feces from Unsolved Outbreaks of Gastroenteritis in Humans. *J. Clin Microbiol.* **2015**, *53*, 15–21. <https://doi.org/10.1128/JCM.02029-14>.
10. Deng L, Silins R, Castro-Mejía JL, Kot W, Jessen L, Thorsen J, et al. A Protocol for Extraction of Infective Viromes Suitable for Metagenomics Sequencing from Low Volume Fecal Samples. *Viruses* **2019**, *11*, 667. <https://doi.org/10.3390/v11070667>.

11. Law J, Jovel J, Patterson J, Ford G, O'keefe S, Wang, W., et al. Identification of Hepatotropic Viruses from Plasma Using Deep Sequencing: A Next Generation Diagnostic Tool. *PLoS ONE* **2013**, 8, e60595. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060595>.
12. Rascovan N, Duraisamy R, Desnues, C. Metagenomics and the Human Virome in Asymptomatic Individuals. *Annual Review of Microbiology* **2016**, 70, 125–141. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095431>.
13. Miller S, Naccache SN, Samayoa E, Messacar K, Arevalo, S., Federman, S., Stryke, D.; Pham, E.; Fung, B.; Bolosky, W.J.; et al. Laboratory validation of a clinical metagenomic sequencing assay for pathogen detection in cerebrospinal fluid. *Genome Res*, **2019**, 29, 831–842. <https://doi.org/10.1101/gr.238170.118>.
14. Wilson MR, Sample HA, Zorn KC, Arevalo S, Yu G, Neuhaus J, et al. Clinical Metagenomic Sequencing for Diagnosis of Meningitis and Encephalitis. *New Engl. J. Med.* **2019**, 380, 2327–2340. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1803396>.
15. Johansson H, Bzhalava D, Ekström J, Hultin E, Dillner J, Forslund, O. Metagenomic sequencing of “HPV-negative” condylomas detects novel putative HPV types. *Virology* **2013**, 440, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.01.023>.
16. Kohl C, Brinkmann A, Dabrowski PW, Radonić, A., Nitsche, A., Kurth, A. Protocol for Metagenomic Virus Detection in Clinical Specimens¹. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, 21. <https://doi.org/10.3201/eid2101.140766>.
17. Lysholm F, Wetterbom A, Lindau C, Darban H, Bjerkner, A., Fahlander, K., Lindberg, A.M.; Persson, B.; Allander, T.; Andersson, B. Characterization of the Viral Microbiome in Patients with Severe Lower Respiratory Tract Infections, Using Metagenomic Sequencing. *PLoS ONE* **2012**, 7, e30875. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030875>.
18. Fischer N, Indenbirken D, Meyer T, Lütgehetmann M, Lellek, H., Spohn, M.; Aepfelbacher, M.; Alawi, M.; Grundhoff, A. Evaluation of Unbiased Next-Generation Sequencing of RNA (RNA-seq) as a Diagnostic Method in Influenza Virus-Positive Respiratory Samples. *J. Clin. Microbiol.* **2015**, 53, 2238–2250. <https://doi.org/10.1128/JCM.02495-14>.
19. Takeuchi S, Kawada J, Horiba K, Okuno Y, Okumura T, Suzuki T, et al. Metagenomic analysis using next-generation sequencing of pathogens in bronchoalveolar lavage fluid from pediatric patients with respiratory failure. *Sci. Rep.* **2019**, 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49372-x>.
20. Li Y, Fu X, Ma J, Zhang J, Hu, Y., Dong, W.; Wan, Z; Li, Q.; Kuang, Y.-Q.; Lan, K.; et al. Altered respiratory virome and serum cytokine profile associated with recurrent respiratory tract infections in children. *Nat. Commun.* **2019**, 10, 2288. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10294-x>.
21. van den Munckhof EHA, de Koning MNC, Quint WGV, van Doorn L-J, Leverstein-van Hall MA. Evaluation of a stepwise approach using microbiota analysis, species-specific qPCRs and culture for the diagnosis of lower respiratory tract infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**, 38, 747–754. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03511-4>.
22. Simner PJ, Miller, S., Carroll KC. Understanding the Promises and Hurdles of Metagenomic Next-Generation Sequencing as a Diagnostic Tool for Infectious Diseases. *Clin. Infect. Dis.* **2018**, 66, 778–788. <https://doi.org/10.1093/cid/cix881>.
23. Lewandowska DW, Zagordi O, Geissberger F-D, Kufner V, Schmutz S, Böni J, et al. Optimization and validation of sample preparation for metagenomic sequencing of viruses in clinical samples. *Microbiome* **2017**, 5. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0317-z>.
24. Knepp JH, Geahr MA, Forman MS, Valsamakis, A. Comparison of Automated and Manual Nucleic Acid Extraction Methods for Detection of Enterovirus RNA. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, 41, 3532–3536. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.8.3532-3536.2003>.
25. Miller S, Seet H, Khan Y, Wright, C., Nadarajah, R. Comparison of QIAGEN Automated Nucleic Acid Extraction Methods for CMV Quantitative PCR Testing. *Am. J. Clin. Pathol.* **2010**, 133, 558–563. <https://doi.org/10.1309/AJCPE5VZL1ONZHFJ>.
26. Verheyen J, Kaiser R, Bozic M, Timmen-Wego M, Maier BK, Kessler HH. Extraction of viral nucleic acids: Comparison of five automated nucleic acid extraction platforms. *J. Clin. Virol.* **2012**, 54, 255–259. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.03.008>.
27. Lewandowski K, Bell A, Miles R, Carne S, Wooldridge D, Manso, C., et al. The Effect of Nucleic Acid Extraction Platforms and Sample Storage on the Integrity of Viral RNA for Use in Whole Genome Sequencing. *J. Mol. Diagn.* **2017**, 19, 303–312. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.10.005>.

28. Klenner J, Kohl C, Dabrowski PW, Nitsche, A. Comparing Viral Metagenomic Extraction Methods. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2017**, 59–70. <https://doi.org/10.21775/cimb.024.059>.
29. Zhang D, Lou X, Yan H, Pan J, Mao, H.; Tang, H.; Shu, Y.; Zhao, Y.; Liu, L.; Li, J.; et al. Metagenomic analysis of viral nucleic acid extraction methods in respiratory clinical samples. *BMC Genomics* **2018**, 19. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5152-5>.
30. Yang J, Yang F, Ren L, Xiong Z, Wu Z, Dong J, et al. Unbiased Parallel Detection of Viral Pathogens in Clinical Samples by Use of a Metagenomic Approach. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, 49, 3463–3469. <https://doi.org/10.1128/JCM.00273-11>.
31. Angebault C, Payen M, Woerther P-L, Rodriguez C, Botterel, F. Combined bacterial and fungal targeted amplicon sequencing of respiratory samples: Does the DNA extraction method matter? *PLoS ONE* **2020**, 15, e0232215. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232215>.
32. Sui H, Weil AA, Nuwagira E, Qadri F, Ryan ET, Mezzari MP, et al. Impact of DNA Extraction Method on Variation in Human and Built Environment Microbial Community and Functional Profiles Assessed by Shotgun Metagenomics Sequencing. *Front. Microbiol.* **2020**, 11, 953. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00953>.
33. Thoendel M, Jeraldo P, Greenwood-Quaintance KE, Yao J, Chia N, Hanssen AD, et al. Impact of Contaminating DNA in Whole-Genome Amplification Kits Used for Metagenomic Shotgun Sequencing for Infection Diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* **2017**, 55, 1789–1801. <https://doi.org/10.1128/JCM.02402-16>.
34. Drengenes C, Wiker HG, Kalanathan T, Nordeide E, Eagan TML, Nielsen, R. Laboratory contamination in airway microbiome studies. *BMC Microbiol.* **2019**, 19. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1560-1>.
35. Naccache SN, Greninger AL, Lee D, Coffey LL, Phan T, Rein-Weston, A., et al. The Perils of Pathogen Discovery: Origin of a Novel Parvovirus-Like Hybrid Genome Traced to Nucleic Acid Extraction Spin Columns. *J. Virol.* **2013**, 87, 11966–11977. <https://doi.org/10.1128/JVI.02323-13>.
36. Kjartansdóttir KR, Friis-Nielsen J, Asplund M, Møllerup S, Mourier T, Jensen RH, et al. Traces of ATCV-1 associated with laboratory component contamination. *Proc. Natl. Acad. Sciences* **2015**, 112, E925–E926. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423756112>.
37. Stinson LF, Keelan JA, Payne MS. Identification and removal of contaminating microbial DNA from PCR reagents: Impact on low-biomass microbiome analyses. *Letters in Applied Microbiology* **2019**, 68, 2–8. <https://doi.org/10.1111/lam.13091>.
38. Miller RR, Uyaguari-Diaz M, McCabe MN, Montoya V, Gardy JL, Parker S, et al. Metagenomic Investigation of Plasma in Individuals with ME/CFS Highlights the Importance of Technical Controls to Elucidate Contamination and Batch Effects. *PLoS ONE* **2016**, 11, e0165691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165691>.
39. Gargis AS, Kalman, L., Lubin IM. Assuring the Quality of Next-Generation Sequencing in Clinical Microbiology and Public Health Laboratories. *J. Clin. Microbiol.* **2016**, 54, 2857–2865. <https://doi.org/10.1128/JCM.00949-16>.
40. Schlager R, Queen K, Simmon K, Tardif K, Stockmann C, Flygare, S., et al. Viral Pathogen Detection by Metagenomics and Pan-Viral Group Polymerase Chain Reaction in Children With Pneumonia Lacking Identifiable Etiology. *J. Infect. Dis.* **2017**, 215, 1407–1415. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix148>.
41. Li L, Deng X, Mee ET, Collot-Teixeira S, Anderson R, Schepelmann, S., et al. Comparing viral metagenomics methods using a highly multiplexed human viral pathogens reagent. *J. Virol. Methods* **2015**, 213, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.12.002>.
42. Asplund M, Kjartansdóttir KR, Møllerup S, Vinner L, Fridholm, H., Herrera JAR, et al. Contaminating viral sequences in high-throughput sequencing viromics: A linkage study of 700 sequencing libraries. *Clin. Microbiol. Infect.* **2019**, 25, 1277–1285. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.04.028>.
43. Bal A, Pichon M, Picard C, Casalegno JS, Valette M, Schuffenecker I, et al. Quality control implementation for universal characterization of DNA and RNA viruses in clinical respiratory samples using single metagenomic next-generation sequencing workflow. *BMC Infect. Dis.* **2018**, 18, 537. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3446-5>.
44. Bolger AM, Lohse, M., Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **2014**, 30, 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
45. Garcia M, Chessa C, Bourgoin A, Giraudeau G, Plouzeau, C., Agius, G; Lévêque, N.; Beby-Defaux, A. Comparison of eMAG™ versus NucliSENS® EasyMAG® performance on clinical specimens. *J. Clin. Virol.* **2017**, 88, 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.01.004>.

46. Plyusnin I, Kant R, Jääskeläinen AJ, Sironen T, Holm L, Vapalahti O, et al. Novel NGS Pipeline for Virus Discovery from a Wide Spectrum of Hosts and Sample Types. *Bioinformatics*; **2020**. <https://doi.org/10.1101/2020.05.07.082107>.
47. Rose JA, Hoggan MD, Shatkin AJ. Nucleic acid from an adeno-associated virus: Chemical and physical studies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1966**, *56*, 86–92. <https://doi.org/10.1073/pnas.56.1.86>.
48. Conceição-Neto N, Zeller M, Lefrère H, De Bruyn P, Beller L, Deboutte, W., et al. Modular approach to customise sample preparation procedures for viral metagenomics: A reproducible protocol for virome analysis. *Sci. Rep.* **2015**, *5*. <https://doi.org/10.1038/srep16532>.
49. Holmes EC. Reagent contamination in viromics: All that glitters is not gold. *Clin. Microbiol. Infect.* **2019**, *25*, 1167–1168. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.06.019>.
50. Gagnieur L, Cheval J, Gratigny M, Hébert C, Muth E, Dumarest, M., et al. Unbiased analysis by high throughput sequencing of the viral diversity in fetal bovine serum and trypsin used in cell culture. *Biologicals* **2014**, *42*, 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2014.02.002>.
51. Sadeghi M, Kapusinszky B, Yugo DM, Phan TG, Deng, X.; Kanevsky, I.; Opriessnig, T.; Woolums, A.R.; Hurley, D.J.; Meng, X.-J.; et al. Virome of US bovine calf serum. *Biologicals* **2017**, *46*, 64–67. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.12.009>.
52. Davis NM, Proctor DM, Holmes SP, Relman DA, Callahan BJ. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome* **2018**, *6*, 226. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0605-2>.



© 2020 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/>).

2. Caractérisation du virome des patients de la cohorte ViBraFlu

2.1 Objectif

L'objectif de cette partie a été dans un premier temps de déterminer la composition globale du virome dans les prélèvements VRS+ de la cohorte ViBraFlu puis de caractériser les changements dans la composition du virome respiratoire potentiellement associés à la sévérité ou à certains critères cliniques (prématurité, type d'alimentation...). Enfin les séquences de génomes complets et de la protéine G du VRS ont été étudiées afin de déterminer si l'un des génotypes VRS pouvait être associé à la sévérité.

2.2 Matériels et Méthodes

2.2.1 Populations étudiées au sein de la cohorte Vibraflu

Pour cet axe d'étude, seuls les enfants de moins de 7 mois et testés positifs au VRS ont été inclus afin d'obtenir une population plus homogène (n= 53).

2.2.2 Séquençage du virome

Nous avons utilisé un protocole métagénomique NGS optimisé dans notre laboratoire²⁸⁹.

Après décongélation, tous les échantillons ont été supplémentés avec le bactériophage MS2 (genre *Levivirus*) d'un kit commercial (MS2, contrôle interne ARN IC1; r-gene, bioMérieux) pour vérifier la validité du processus. Seul un contrôle interne ARN MS2 a été ajouté car il valide toutes les étapes de notre protocole (y compris l'étape de RT pendant l'amplification) contrairement à un contrôle interne ADN. Afin d'éviter au maximum les contaminations inter-échantillons, les manipulations ont été subdivisées en 4 runs de séquençage eux même divisés en 3 ou 4 batches d'extraction. Les échantillons ont été répartis dans ces différents batches de manière aléatoire. Pour évaluer la contamination au cours du processus, un contrôle négatif (eau Rnase free) a été ajouté dans chaque batch.

Pour l'enrichissement viral de des échantillons, une méthode en 3 étapes a été appliquée sur 220 µl d'échantillon : centrifugation à faible vitesse (6000 g, 10 min, 4 °C), suivie d'une filtration du surnageant (filtre 0,80 µm ; Sartorius, Göttingen, Allemagne) pour éliminer les cellules eucaryotes et bactériennes, sans perte de gros virus, puis traitement à la turbo DNase (0,1 U/µL, 37 °C, 90 min ; Life Technologies, Carlsbad, CA, États-Unis).

Après enrichissement viral, les échantillons ont été extraits à l'aide de la plateforme NucliSENS EasyMAG (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Le protocole spécifique B 2.0.1 a été sélectionné. A la fin de l'extraction, une précipitation à l'éthanol (2 h à - 80 °C) a été réalisée. Une version adaptée du protocole d'amplification Whole Transcriptome Amplification Kit 2 (WTA2, Sigma Aldrich, Darmstadt, Allemagne) a été réalisée, pour amplifier à la fois l'ADN et l'ARN.

Après purification sur colonne QiaQuick (Qiagen, Hilden, Allemagne) et quantification à l'aide du fluoromètre Qubit HS dsDNA Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), les librairies ont été préparées avec le kit Nextera XT DNA Library (Illumina, San Diego, CA, États-Unis) conformément aux instructions du fabricant.

Après normalisation, un pool de librairies a été constitué et quantifié à l'aide du kit universel de quantification de librairies KAPA (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA) puis 1 % de génome PhiX a été ajouté au pool quantifié. Le pool a finalement été séquencé sur la plateforme NextSeq™ sur une flowcell 2x150pb (Illumina, San Diego, CA, États-Unis).

A noter que notre protocole a été conçu pour prévenir autant que possible les contaminations : les réactifs ont été stockés et préparés dans une pièce exempte d'ADN ; les échantillons des patients ont été ouverts sous une hotte à flux laminaire dans une pièce pré-PCR ; après l'étape d'amplification, les tubes ont été manipulés et stockés dans une pièce post-PCR.

2.2.3 Analyses Bio-informatiques

Les fichiers fastq bruts ont été trimmés avec cutadapt (version 1). Les reads humaines ont été supprimées en utilisant bwa mem (version 0.7.8) pour l'alignement sur le génome humain (GRCh37.p2). Les reads non mappées extraites avec l'outil samtools (version 1.3.1) ont été mappées à la base de données des séquences NCBI de protéines non redondantes NR téléchargée en 2020 en utilisant Diamond (version 0.9.22) et le paramètre LCA (Last Common Ancestor).

Pour obtenir les séquences VRS génomes complets, les reads ont été trimmées avec cutadapt (version 3.3). Les reads ont ensuite été alignées sur les séquences « human orthopneumovirus » de la base Reference Viral DataBase (RVBD) pour filtrer les reads d'intérêts. A partir des reads mappées précédemment, un assemblage de novo a été réalisé via SPAdes (version 3.15.3) afin d'obtenir les plus longs et fiables contigs possibles. Le plus long contig obtenu a été récupéré, servant de référence pour l'alignement des reads avec

minimap2 (version 2.22). Les duplicats de reads ont été retirés avec picard (version 2.25.7). Afin d'améliorer le mapping des insertions/délétions (indels), un réaligement des reads soft clippées a été réalisé avec abra2 (version 2.23). L'appel de variant a été effectué avec freebayes (version 1.3.5) et le filtrage des variants avec bcftools (version 1.12). Les fichiers de couverture ont été générés avec bedtools (version 2.30.0) et les séquences consensus avec bedtools (version 2.30.0) et bcftools (version 1.12).

Pour obtenir les arbres phylogéniques, les séquences consensus obtenues ont d'abord été alignées avec mafft (version 7), puis les arbres générés à partir de ces alignements avec MEGA11 (version 11.0.13) selon la méthode des distances Neighbor Joining (NJ) en appliquant la correction de distance Kimura 2- parameter et avec un bootstrap à 1000. L'analyse avec bootstrap permet de faire un échantillonnage des positions de l'alignement pour relancer la construction phylogénétique en comparant les résultats obtenus après 1000 répétitions. La valeur de bootstrap représente le nombre de fois où cette branche a été retrouvée au fil des répétitions.

Les séquences utilisées comme référence pour identifier les génotypes présents chez les patients de la cohorte ont été répertorié dans le **tableur 11**.

Tableau 11 Numéro d'accèsion des séquences de références utilisées pour les VRS-A et les VRS-B

Type de séquence	VRS-A/VRS-B	Génotype	n° d'accèsion
Génome Complet	VRS-A	ON1	KT285064.1
Génome Complet	VRS-B	B1	AF013254.1
Protéine G	VRS-A	GA1	M11486.1
Protéine G	VRS-A	GA2	Z33422.1
Protéine G	VRS-A	GA3	Z33416.1
Protéine G	VRS-A	GA4	AF065254.1
Protéine G	VRS-A	GA5	Z33494.1
Protéine G	VRS-A	GA6	AF233901.1
Protéine G	VRS-A	GA7	Z33455.1
Protéine G	VRS-A	NA1	AB470478.1
Protéine G	VRS-A	ON1	KF300973.1
Protéine G	VRS-A	SAA1	AF348807.1
Protéine G	VRS-B	BA1	DQ227373.1
Protéine G	VRS-B	BA2	DQ227389.1
Protéine G	VRS-B	BA3	DQ227370.1
Protéine G	VRS-B	BA4	DQ227396.1
Protéine G	VRS-B	BA6	AY751117.1
Protéine G	VRS-B	BA7	AY751093.1
Protéine G	VRS-B	BA8	JX489454.1

Type de séquence	VRS-A/VRS-B	Génotype	n° d'accension
Protéine G	VRS-B	BA9	JX645887.1
Protéine G	VRS-B	BA10	KR816639.1
Protéine G	VRS-B	BA11	KC297473.1
Protéine G	VRS-B	BA12	KR816654.1
Protéine G	VRS-B	BA13	KF437511.1
Protéine G	VRS-B	BA14	KF300960.2
Protéine G	VRS-B	BA-CCA	KX775822.1
Protéine G	VRS-B	BA-CCB	LC385008.1

2.2.4 Génération des matrices pour l'analyse statistique

Pour corriger les différences de profondeur de séquençage des échantillons, les comptes de reads ont été normalisés en utilisant le ratio de reads par millions de reads (RPM), puis transformé en $\log_{10}(\text{RPM})$.

Lors du processus de séquençage, il est possible d'observer des contaminations inter-échantillon, mais aussi des contaminations par des séquences microbiennes présentes dans l'environnement du laboratoire ou par du matériel génétique présent dans les réactifs d'extraction et de préparation des librairies. Ceci peut biaiser les analyses puisque bien que d'un point de vue bio-informatique, lors de l'assignation des reads, ces contaminants sont bien présents dans l'échantillon séquencé et cela induit des « faux positifs ». L'utilisation de contrôles négatifs (NTC) est donc essentielle pour pouvoir identifier et contrôler les différentes sources de contamination. Il n'existe actuellement aucune approche standard pour corriger les contaminations à l'aide de ces contrôles⁴³⁴. Afin d'éliminer les contaminations au sein d'un même batch, les reads retrouvées dans le NTC (normalisées en RPM) sont soustraites des reads des échantillons du batch correspondant afin de négativer les NTC et d'éliminer les potentiels contaminants. A partir de cette matrice en $\log_{10}(\text{RPM})$ sans contaminant, deux autres matrices ont été générées pour les analyses :

- une matrice binaire relevant seulement la présence (1) ou l'absence (0) d'une famille virale au sein d'un échantillon,
- une matrice ALR (Additive Log Ratio) dans laquelle les abondances observées sont transformées en rapport logarithmique de l'abondance de chaque taxon par rapport à un taxon de référence. Pour cette matrice, le contrôle interne MS2 de la famille *Leviviridae* a été utilisé comme taxon de référence, ce qui signifie que dans cette matrice, les échantillons pour lesquels le contrôle interne n'avait pas été détecté, ont été exclus.

2.2.5 Analyses statistiques

L'analyse des variables cliniques en fonction de la sévérité (URTI/LRTI) a été réalisée à l'aide de régressions logistiques univariées. Les p-values associées ont été obtenues par un test du rapport de vraisemblance (comparaison avec le modèle sans covariable).

Les analyses du virome ont été effectuées au niveau de la taxonomie de la famille. Pour chaque famille, la proportion de présence parmi les enfants a d'abord été décrite et représentée à l'aide de barplot. Ensuite un clustering non supervisé a été réalisé à partir de l'ensemble des familles puis représenté sous forme de heatmap. Un premier clustering a été réalisé à partir de la matrice binaire (présence/absence) en calculant une distance jacobienne puis un deuxième à partir de la matrice ALR en calculant une distance euclidienne^{435,436}.

Pour quelques familles pour lesquelles cela semblait pertinent, des régressions logistiques en fonction de la sévérité (LRTI/URTI) ont été faites. Une première régression intégrait uniquement la variable présence/absence de la famille et une deuxième régression ajoutait une variable indiquant la quantité si présence de la famille.

Finalement, les co-infections par un virus respiratoire humain, par un virus non respiratoire humain, ou par des phages, ont été étudiées à l'aide de régressions logistiques univariées en regardant soit la présence d'une co-infection soit le nombre de co-infections.

Les analyses ont été faites avec le logiciel R version 3.6.1.

2.3 Résultats

2.3.1 Caractéristiques cliniques et démographiques de la cohorte

Parmi les 53 patients inclus, 88,7% (n=47) ont été classés comme souffrant d'une infection des voies respiratoires basses LRTI (Lower Respiratory Tract Infection) et 11,3% (n=6) ont été classés comme souffrant d'une infection des voies respiratoires hautes URTI (Upper Respiratory Tract Infection). Les patients du groupe URTI avaient des symptômes cliniques légers alors que les patients du groupe LRTI présentaient un tableau clinique plus sévère.

Les caractéristiques cliniques et démographiques de cette population sont résumées dans le **tableau 12**.

Les variables étudiées dans cette partie sont celles reconnues comme pouvant influencer la composition du microbiome respiratoire mais aussi la sévérité de l'infection, à savoir le genre, l'âge, la prématurité, la présence de fratrie et de tabagisme passif au sein du foyer et le mode d'allaitement. De plus, des variables reconnues comme pouvant être associées à la sévérité

ont également été étudiées comme la supplémentation en oxygène, la durée d'hospitalisation et la charge virale (Ct VRS).

Tableau 12 Caractéristiques cliniques et démographiques des 53 patients inclus pour l'étude du virome respiratoire.

	VRS+ URTI (n=6)	VRS+ LRTI (n=47)	P- value
Sexe : masculin	2 (33,3%)	22 (46,8%)	0,5277
Âge médian, mois (min-max)	1,9 (0,6-2,8)	1,9 (0,4-6,1)	0,3373
Prématurité	-	6 (12,8%)	0,2152
Mode de vie (Domicile-Crèche)	Domicile : 6 (100%)	Domicile : 43 (91,5%)	1
Tabagisme passif	4 (66,7%)	22 (46,8%)	0,4387
Présence de Fratrie	5 (83,3%)	39 (83%)	0,9826
Type d'alimentation	Allaitement maternel : 1 (16,7%) Allaitement artificiel : 3 (50%) Mixte : 2 (33,3%)	Allaitement maternel : 19 (40,4%) Allaitement artificiel : 19 (40,4%) Mixte : 8 (17%)	0,4234
Supplémentation en Oxygène	-	34 (72,3%)	0,0012
Durée d'hospitalisation médian (min-max)	1 (1-11)	4,5 (1-11)	0,7698
Ct VRS médian (min-max)	18,7 (16,6-24)	20,2 (15,3-27,8)	0,4207

Abréviations : VRS : Virus Respiratoire Syncytial ; URTI : Upper Respiratory Tract Infection ; LRTI : Lower Respiratory Tract Infection ; min : valeur minimum ; max : valeur maximum ; Ct : cycle threshold.

Aucune des covariables reconnues comme pouvant influencer la composition du microbiome respiratoire n'était statistiquement associée à une probabilité plus élevée ou plus faible d'être LRTI ou URTI dans cette cohorte. A noter, l'absence de patients URTI dans le groupe de nourrissons prématurés : tous les patients nés prématurément de notre cohorte ont développé des formes sévères.

Concernant les variables pouvant être associées à la sévérité, la supplémentation en oxygène est la seule variable associée au groupe LRTI dans notre cohorte.

2.3.2 Analyse descriptive des données de virome

Dans un premier temps, les familles virales présentes dans au moins un échantillon ont été identifiées. 43 familles virales en plus de notre contrôle interne (*Leviviridae*) ont été trouvées et répertoriées dans le **tableur 13**.

Tableau 13 Liste des familles virales retrouvées dans l'étude du virome chez les patients de la cohorte Vibraflu.

Virus respiratoires Humains	Virus non respiratoires Humains	Virus Non pathogènes Humains	Phages	Virus non humain (Plantes, champignons, insectes, autres mammifères)
<i>Adenoviridae</i>	<i>Flaviviridae</i>	<i>Anelloviridae</i>	<i>Ackermannviridae</i>	<i>Amalgaviridae</i>
<i>Coronaviridae</i>	<i>Herpesviridae</i>	<i>Genomoviridae</i>	<i>Cystoviridae</i>	<i>Asfarviridae</i>
<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Papillomaviridae</i>	<i>Marseilleviridae</i>	<i>Herelleviridae</i>	<i>Betaflexiviridae</i>
<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Phenuiviridae</i>		<i>Inoviridae</i>	<i>Bromoviridae</i>
<i>Picornaviridae</i>	<i>Picobirnaviridae</i>		<i>Microviridae</i>	<i>Chrysoviridae</i>
<i>Pneumoviridae</i>	<i>Polyomaviridae</i>		<i>Myoviridae</i>	<i>Circoviridae</i>
<i>Parvoviridae</i>	<i>Poxviridae</i>		<i>Podoviridae</i>	<i>Endornaviridae</i>
	<i>Retroviridae</i>		<i>Siphoviridae</i>	<i>Hypoviridae</i>
			<i>Leviviridae</i>	<i>Iridoviridae</i>
				<i>Mimiviridae</i>
				<i>Narnaviridae</i>
				<i>Nudiviridae</i>
				<i>Partitiviridae</i>
				<i>Phycodnaviridae</i>
				<i>Pithoviridae</i>
				<i>Pseudoviridae</i>
				<i>Totiviridae</i>

Le VRS (famille *Pneumoviridae*) était retrouvé dans tous les échantillons. Le contrôle interne (famille *Leviviridae*) était détecté dans 67,9% (n=36) des échantillons (**Figure 11**).

Les familles les plus représentées (présentes dans plus de 20 échantillons) étaient les *Phenuiviridae* (86,8%, n=46), les *Anelloviridae* (66%, n=35), les *Picornaviridae* (45,3%, n= 24) et les *Retroviridae* (39,6%, n=21) (**Figure 11**).

De nombreuses coinfections avec des virus respiratoires ont été observées, notamment avec les familles des *Picornaviridae*, des *Adenoviridae*, des *Coronaviridae*, des *Orthomyxoviridae*, des *Paramyxoviridae*, et des *Parvoviridae*. D'autres virus pathogènes pour l'homme mais à tropisme non respiratoire ont également été détectés (*Flaviviridae*, *Herpesviridae*, *Papillomaviridae*, *Picobirnaviridae*, et *Poxviridae*). Enfin, plusieurs familles de phages ont été identifiées dans plusieurs échantillons (*Ackermannviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae* et *Siphoviridae*) (**Figure 11**). A noter que les analyses sur les familles de phages ont été réalisées en 2021 donc en utilisant l'ancienne classification.

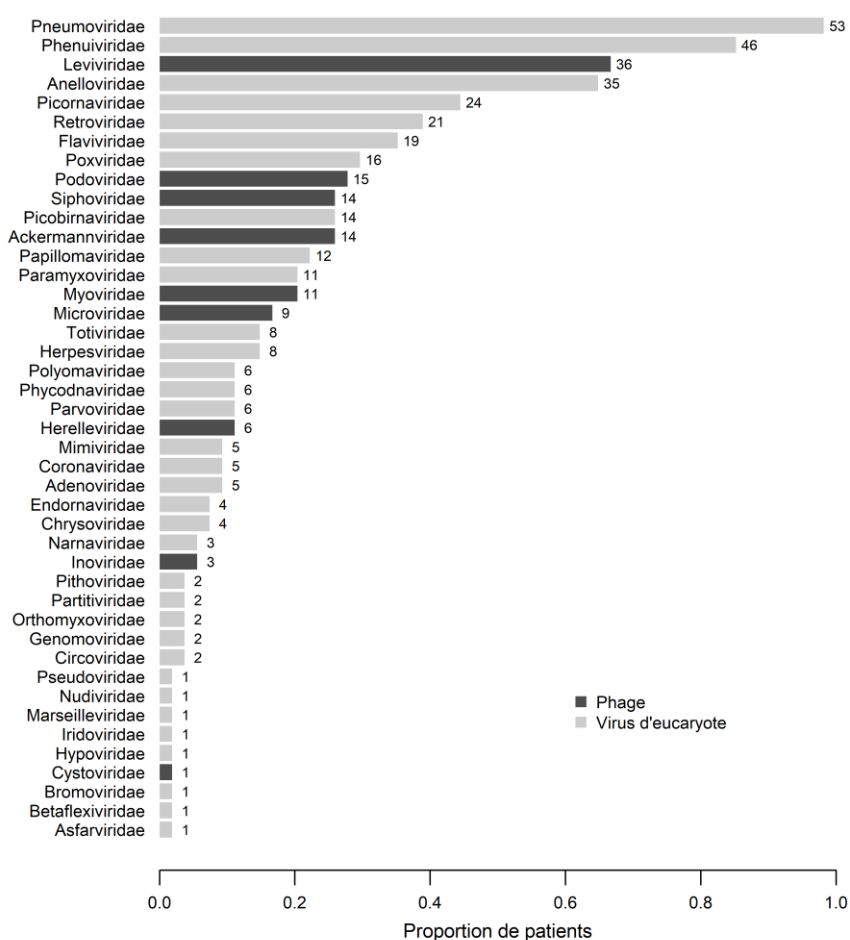


Figure 11 Proportion de chaque famille virale parmi les 53 patients inclus.

Incluant *Pneumoviridae* (virus infectant) et *Leviviridae* (contrôle interne). Les phages sont colorés en gris foncés et les virus d'eucaryote en gris clair. Le nombre de patient positif pour chaque famille est également indiqué.

Aucune différence significative de composition entre les échantillons des 2 groupes n'a été notée bien que certaines familles semblent plus présentes dans le groupe LRTI (*Anelloviridae*, *Coronaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Papillomaviridae*, *Paramyxoviridae* par exemple) ou dans le groupe URTI (*Herpesviridae*, *Adenoviridae* et *Picornaviridae* par exemple) (Figure 12).

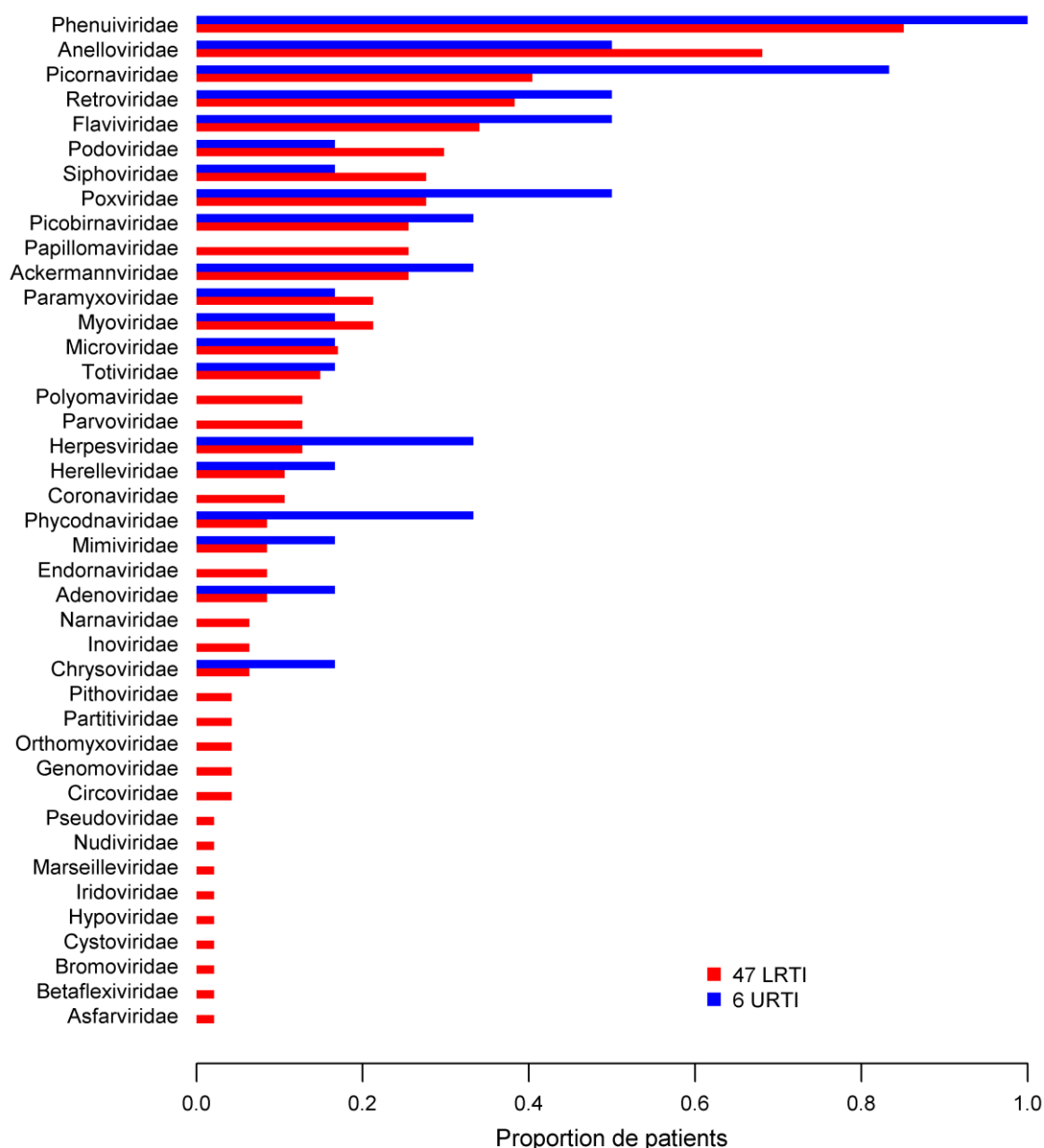


Figure 12 Histogramme représentant la proportion de présence de chaque famille virale parmi les 53 patients inclus en fonction des groupes URTI (bleu) ou LRTI (rouge).

Hors Pneumoviridae (virus infectant) et Leviviridae (contrôle interne).

Abréviations: URTI: Upper respiratory tract infection; LRTI: Lower respiratory tract infection.

Parmi les échantillons positifs pour chaque famille, aucune différence significative d'abondance de famille entre les 2 groupes n'a été notée (**Figure 13**).

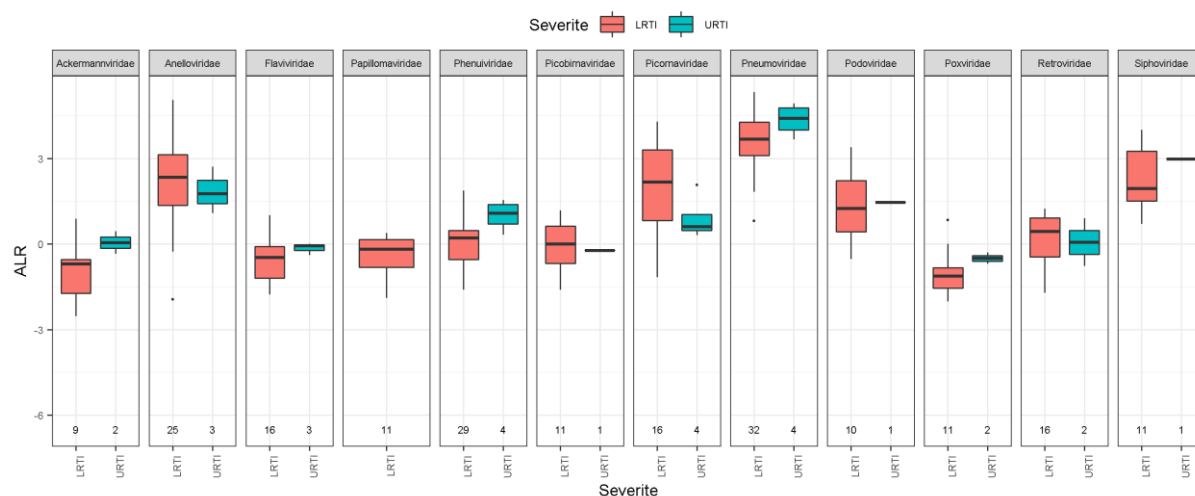


Figure 13 Boxplots représentant l'abondance de chaque famille virale en fonction des groupes URTI (bleu) ou LRTI (rouge) réalisés à partir de la matrice ALR.

Hors Leviviridae (contrôle interne) et familles retrouvées dans moins de 10 échantillons. Pour chaque famille virale, seuls les échantillons positifs sont considérés.

Abréviations: URTI: Upper respiratory tract infection; LRTI: Lower respiratory tract infection; ALR: additive log ratio.

Sur les 2 heatmaps générés à partir de la matrice binaire (**Figure 14**) et à partir de la matrice ALR (**Figure 15**), aucun regroupement en fonction des variables n'a été noté. Ce qui veut dire qu'au niveau de la famille, l'ensemble des données du virome ne permettent pas de différencier les groupes URTI ou LRTI, ou le genre, ou le fait d'être né prématurément, ou le type d'allaitement.

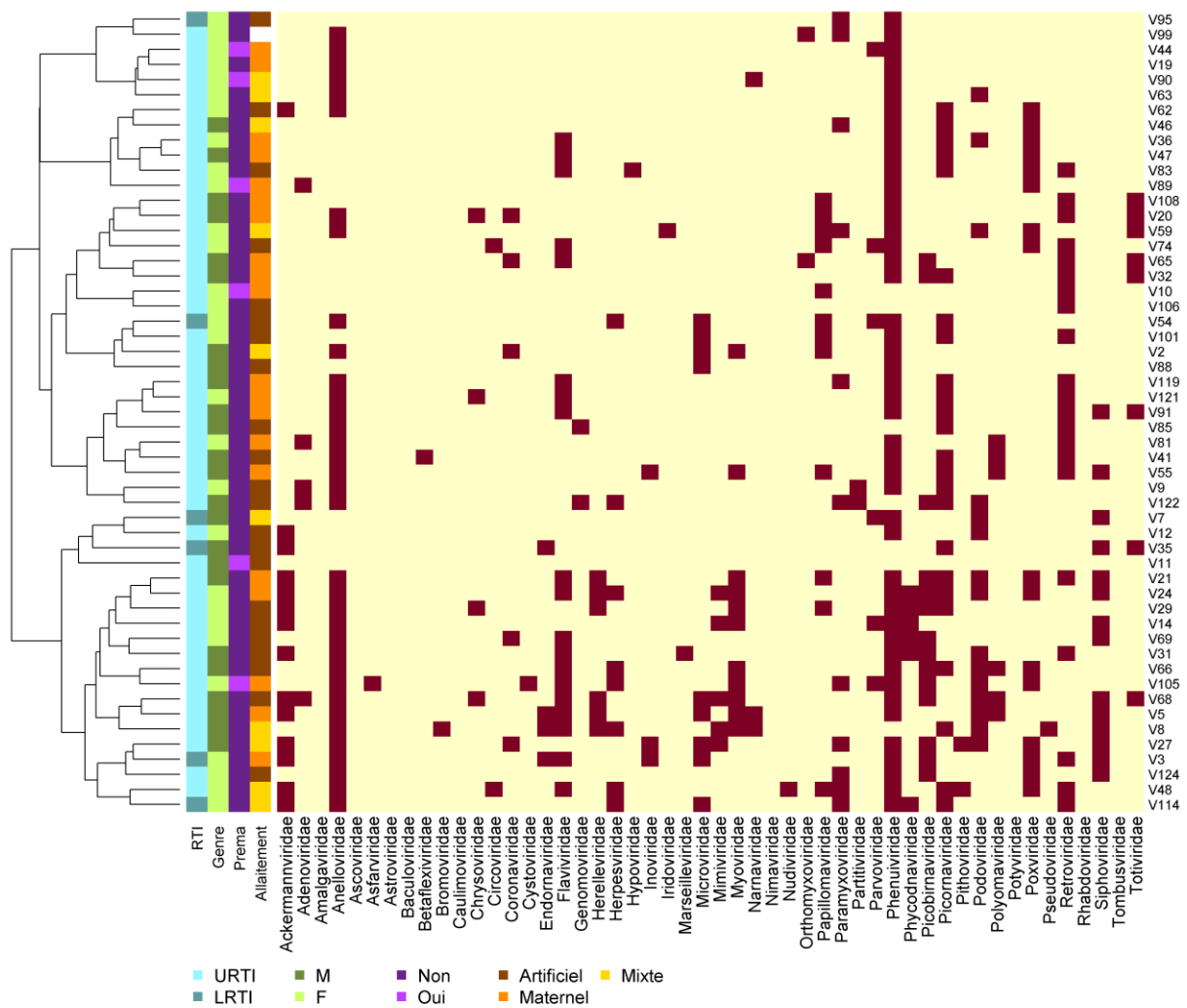


Figure 14 Heatmaps générés à partir de la matrice binaire (Présence/Absence) des familles virales.

Hors Pneumoviridae (virus infectant) et Leviviridae (contrôle interne). L’heatmap générés à partir de la matrice binaire représente la présence/absence de chaque famille virale détectée dans chaque échantillon. Cette présence/absence est représentée par une couleur foncée pour la présence et couleur claire pour l’absence. Les variables étudiées étaient le groupe URTI/LRTI, le genre, la prématurité et le type d’allaitement.

Abréviations : URTI : Upper respiratory tract infection ; LRTI : Lower respiratory tract infection ; M : Masculin ; F : Féminin.

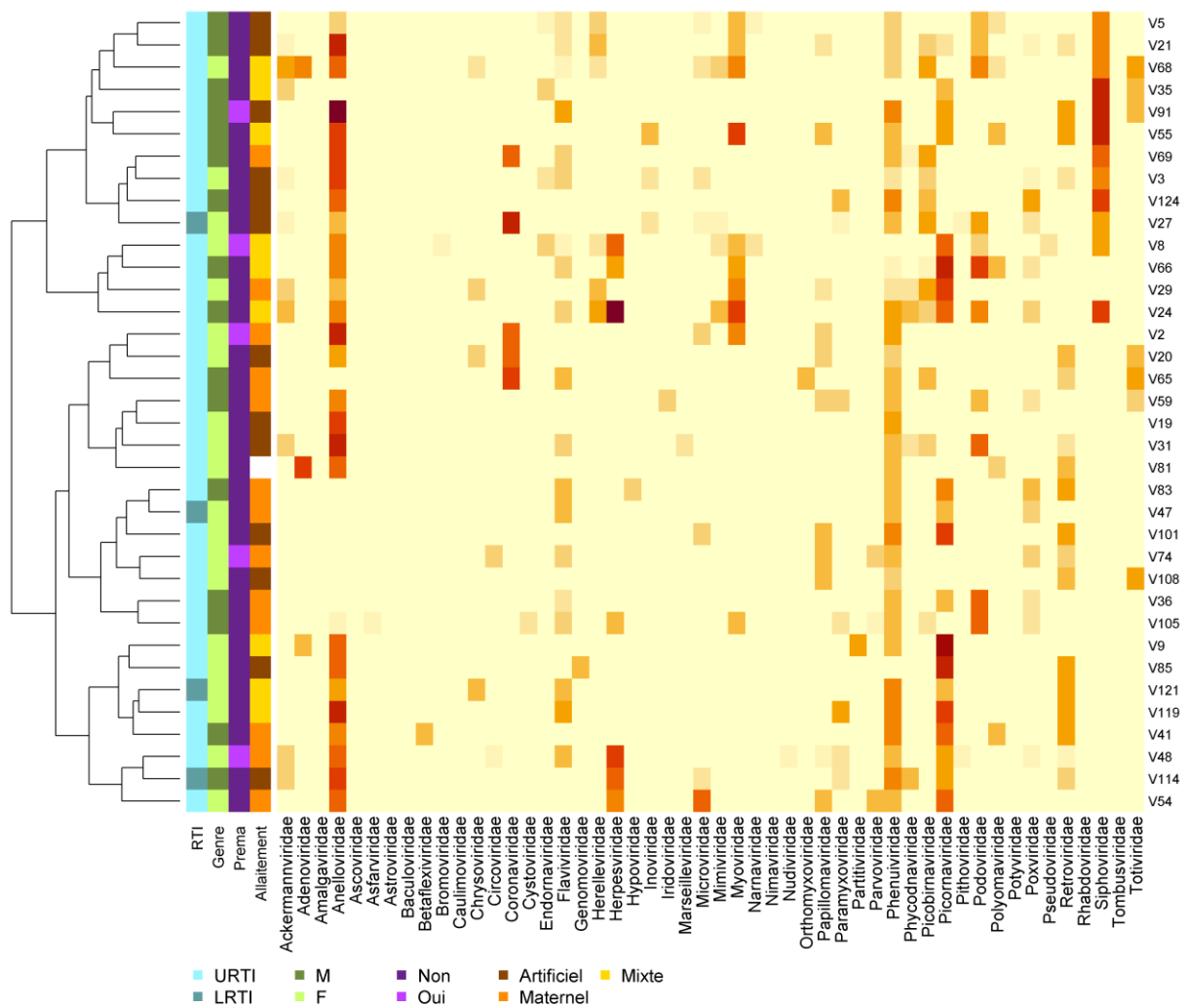


Figure 15 Heatmaps générés à partir de la matrice d'abondance des familles virales (exprimée en ALR).

Hors Pneumoviridae (virus infectant) et Leviviridae (contrôle interne). L'heatmap générés à partir de la matrice ALR affiche l'abondance relative de chaque famille virale détectée dans chaque échantillon. L'abondance relative est représentée par une échelle de gradient (clair à foncé). Les variables étudiées étaient le groupe URTI/LRTI, le genre, la prématurité et le type d'allaitement.

Abréviations : URTI : Upper respiratory tract infection ; LRTI : Lower respiratory tract infection ; M : Masculin ; F : Féminin.

2.3.3 Analyse détaillée pour quelques familles du virome

2.3.3.1 Famille *Anelloviridae*

Au niveau de la famille

Sur la matrice binaire (présence/absence d'*Anelloviridae* dans les échantillons), 66,04% (n=35) des échantillons contenaient des *Anelloviridae*. Parmi eux, 8,6% (n=3) étaient classés dans le groupe URTI et 91,4% (n=32) étaient classés dans le groupe LRTI. La répartition présence/absence *Anelloviridae* était à 50/50 (n=3/6) pour le groupe URTI, et à 70/30 (n=32/47) pour le groupe LRTI. La famille *Anelloviridae* n'est statistiquement pas associée à la sévérité (p-value = 0,3896), bien que l'OR associé (OR=2,133) soit relativement élevé, le manque de puissance ne permet pas de conclure.

Sur la matrice ALR (proportion d'*Anelloviridae* en fonction du contrôle interne *Leviviridae*) :

- dans le groupe URTI, la moyenne des ALR était de 1,85.
- dans le groupe LRTI, la moyenne était de 2,2.

Avec une p-value à 0,9164, la famille *Anelloviridae* n'était pas statistiquement associée à la sévérité.

Au niveau du genre :

Au niveau du genre, les *Torque Teno Virus* (TTV), les *Torque Teno Mini Virus* (TTMV) et les *Torque Teno Midi Virus* (TTMDV) étaient retrouvés respectivement dans 47,2%, 69,8% et 64,2% des échantillons. Dans le groupe URTI, les TTV, TTMV et TTMDV étaient retrouvés respectivement dans 50%, 83,3%, et 83,3% des échantillons. Dans le groupe LRTI, les TTV, TTMV et TTMDV étaient retrouvés respectivement dans 46,8%, 68,1%, et 61,7% des échantillons. Aucun de ces 3 genres n'étaient associés à la sévérité (TTV, p-value = 1 ; TTMV, p-value = 0,6548 et TTMDV, p-value = 0,402).

Sur la matrice ALR, dans le groupe URTI la moyenne des ALR pour les TTV, TTMV et TTMDV étaient respectivement de 1,08, 1,04 et 1,97. Dans le groupe LRTI, la moyenne des ALR pour les TTV, TTMV et TTMDV étaient respectivement de 0,85, 1,42 et 0,94 (**Figure 16**).

Avec une p-value à 0,6082, le genre TTMV n'était pas significativement associée à la sévérité. En raison d'un nombre trop faible d'échantillons dans le groupe URTI, les statistiques visant à mettre en évidence une association entre la quantité de TTV et de TTMV avec la sévérité n'ont pu être réalisées.

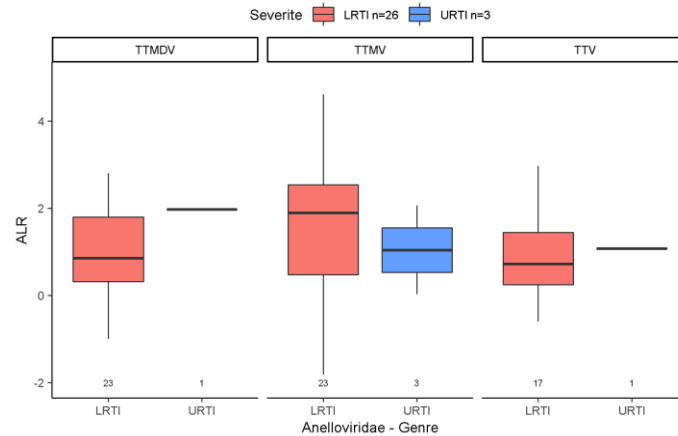


Figure 16 Boxplot représentant la distribution des ALR des différents genres d'Anelloviridae en fonction des groupes URTI (bleu) ou LRTI (rouge) réalisés à partir de la matrice ALR.

Abréviations : TTMDV : Torque teno midi virus ; TTMV : Torque teno mini virus ; TTV : Torque teno virus ; URTI : Upper respiratory tract infection ; LRTI : Lower respiratory tract infection ; ALR : additive log ratio.

Au niveau de l'espèce :

Les espèces de TTV 1, 2, 4 à 7, 9 à 14, 17, 22 et 26 à 29 ainsi que les espèces TTMDV 4, 7, 10 et 15 sont retrouvées exclusivement chez des patients LRTI, alors que pour les TTMV et les autres TTMDV, les espèces ont des proportions de présence similaires entre les deux groupes (Figure 17).

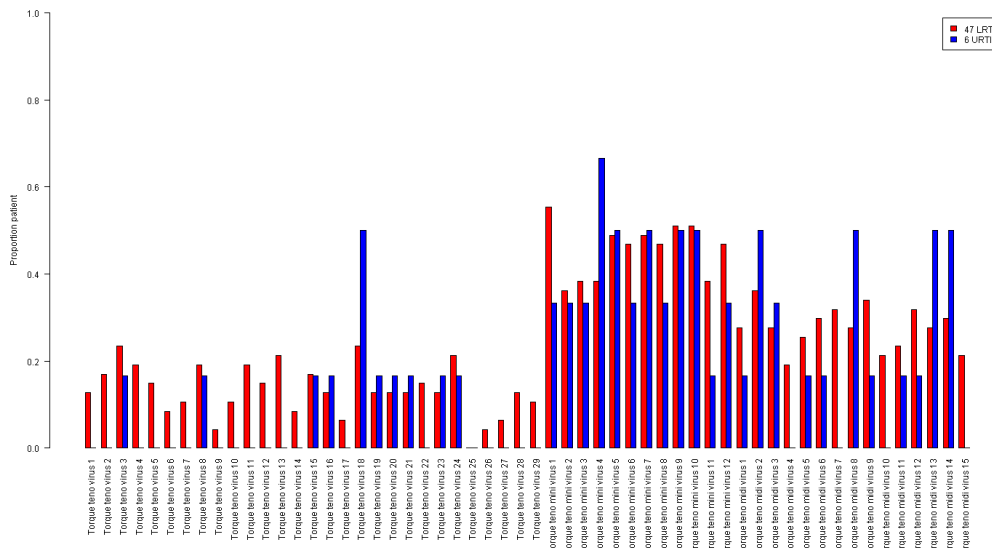


Figure 17 Histogramme représentant la proportion de présence des différentes espèces d'Anelloviridae parmi les 53 patients inclus en fonction des groupes URTI (bleu) ou LRTI (rouge).

Abréviations: URTI: Upper respiratory tract infection; LRTI: Lower respiratory tract infection.

De la même manière qu'au niveau du genre, en raison d'un nombre trop faible d'échantillons dans le groupe URTI, les statistiques visant à mettre en évidence une association entre la quantité des différentes espèces de *TTV* et de *TTMDV* avec la sévérité n'ont pu être réalisées. La comparaison n'a pu être faite que pour 9 espèces de *TTMV*, et seul les *TTMV 3*, *TTMV 6* et *TTMV 9* étaient significativement associée à la sévérité avec des p-value respectives à 0,0054 ; 0,0486 et 0,0431 (**Figure 18**).

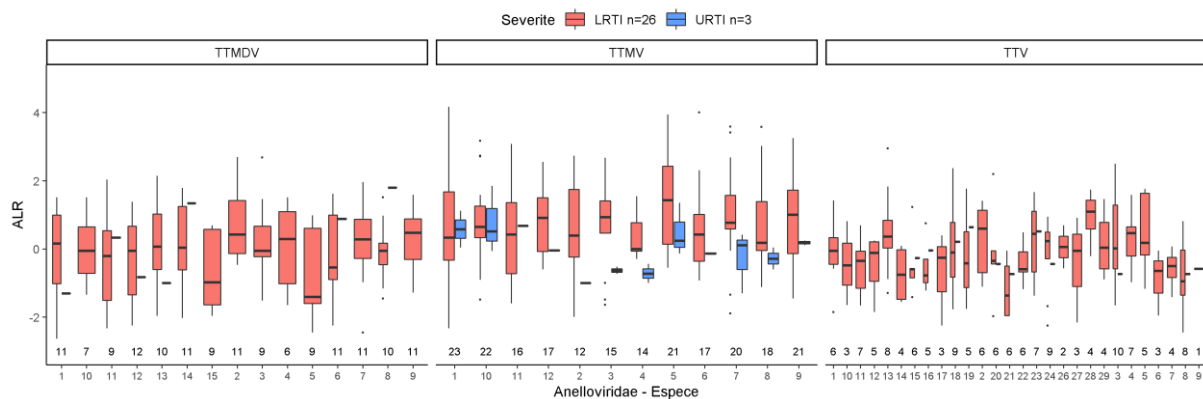


Figure 18 Boxplot représentant la distribution des ALR des différentes espèces d'Anelloviridae en fonction des groupes URTI (bleu) ou LRTI (rouge) réalisés à partir de la matrice ALR.

Abréviations : TTMDV : Torque teno midi virus ; TTMV : Torque teno mini virus ; TTV : Torque teno virus ; URTI : Upper respiratory tract infection ; LRTI : Lower respiratory tract infection ; ALR : additive log ratio.

Sur les 2 heatmap générés à partir de la matrice binaire (**Figure 19A**) et à partir de la matrice ALR (**Figure 19B**), nous n'observons pas de regroupement en fonction des variables.

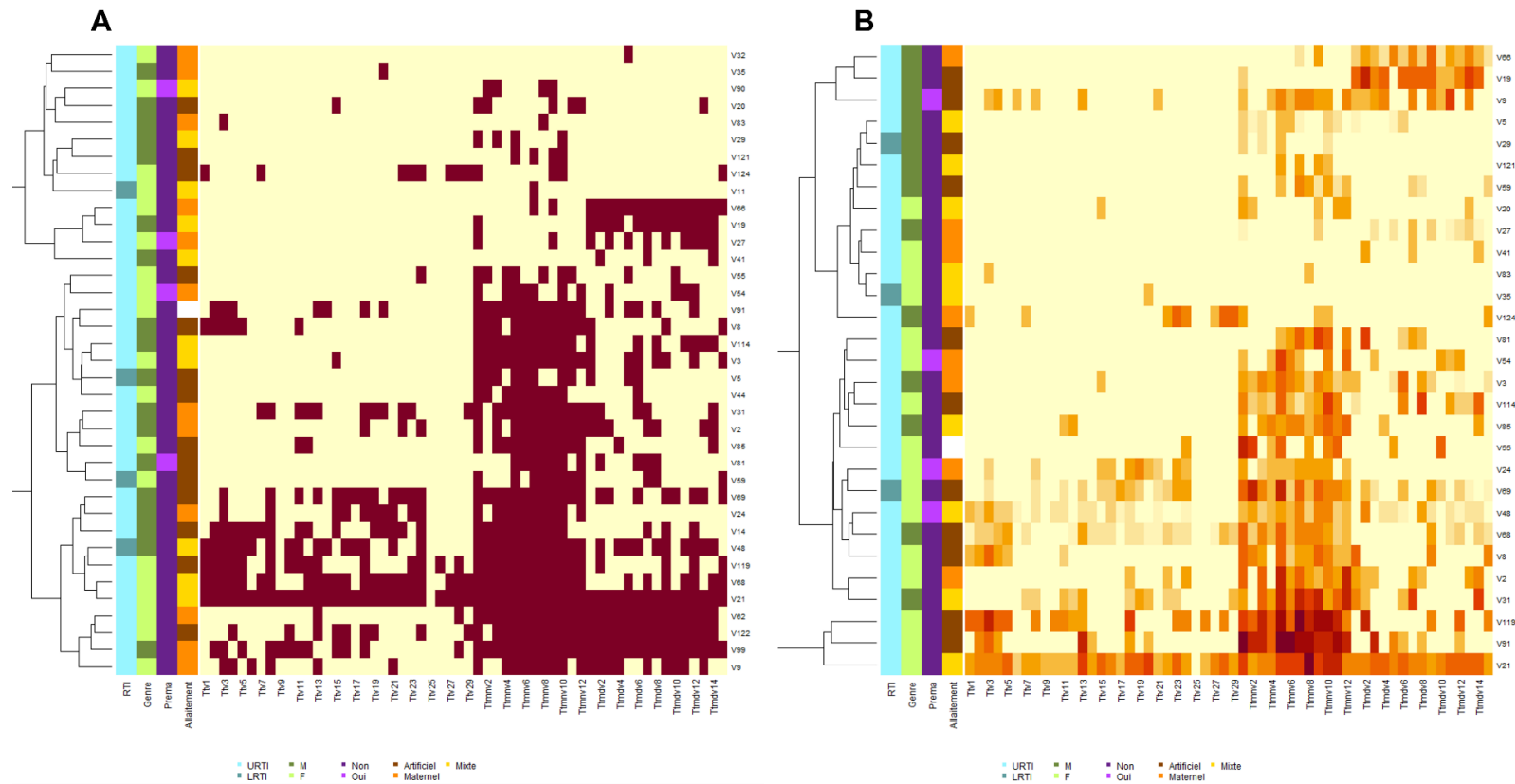


Figure 19 Heatmaps générés à partir de la matrice binaire (A) et de la matrice ALR (B).

(A) Heatmap générés à partir de la matrice binaire représente la présence/absence de chaque espèce de la famille des *Anelloviridae* détectée dans chaque échantillon. Cette présence/absence est représentée par une couleur foncée pour la présence et couleur claire pour l'absence. (B) L'heatmap générés à partir de la matrice ALR affiche l'abondance relative de chaque espèce de la famille des *Anelloviridae* détectée dans chaque échantillon. L'abondance relative est représentée par une échelle de gradient (clair à foncé). Pour les deux heatmaps, les variables étudiées étaient le groupe URTI/LRTI, le genre, la prématurité et le type d'allaitement.

Abréviations : TTMDV : Torque teno midi virus ; TTMV : Torque teno mini virus ; TTV : Torque teno virus ; URTI : Upper respiratory tract infection ; LRTI : Lower respiratory tract infection ; M : Masculin ; F : Féminin.

2.3.3.2 Famille Picornaviridae

Sur la matrice binaire, 45,3% (n=24) des échantillons contenaient des *Picornaviridae*. Parmi eux, 20,8% (n=5) étaient classés dans le groupe URTI et 79,2% (n=19) étaient classés dans le groupe LRTI.

A noter que les *Picornaviridae* étaient détectés à 83% pour le groupe URTI, et à 40% pour le groupe LRTI. L'OR associé (OR=0,1357) laisse penser qu'il pourrait y avoir un effet protecteur lorsqu'un *Picornaviridae* est présent mais ceci n'est pas statistiquement significatif (p-value = 0,0785).

Sur la matrice ALR (proportion de *Picornaviridae* en fonction du contrôle interne *Leviviridae*) (**Figure 20**) :

- dans le groupe URTI, la moyenne des ALR était de 0,90.
- dans le groupe LRTI, la moyenne était de 1,91.

Avec une p-value à 0,2398, la famille *Picornaviridae* n'était pas statistiquement associée à la sévérité.

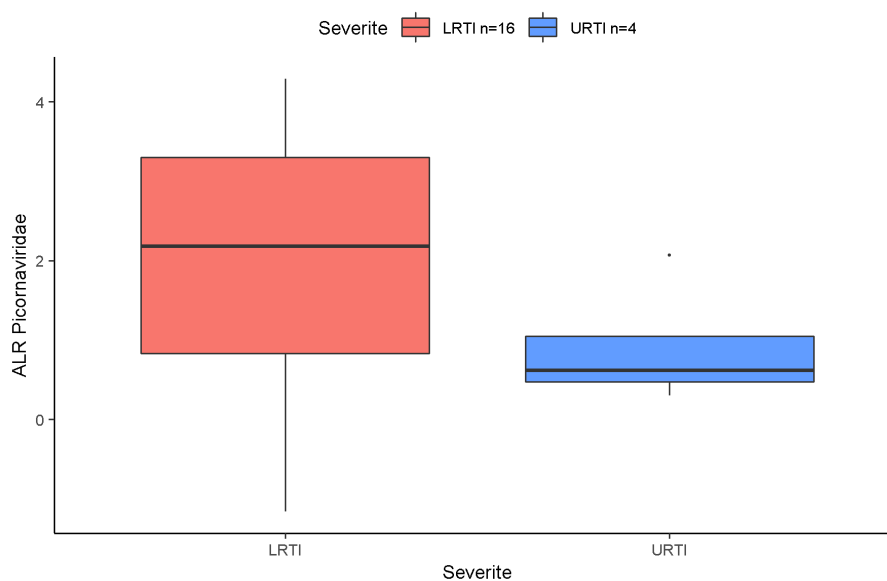


Figure 20 Boxplot représentant la distribution des ALR des Picornaviridae en fonction des groupes URTI (bleu) ou LRTI (rouge) réalisés à partir de la matrice ALR.

Abréviations: URTI : Upper respiratory tract infection ; LRTI : Lower respiratory tract infection ; ALR : additive log ratio.

2.3.3.3 Nouveaux Virus identifiés dans des prélèvements respiratoires

Genomoviridae

Sur les 53 échantillons testés, des reads assignés à la famille *Genomoviridae* n'ont été détecté que dans 2 échantillons ce qui suggère que la présence de ce virus dans les prélèvements respiratoires de cette population pédiatrique testée est un événement rare.

Redondoviridae

Aucune trace de *Redondoviridae* n'a été retrouvée dans les échantillons de la cohorte.

Circoviridae

Des reads ont été assignées à la famille *Circoviridae* dans 2 échantillons du groupe LRTI avec une très faible abondance (1 RPM pour V48 et 2 RPM pour V74) sans être associés à la sévérité (p-value = 1).

2.3.4 Analyse des coinfections

Pour les analyses de cette partie, l'absence de coinfections n'était validée que pour les échantillons pour lesquels le contrôle interne était détecté (profondeur de séquençage considérée comme suffisante pour détecter de potentielles coinfections). De ce fait, un échantillon était considéré comme « sans coinfection » uniquement si aucune coinfection n'était retrouvé ET si le contrôle interne MS2 était détecté ; et un échantillon était considéré comme « avec coinfection » si une coinfection au moins était retrouvé quel que soit la valeur du contrôle interne.

2.3.4.1 Coinfections par un virus respiratoire humain

Les virus humains responsables de coinfections respiratoires étudiés ici, étaient les suivants : *Adenoviridae*, *Coronaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Picornaviridae*, *Parvoviridae*. A noter que seules les coinfections entre familles virales ont été étudiées ici et non pas les coinfections au sein d'une même famille virale.

A partir de la matrice binaire, parmi les 53 patients de la cohorte ViBraFlu, 9,4% (n=5) ne présentait pas de coinfections, 56,6% (n=30) présentaient 1 coinfection, 18,9% (n=10) présentaient 2 coinfections et 1,9% (n=1) présentaient 3 coinfections.

A noter que pour 13,2% (n=7) des patients, il était impossible de confirmer l'absence de coinfections puisque le contrôle interne n'était pas détecté.

Tous les URTI (n=6) avaient au moins une coinfection. Parmi les LRTI, 74,5% (n=35) avaient au moins une coinfection. Le fait d'avoir au moins 1 coinfection n'est statistiquement pas associé à la probabilité de développer une forme sévère (p-value = 0,7715).

Parmi les URTI, 83,3% (n=5) avaient une coinfection et 16,7% (n=1) avaient 2 coinfections. Parmi les LRTI, 53,2% (n=25) avaient une coinfection, 19,1% (n=9) avaient 2 coinfections et 2,1% (n=1) avaient 3 coinfections. Le fait d'avoir plusieurs coinfections par des virus respiratoires n'augmente pas la probabilité d'être LRTI (p-value = 0,9164).

En analysant uniquement les échantillons pour lesquels le contrôle interne était détecté (matrice ALR), parmi les 36 patients de la cohorte ViBraFlu, 13,9% (n=5) ne présentait pas de coinfection, 63,9% (n=23) présentaient 1 coinfection et 22,2% (n=8) présentaient 2 coinfections.

Tous les URTI (n=4) avaient au moins une coinfection. Parmi les LRTI, 84,4% (n=27) avaient au moins une coinfection. Le fait d'avoir au moins 1 coinfection n'est statistiquement pas associé à la probabilité de développer une forme sévère (p-value = 1). Parmi les URTI, 75% (n=3) avaient une coinfection et 25% (n=1) avaient 2 coinfections. Parmi les LRTI, 62,5% (n=20) avaient une coinfection et 21,9% (n=7) avaient 2 coinfections. Le fait d'avoir plusieurs coinfections par des virus respiratoires n'augmente pas la probabilité d'être LRTI (p-value = 1).

Une analyse centrée uniquement sur la coinfection avec au moins une des 3 familles suivantes : *Adenoviridae*, *Coronaviridae* et *Parvoviridae* ; n'a également pas montrée d'association entre présence de coinfection et sévérité, ni sur la matrice binaire (p-value = 0,6317) ni sur la matrice ALR (p-value = 0,2904).

2.3.4.2 Coinfections par un virus non respiratoire humain

Les virus à tropisme non respiratoire responsables de coinfections étudiés ici, étaient les suivants : *Astroviridae*, *Flaviviridae*, *Herpesviridae*, *Papillomaviridae*, *Phenuiviridae*, *Picobirnaviridae*, *Polyomaviridae*, *Poxviridae* et *Retroviridae*.

A partir de la matrice binaire, parmi les 53 patients de la cohorte ViBraFlu, 1,9% (n=1) ne présentait pas de coinfections, 24,5% (n=13) présentaient 1 coinfections, 13,2% (n=7) présentaient 2 coinfections, 35,8% (n=19) présentaient 3 coinfections, 9,4% (n=5) présentaient 4 coinfections, 7,5% (n=4) présentaient 5 coinfections et 5,7% (n=3) présentaient

6 coinfections. A noter que pour 1,9% (n=1) des patients, il était impossible de confirmer l'absence de coinfections puisque le contrôle interne n'était pas détecté.

Tous les URTI (n=6) avaient au moins une coinfection. Parmi les LRTI, 95,7% (n=45) avaient au moins une coinfection. Le fait d'avoir au moins 1 coinfection n'est statistiquement pas associé à la probabilité de développer une forme sévère (p-value = 1). Le fait d'avoir plusieurs coinfections par des virus respiratoires n'augmente pas la probabilité d'être LRTI (p-value = 0,4914).

En analysant uniquement les échantillons pour lesquels le contrôle interne était détecté, parmi les 36 patients de la cohorte ViBraFlu, 2,8% (n=1) ne présentait pas de coinfections, 8,3% (n=3) présentaient 1 coinfections, 5,6% (n=2) présentaient 2 coinfections, 50% (n=18) présentaient 3 coinfections, 13,9% (n=5) présentaient 4 coinfections, 11,1% (n=4) présentaient 5 coinfections et 8,3% (n=3) présentaient 6 coinfections. Le fait d'avoir au moins 1 coinfection n'est statistiquement pas associé à la probabilité de développer une forme sévère (p-value = 1). Le nombre de coinfections par différents virus non respiratoires n'augmente pas la probabilité d'être LRTI (p-value = 0,9007).

2.3.4.3 Coinfections par des phages

Les familles de phages étudiées ici, étaient les suivantes : *Ackermannviridae*, *Cystoviridae*, *Herelleviridae*, *Inoviridae*, *Microviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae* et *Siphoviridae*. L'analyse ayant été effectuée fin 2021, elle est basée sur l'ancienne classification des phages (famille *Siphoviridae*, *Podoviridae* et *Myoviridae*).

Les familles les plus retrouvées étaient par ordre de fréquence : les *Podoviridae* (28,3%), les *Siphoviridae* et les *Ackermannviridae* (26,4%), les *Myoviridae* (20,8%), les *Microviridae* (17%), les *Herelleviridae* (11,3%), les *Inoviridae* (5,7%) et les *Cystoviridae* (1,9%).

A partir de la matrice binaire, parmi les 53 patients de la cohorte ViBraFlu, 24,5% (n=13) ne présentaient pas de coinfections avec un phage. Pour 22,6% (n=12) des patients, 1 seule famille de phage était détectée ; pour 13,2% (n=7), 2 familles de phages étaient détectées ; pour 7,5% (n=4), 3 familles de phages étaient détectées ; pour 3,8% (n=2), 4 ou 6 familles de phages étaient détectées et pour 5,7% (n=3), 5 familles de phages étaient détectées. A noter que pour 18,9% (n=10) des patients, il était impossible de confirmer l'absence de coinfections puisque le contrôle interne n'était pas détecté.

Parmi les URTI, 33,3% (n=2) avaient au moins une coinfections. Parmi les LRTI, 59,6% (n=28) avaient au moins une coinfections. Le fait d'avoir au moins 1 coinfections avec un phage n'est statistiquement pas associé à la probabilité de développer une forme sévère (p-value = 0,4296).

Parmi les URTI, 16,7% (n=1) avaient 2 coinfections et 5 coinfections. Parmi les LRTI, 25,5% (n=12) avaient une coinfection, 12,8% (n=6) avaient 2 coinfections, 8,5% (n=4) avaient 3 coinfections et 4,3% (n=2) avaient 4, 5 ou 6 coinfections. Le fait d'avoir plusieurs coinfections par des phages n'augmente pas la probabilité d'être LRTI (p-value = 0,5885).

En analysant uniquement les échantillons pour lesquels le contrôle interne était détecté, 36,1% (n=13) ne présentaient pas de coinfections avec un phage. A noter qu'il est possible que pour ces échantillons des phages soient présents mais à une quantité plus faible que notre contrôle interne. Pour 22,2% (n=8) des patients, 1 phage seulement était détecté ; pour 13,9% (n=5), 2 phages étaient détectés ; pour 8,3% (n=3), 3 ou 5 phages étaient détectés et pour 5,6% (n=2), 4 ou 6 phages étaient détectés.

Parmi les URTI, 50% (n=2) avaient au moins une coinfection. Parmi les LRTI, 65,6% (n=21) avaient au moins une coinfections. Le fait d'avoir au moins 1 coinfection avec un phage n'est statistiquement pas associé à la probabilité de développer une forme sévère (p-value = 0,6092).

Parmi les URTI, 25% (n=1) avaient 2 ou 5 coinfections. Parmi les LRTI, 25% (n=8) avaient une coinfection, 12,5% (n=4) avaient 2 coinfections, 9,4% (n=3) avaient 3 coinfections et 6,3% (n=2) avaient 4, 5 ou 6 coinfections. Le fait d'avoir plusieurs coinfections par des phages n'augmente pas la probabilité d'être LRTI (p-value = 0,657).

2.3.5 Analyse des groupes O₂ vs sans O₂

Des études récentes ayant utilisé la nécessité de supplémentation en O₂ pour classer les patients en groupe sévère (supplémentation en O₂) et non sévère (pas de supplémentation en O₂), quelques analyses ont été réalisées en utilisant cette méthode de classification, uniquement sur la cohorte des 36 patients pour lesquels le contrôle interne MS2 était détecté.

Caractéristiques clinique et démographiques des deux groupes

Parmi les 36 patients de la matrice ALR, 33,3% (n=12) n'avait pas besoin d'une supplémentation en O₂ et 66,7% (n=24) avaient besoin d'une supplémentation en O₂. Les caractéristiques cliniques et démographiques des deux groupes sont résumées dans le **tableur 14**.

Tableau 14 Caractéristiques cliniques et démographiques des 36 patients de la matrice ALR en fonction de la variable « supplémentation en O₂ ».

	VRS+ Sans supplémentation en O² (n=12)	VRS+ Supplémentation en O² (n=24)	P-value
Sexe : masculin	5 (41,7%)	11 (45,8%)	1
Âge médian, mois (min-max)	2,8 (1-6,1)	1,6 (0,5-5,9)	0,2794
Prématurité	1 (8,3%)	4 (16,7%)	0,6457
Mode de vie (Domicile-Crèche)	Domicile : 11 (91,7%)	Domicile : 22 (91,7%)	1
Tabagisme passif	7 (58,3%)	12 (50%)	1
Présence de Fratrie	8 (66,7%)	21 (87,5%)	0,1904
Type d'alimentation	Allaitement maternel : 1 (8,3%) Allaitement artificiel : 8 (66,7%) Mixte : 3 (25%)	Allaitement maternel : 12 (50%) Allaitement artificiel : 5 (20,8%) Mixte : 6 (25%)	0,019
URTI vs LRTI	URTI : 4 (33,3%) – LRTI : 8 (66,7%)	URTI : 0 (0%) – LRTI : 24 (100%)	0,0084
Durée d'hospitalisation médian (min-max)	1 (1-5)	5 (1-11)	2,23x10⁻⁶
Ct VRS médian (min-max)	19,7 (17,2-26)	20,9 (15,3-25,1)	0,6908

Abréviations : VRS : Virus Respiratoire Syncytial ; URTI : Upper Respiratory Tract Infection ; LRTI : Lower Respiratory Tract Infection ; min : valeur minimum ; max : valeur maximum ; Ct : cycle threshold.

Parmi les variables observées, le type d'alimentation, les infections LRTI et la durée d'hospitalisation étaient associés au risque d'avoir une supplémentation en O₂ lors d'une IRA.

Analyse descriptive

Aucune différence significative de composition entre les 2 groupes n'a été relevée bien que certaines familles semblent plus présentes dans le groupe avec supplémentation en O₂ (*Parvoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Coronaviridae*, *Adenoviridae*, *Phenuiviridae*, *Podoviridae*, *Myoviridae* et *Cystoviridae*) (**Figure 21**).

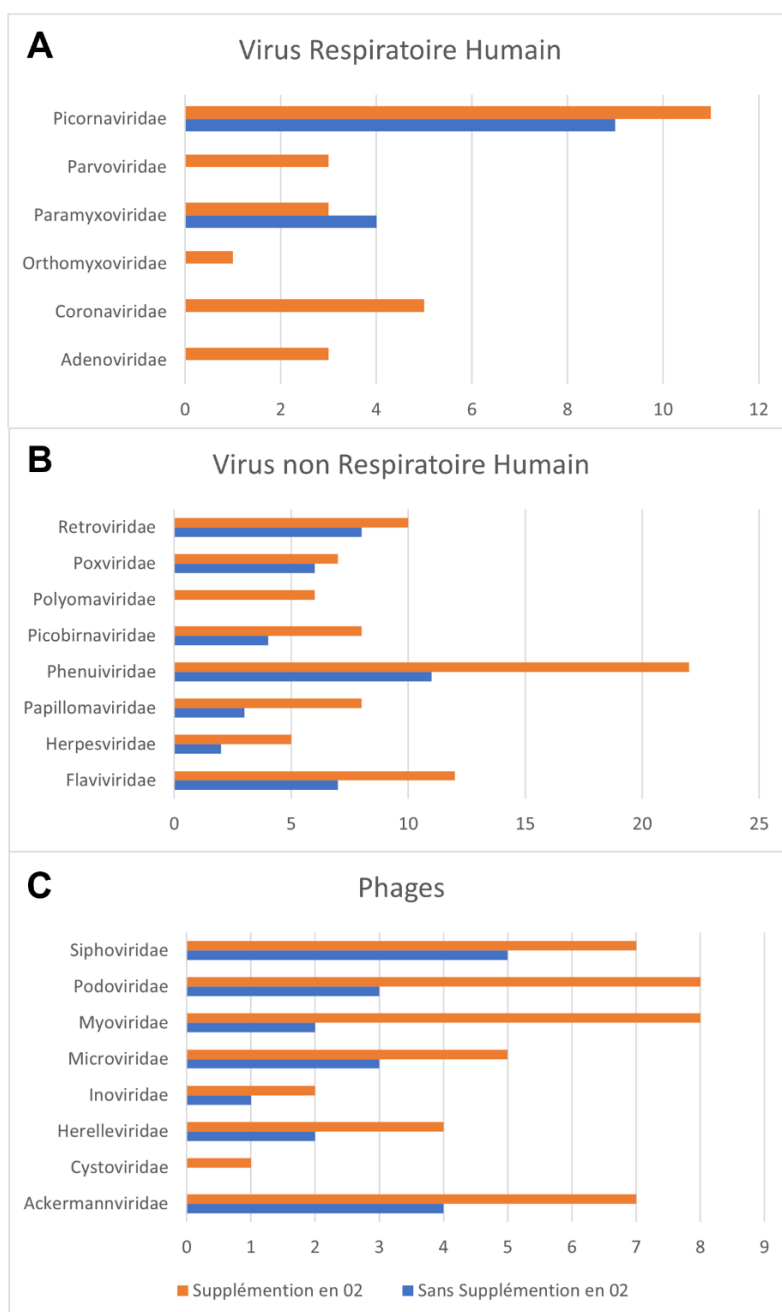


Figure 21 Histogramme représentant la proportion de présence de chaque famille virale parmi les 36 patients de la matrice ALR en fonction des groupes sans supplémentation en O₂ (bleu) ou avec supplémentation en O₂ (rouge), pour les virus respiratoires humain (A).

Hors Pneumoviridae (virus infectant) et Leviviridae (contrôle interne).

Aucune différence significative d'abondance de famille entre les échantillons des 2 groupes n'a été retrouvée.

Les *Anelloviridae*

- Au niveau de la famille

Dans le groupe sans supplémentation en O², la moyenne des ALR était de 2,77. Dans le groupe avec une supplémentation en O², la moyenne était de 1,82. Avec une p-value à 0,078, la famille *Anelloviridae* n'est pas significativement associée à la nécessité de supplémentation en O².

- Au niveau du genre

Dans le groupe sans supplémentation en O², la moyenne des ALR pour les TTV, TTMV et TTMDV étaient respectivement de 1,65, 1,77 et 1,24. Dans le groupe avec une supplémentation en O², la moyenne des ALR pour les TTV, TTMV et TTMDV étaient respectivement de 0,44, 1,13 et 0,86. Aucun des 3 genres n'étaient associés à la nécessité de supplémentation en O² (TTV p-value à 0,0631, TTMV p-value à 0,2849 et TTMDV p-value à 0,4664).

- Au niveau de l'espèce

Les analyses ont été réalisées uniquement sur les espèces présentes dans au moins 3 échantillons de chaque groupe (avec ou sans supplémentation en O²). Les abondances de TTV (1, 3, 8, 15 et 24), TTMV (1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11 et 12) et TTMDV (1, 5, 8, 9, 12, 14 et 15) n'étaient pas associées à la nécessité de supplémentation en O². En revanche, une différence d'abondance significative entre les deux groupes a été retrouvée pour les TTV2, 4, 11, 18 et 23 (p-value respectives de 0,034 ; 0,048 ; 0,030 ; 0,018 et 0,037); pour le TTMV 6 (p-value = 0,049) et pour le TTMDV 6 (p-value = 0,017).

Les *Picornaviridae*

Dans le groupe sans supplémentation en O², la moyenne des ALR était de 1,41. Dans le groupe avec une supplémentation en O², la moyenne était de 1,96. Avec une p-value à 0,4372, la famille *Picornaviridae* n'était pas statistiquement associée à la sévérité.

Coinfections par un virus respiratoire humain

Le fait d'avoir au moins 1 coinfection n'est statistiquement pas associé à la nécessité de supplémentation en O² (p-value = 0,6457). Le fait d'avoir plusieurs coinfections par des virus

respiratoires n'augmente pas la probabilité d'avoir besoin d'une supplémentation en O² (p-value = 0,671).

Une analyse centrée uniquement sur la coinfection avec au moins une des 3 familles suivantes : *Adenoviridae*, *Coronaviridae* et *Parvoviridae* ; était en revanche associé à l'oxygénothérapie avec une p-value égale à 0,0021.

Coinfections par un virus non respiratoire humain

Le fait d'avoir au moins 1 coinfection n'est statistiquement pas associé à la probabilité d'avoir recours à de l'oxygénothérapie (p-value = 1). Le nombre de coinfections par différents virus non respiratoires n'augmente pas la probabilité d'être supplémené en O² (p-value = 0,5313).

Coinfections par des phages

Le fait d'avoir au moins 1 coinfection avec un phage n'est statistiquement pas associé à l'oxygénothérapie (p-value = 1). Le fait d'avoir plusieurs coinfections par des phages n'augmente pas la probabilité d'être supplémené en O² (p-value = 0,5508).

2.3.6. Séquence VRS

2.3.6.1 Etude séquence génome complet

Parmi les 53 échantillons séquencés, 45 séquences génome complet avec une couverture supérieure à 90% ont pu être obtenues. Une profondeur moyenne de 4247 et un pourcentage de couverture moyen de 98,83% étaient observés. Le VRS est divisé en deux sous-groupes antigéniques : VRS-A et VRS-B. Ici, 29,6% (n=13) des échantillons étaient des VRS-A et 70,4% (n=31) étaient des VRS-B (**Figure 22**). A noter que pour l'un des échantillons, le groupe n'a pas pu être déterminé car les séquences mappaient à la fois sur les génomes VRS-A et VRS-B. Ceci peut être dû à une coinfection mais demanderait des analyses plus approfondies afin de le vérifier. Cet échantillon a donc été exclu car la séquence consensus est probablement chimérique et ne peut donc pas être analysée dans un arbre.

Les 13 échantillons du groupe VRS-A provenaient de patients du groupe LRTI. En ce qui concerne le groupe VRS-B, 19,4% (n=6) provenaient de patients du groupe URTI et 80,6% (n=25) provenaient de patients du groupe LRTI. Aucun des deux groupes (VRS-A et VRS-B) n'étaient statistiquement associée à la sévérité dans nos données (p-value = 0,1573).

Si l'on regarde les groupes avec ou sans supplémentation en O², les 13 échantillons du groupe VRS-A provenaient de 15,4% (n=2) patients sans supplémentation en O² et de 84,6% (n=11)

patients avec supplémentation en O². En ce qui concerne le groupe VRS-B, 45,2% (n=14) provenaient de patients du groupe sans O² et 54,8% (n=17) provenaient de patients du groupe avec O². Aucun des deux groupes (VRS-A et VRS-B) n'étaient statistiquement associée à l'oxygénothérapie dans nos données (p-value = 0,08915).

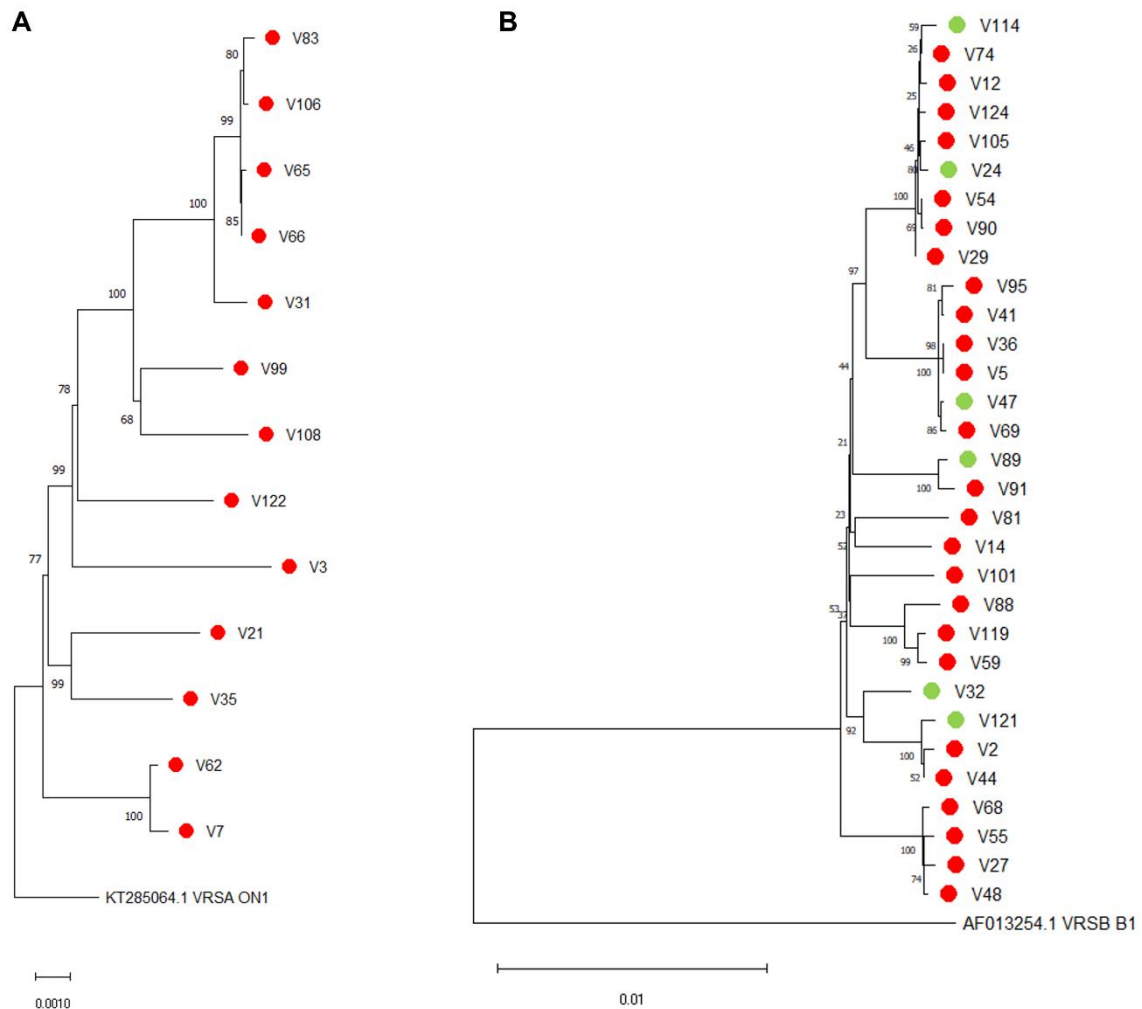


Figure 22 Arbres phylogéniques des séquences génome complet de VRS-A (A) et de VRS-B (B)

Arbres générés à partir des alignements des séquences consensus des VRS-A et des VRS-B des prélèvements inclus et des séquences de référence VRS-A et VRS-B selon la méthode des distances Neighbor Joining (NJ) en appliquant la correction de distance Kimura 2- parameter avec un bootstrap à 1000. Les échantillons marqués d'un rond vert appartiennent au groupe URTI et ceux marqués d'un rond rouge appartiennent au groupe LRTI.

2.3.6.2 Etude séquence protéine G du VRS

Une analyse de la séquence du gène de la protéine G des différents échantillons (pour lesquels l'assignation à un génotype avait été possible (n=31)) a été réalisée avec un ensemble de séquences de référence de tous les génotypes afin d'identifier les génotypes présents chez les patients de la cohorte et de déterminer si un génotype pouvait être associé à la sévérité.

Les séquences associées au groupe VRS-A étaient toutes regroupées avec le génotype ON1 qui contient une duplication de 72 nt dans la séquence correspondant à la région C-terminale du gène G (**Figure 23**).

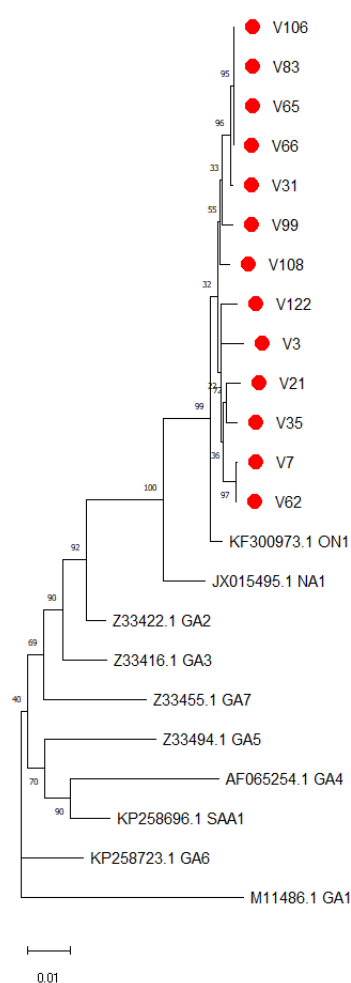


Figure 23 Arbre phylogénique des séquences du gène G des VRS-A

Arbre généré à partir des alignements des séquences consensus du gène G des VRS-A des prélèvements inclus et des séquences de référence VRS-A selon la méthode des distances Neighbor Joining (NJ) en appliquant la correction de distance Kimura 2- parameter avec un bootstrap à 1000. Les échantillons marqués d'un rond vert appartiennent au groupe URTI et ceux marqués d'un rond rouge appartiennent au groupe LRTI.

En ce qui concerne les séquences associées au groupe VRS-B, il est plus difficile de déterminer un génotype précis car à l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus sur les critères de discrimination entre les génotypes. En effet, certains groupes qui ont été décrits comme des génotypes distincts se sont avérés appartenir à des génotypes précédemment identifiés. Ici, seul 18 séquences avaient une couverture assez bonne sur la protéine G pour être analysées. Sur l'arbre phylogénétique, les séquences des patients URTI et LRTI ne sont pas regroupées (**Figure 24**).

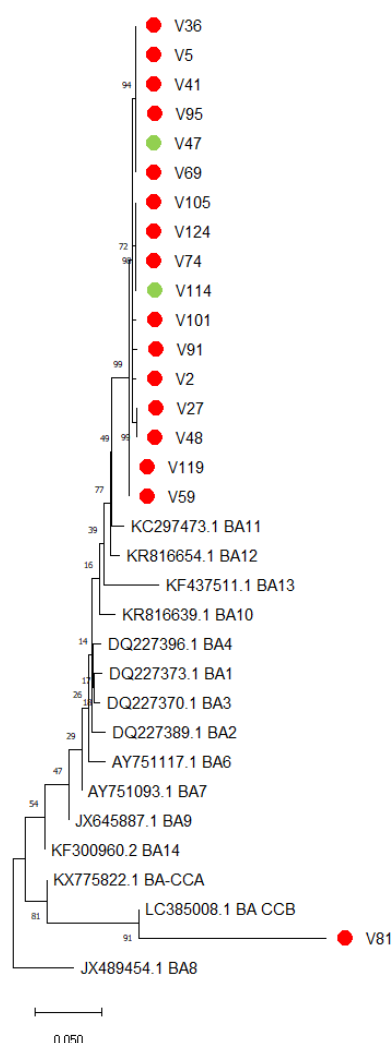


Figure 24 Arbre phylogénique des séquences du gène G des VRS-B

Arbre généré à partir des alignements des séquences consensus du gène G des VRS-B des prélèvements inclus et des séquences de référence VRS-B selon la méthode des distances Neighbor Joining (NJ) en appliquant la correction de distance Kimura 2- parameter avec un bootstrap à 1000. Les échantillons marqués d'un rond vert appartiennent au groupe URTI et ceux marqués d'un rond rouge appartiennent au groupe LRTI.

2.4 Discussion

Cet axe d'étude avait pour objectif de déterminer la composition globale du virome dans les prélèvements VRS+ de la cohorte ViBraFlu ainsi que de mettre en évidence les potentielles différences de composition du virome respiratoire en fonction de la sévérité de l'IRA ou de certains critères cliniques. Les séquences de génomes complets et de la protéine G du VRS ont également été étudiées afin de déterminer si l'un des génotypes VRS pouvait être associé à la sévérité.

2.4.1 Caractéristiques cliniques et démographiques de la cohorte

Dans un premier temps, les variables cliniques et démographiques reconnues comme pouvant influencer la composition du microbiome respiratoire mais aussi la sévérité de l'infection (genre, âge, prématurité, présence de fratrie et de tabagisme passif au sein du foyer et mode d'allaitement) ont été étudiées. Aucune de ces variables n'était statistiquement associée à une probabilité plus élevée d'être LRTI dans cette cohorte contrairement à ce qui a été observé dans la littérature. En effet, plusieurs études ont mis en évidence que l'âge était le principal facteur de risque de sévérité ; en cause (1) les voies respiratoires plus étroites chez les jeunes enfants rendent l'obstruction de celles-ci plus fréquentes¹²⁴, (2) la baisse du taux d'anticorps maternels protecteurs chez les enfants de moins de 3 mois¹⁶⁸. D'autres études ont également démontré que la prématurité, l'absence d'allaitement maternel ainsi que certains facteurs liés à l'environnement de l'enfant (tabagisme passif, fratrie nombreuse) sont des facteurs de risque de développer une forme sévère de la maladie^{30,118,172}. Enfin, il a aussi été prouvé que le sexe masculin pouvait être associé à des formes plus sévères de la maladie⁴³⁷. Il est évident que nous manquons de puissance pour mettre en évidence certaines différences notamment pour les variables prématurité, genre, et allaitement pour lesquelles les données décrites semblent assez différentes entre les deux groupes. Ces différences seraient à confirmer sur des effectifs plus grands. De plus, il existe un biais possible lors de l'admission à l'UHCD. En effet, bien que certains nourrissons ne présentaient pas de tableau clinique « inquiétant », ils ont tout de même été admis en raison de leur jeune âge ce qui pourrait expliquer le fait que la variable âge ne soit pas associée à la sévérité.

Dans un second temps, des études récentes ayant utilisé la nécessité de supplémentation en O2 pour classer les patients en groupe sévère (supplémentation en O2) et non sévère (pas de supplémentation en O2), quelques analyses ont été réalisées en utilisant cette méthode de

classification. Le mode d'alimentation était significativement différent entre les deux groupes avec l'allaitement qui était associé à un risque plus élevé de supplémentation en O₂. Cette donnée n'est pas cohérente avec la littérature puisque normalement l'allaitement maternel est associé à une augmentation de la protection et donc une diminution du risque de développer une forme sévère^{30,118,168,172}. Ceci peut cependant s'expliquer par l'âge des nourrissons qui semblent plus faible pour les nourrissons avec supplémentation en O₂ bien que cette donnée ne soit pas significative (p-value = 0,2794). Par ailleurs, le nombre de patients souffrant d'une LRTI et la durée d'hospitalisation étaient significativement associés à la nécessité de supplémentation en O₂.

2.4.2 Hétérogénéité du virome respiratoire chez l'enfant

L'analyse descriptive des données de virome a mis en évidence 43 familles virales retrouvées dans au moins 1 échantillon. Contrairement à d'autres viromes environnementaux, celui des voies respiratoires présente une faible diversité virale principalement en raison de la présence de barrières naturelles³⁷⁶. De plus, on remarque qu'il ne semble pas y avoir de virome partagé entre les enfants de la cohorte bien qu'ils soient tous originaires de la région lyonnaise (environnement commun), de moins de 7 mois et prélevés la même année pendant la même période. Cette grande variabilité interindividuelle a déjà été décrite dans d'autres études^{374,376}.

Parmi les familles retrouvées, 7 étaient des familles de virus respiratoires humains, 8 étaient des familles de virus non respiratoires humains, 3 étaient des familles de virus non pathogènes humains, 8 étaient des familles de phages et 17 étaient des familles de virus non humain (plantes, champignons, insectes, autres mammifères).

De la même manière que dans le tractus digestif, il a été constaté que les virus eucaryotes présentaient une faible diversité à la naissance et que leur nombre augmentait progressivement avec l'exposition environnementale²⁷⁰. En effet, chaque individu sain peut être infecté chroniquement par de nombreux virus d'eucaryotes que l'on retrouve alors de façon transitoire dans le virome respiratoire³⁷⁶. Dans notre étude, le VRS était le virus infectant et nous l'avons retrouvé dans tous les échantillons. De nombreuses coinfections avec des virus respiratoires ont également été observées, notamment avec les familles des *Picornaviridae*, des *Adenoviridae*, des *Coronaviridae*, des *Orthomyxoviridae*, des *Paramyxoviridae*, et des *Parvoviridae*. Ceci avait déjà été observé dans d'autres études réalisées sur des enfants

asymptomatiques en bonne santé^{2,244,368}. Cependant les enfants de ces cohortes avaient 18 mois³⁶⁸, entre 6 et 24 mois² et entre 2 et 21 mois²⁴⁴ alors que dans notre étude, nous n'avons inclus que des nouveau-nés de moins de 7 mois. Il est intéressant de noter que les nourrissons acquièrent visiblement un virome respiratoire très hétérogène et ce rapidement après la naissance.

D'autres virus pathogènes pour l'homme mais à tropisme non respiratoire ont également été détectés, parmi eux des virus pathogènes opportunistes tels que les *Herpesviridae*, les *Papillomaviridae*, les *Poxviridae*...

Plusieurs familles de phages ont également été identifiées dans plusieurs échantillons (*Ackermannviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae* et *Siphoviridae*). La présence de phages au niveau du tractus respiratoire est liée à la flore bactérienne résidente et avait déjà été documenté dans d'autres études^{270,291}.

Grâce aux nouvelles technologies, des virus commensaux non pathogènes ont pu être identifiés notamment des virus de la famille des *Anelloviridae* dont nous parlerons plus en détails dans la suite de ce manuscrit^{372,376}.

Il est intéressant de noter que des virus de plantes ont également été trouvés dans presque tous les échantillons, ce qui avait déjà été signalé dans des poumons humains et de souris²⁴⁴.

2.4.3 Association entre sévérité de la bronchiolite et composition du virome respiratoire

En ce qui concerne la comparaison de composition entre nos groupes URTI vs LRTI, bien que certaines familles semblent plus abondantes dans le groupe LRTI ou dans le groupe URTI, aucune différence significative entre les deux groupes n'a été notée. Au niveau de la famille, l'ensemble des données du virome ne permettent donc pas de différencier les groupes URTI ou LRTI. Au niveau de l'espèce pour la famille des *Anelloviridae*, certaines espèces n'étaient retrouvées que chez les patients LRTI (les *TTV* 1, 2, 4 à 7, 9 à 14, 17, 22 et 26 à 29 et les *TTMDV* 4, 7, 10 et 15). Malheureusement, en raison d'un nombre trop faible d'échantillons dans le groupe URTI, la comparaison entre les 2 groupes n'a pu être faite que pour 9 espèces de *TTMV*, et seul les *TTMV* 3, 6 et 9 étaient significativement associée à la sévérité.

De la même manière, aucune différence significative de composition du virome au niveau des familles virales n'a pu être mise en évidence par comparaison des groupes sans ou avec supplémentation en O₂, hormis la coinfection avec *Adenoviridae* ou *Coronaviridae* ou *Parvoviridae* avec une p-value égale à 0,0021). Au niveau de l'espèce pour la famille des

Anelloviridae, une différence d'abondance significative entre les groupes avec ou sans supplémentation en O₂ a été retrouvée pour les TTV2, 4, 11, 18 et 23; pour le TTMV 6 et pour le TTMDV 6. De récentes études sur le virome ont pourtant mis en évidence qu'une dysbiose de celui-ci pourrait être impliquée dans les formes sévères d'IRA. En effet, des études sur population pédiatrique ont par exemple révélé que les enfants atteints de pneumonie présentaient des charges de TTV (famille *Anelloviridae*) visiblement plus élevées que les enfants souffrant d'une infection pulmonaire moins grave^{390,391,438}. De la même manière, Li *et al.*, ont mis en évidence que l'abondance relative des phages *Propionibacterium* étaient significativement plus élevée dans le virome respiratoire des enfants présentant des IRA récurrentes, tandis que les phages *Lactococcus* présentaient une tendance inverse³⁹². A noter que dans cette étude, les enfants étaient plus âgés (âges médians des différents groupes allant de 40,6 mois à 72 mois), la différence entre nos deux études peut donc s'expliquer de deux manières : soit la technique utilisée pour VibraFlu est moins sensible pour la détection des phages, soit l'acquisition des phages dépend de l'âge. Aux vues de ces différents résultats, il serait intéressant de réaliser des analyses au niveau du genre voir de l'espèce de phage.

2.4.4. Coinfections

Nous avons ensuite analysé les co-infections présentes dans chaque échantillon. Dans un premier temps, nous avons regardé les virus respiratoires humains responsables des coinfections. Les virus les plus retrouvés étaient les *Adenoviridae*, *Coronaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Picornaviridae* et *Parvoviridae* ce qui correspond à ce qui avait déjà été trouvé dans la littérature^{2,368,372}. Dans une autre étude, tous les échantillons contenaient de 1 à 3 virus à ARN (VRS, Coronavirus, rhinovirus, entérovirus et grippe)²⁴⁴. Sur la matrice binaire et ALR, 77,4% et 86,1% des patients avaient respectivement au moins une co-infection.

Dans notre étude la proportion de co-infections était élevée. En effet, d'autres études ont rapporté des taux de co-infection allant de 18% à 61,8%^{369,439,440}. Dans notre étude, le fait d'avoir au moins 1 co-infection ou d'avoir plusieurs co-infections par des virus respiratoires n'était pas associé à la probabilité de développer une forme sévère. Il existe des preuves contradictoires de l'effet de la co-infection sur la gravité de la maladie. Des études avaient déjà rapporté qu'il n'y avait aucune association avec la sévérité de l'infection entre les patients souffrant d'IRA causées par un seul agent et celles causées par plusieurs virus dans les

échantillons d'ANP étudiés chez les enfants hospitalisés^{369,439–445}. A l'inverse d'autres études ont suggéré que la co-infection virale respiratoire pouvait être un facteur de risque d'aggravation des symptômes de la maladie^{446–453}. Une étude portant sur des enfants de moins de 2 ans a révélé des scores de détresse respiratoire plus élevés chez les nourrissons atteints du VRS et d'un autre virus respiratoire (grippe A ou B, PIV 1, 2 ou 3 ou AdV) par rapport aux nourrissons infectés par le VRS seulement⁴⁴⁸. Semple et al., ont quant à eux constaté que la coinfection par le VRS et le MPV était fortement associée à un risque 11 fois plus élevé d'admission à l'unité de soins intensifs pédiatriques par rapport à une infection par le VRS seulement⁴⁴⁹. De la même manière, une étude de Greensill *et al.*, a montré que l'évolution était plus sévère en cas de co-infection par le VRS et le MPV⁴⁵². Dans notre étude, il n'a pas été possible d'étudier l'impact des potentielles co-infections VRS-hMPV puisque ces deux virus sont de la même famille virale. Il n'a donc pas été possible de distinguer les deux en nous basant sur l'analyse au niveau de la famille. Drori *et al.*, ont constaté que lorsque le pic de cas de VRS coïncidait avec le pic de grippe, les pourcentages de cas positifs pour le VRS étaient plus faibles que lorsque le pic de cas de VRS précédait la grippe⁴⁴⁷. A noter que dans ces différentes études la coinfection était détectée par PCR. Dans notre étude, bien que les effectifs soient faibles, les coinfections sont détectées avec le protocole de mNGS qui est seule manière de regarder l'ensemble des coinfections de manière systématique. D'autres études sur de plus grandes cohortes et des modèles animaux sont donc nécessaires pour comprendre les interactions entre les virus coinfectant et leur hôte.

Dans un second temps, nous avons regardé les virus non respiratoires humains présents dans les échantillons. Les virus à tropisme non respiratoire présents étaient : *Astroviridae*, *Flaviviridae*, *Herpesviridae*, *Papillomaviridae*, *Phenuiviridae*, *Picobirnaviridae*, *Polyomaviridae*, *Poxviridae*, *Retroviridae* et *Rhabdoviridae*. De la même manière que dans le tractus digestif, l'abondance et la diversité des virus eucaryotes au sein du virome augmentent progressivement avec l'exposition environnementale et les infections chroniques par des virus opportunistes tels que *Herpesviridae*, *Polyomaviridae*, *Papillomaviridae*...^{270,366,367}. Seuls 3 patients ne présentaient pas de coinfections dont 2 patients pour lesquels le contrôle interne n'était pas détecté et pour lesquels cette absence de coinfection n'est donc pas interprétable. Le fait d'avoir plusieurs coinfections par des virus non respiratoires n'était pas associé à la sévérité de l'infection. A notre connaissance peu d'études sur cohorte pédiatrique ont étudié

le lien entre sévérité et présence de co-infections par des virus non respiratoires. Une étude de 2005 avait mis en évidence par culture la présence de *Cytomégalo*virus (CMV, famille *Herpesviridae*) dans 4,4% des échantillons et cette présence était associée à une durée d'hospitalisation plus longue⁴⁵⁴. A noter cependant que le CMV peut être un agent pathogène respiratoire, en particulier chez les nourrissons ; et que dans l'étude de Fuller et *al.*, il n'est pas indiqué si l'allongement de la durée d'hospitalisation est causé par la gravité de la maladie ou par des changements dans la prise en charge par le clinicien (étude retrospective)⁴⁵⁴.

Enfin, nous avons regardé les familles de phages présentes dans les échantillons. Les familles les plus retrouvées étaient les *Siphoviridae*, les *Podoviridae*, les *Ackermannviridae*, les *Myoviridae* et les *Microviridae*. En raison d'une flore bactérienne résidente, il n'est pas étonnant qu'un grand nombre de phages soit retrouvé au niveau du tractus respiratoire. De précédentes études ont rapporté que les phages du virome appartenaient majoritairement à l'ordre des *Caudovirales*, notamment les *Siphoviridae*, les *Myoviridae* et les *Podoviridae*^{55,270,291}. A noter que la prévalence de certains phages ADN double et simple brin peut être exagérée en raison d'un biais d'amplification dans ces études^{280,455}. D'après nos analyses, la présence d'au moins une famille de phage, ou la présence de plusieurs familles de phages n'étaient pas associée à la probabilité de développer une forme sévère. Pourtant, les phages sont capables d'affecter la santé humaine soit en façonnant le microbiome respiratoire, soit en interagissant directement avec le système immunitaire⁴⁵⁶. Peu d'études se sont intéressées aux phages lors de l'analyse du virome respiratoire³⁹². Li et *al.*, ont révélé que l'abondance des phages de *Propionibacterium* étaient significativement plus élevée dans le virome respiratoire des enfants présentant des IRA récurrentes tandis que les phages de *Lactococcus* présentaient une tendance inverse³⁹². Ces données montrent qu'il est nécessaire de s'intéresser de manière plus approfondie à la composition en phages dans le virome respiratoire afin de mettre en lumière leur rôle potentiel dans la pathogenèse des IRA.

2.4.5 Analyse détaillée pour quelques familles du virome

Une analyse détaillée pour quelques familles identifiées dans le virome a été réalisée.

2.4.5.1 *Anelloviridae*

Parmi les familles les plus représentées, il y avait les *Anelloviridae* retrouvés dans 35 échantillons (66,04%) sur la matrice binaire et dans 28 échantillons (77,7%) sur la matrice ALR.

Ceci correspond aux données décrites dans la littérature selon lesquelles les *Anelloviridae* représenteraient la famille de virus la plus répandue dans le virome respiratoire^{291,374}. En effet, les *Anelloviridae* sont retrouvés chez les humains de tout âge et de manière ubiquitaire (chez 75 à 100 % des sujets testés) et ce dès les premiers mois de vie^{376,457–459}.

La potentielle implication des *Anelloviridae* a été étudiée dans diverses maladies. Dans notre étude, bien que l'analyse descriptive montrait une différence entre les groupes URTI et LRTI, notamment sur la matrice binaire présence/absence, la famille *Anelloviridae* n'était statistiquement pas associée à la sévérité. Il a pourtant déjà été rapporté dans la littérature des associations entre les *Anelloviridae* et les maladies respiratoires chroniques, telles que l'asthme ou la BPCO³⁷⁶. En raison de leur caractère ubiquitaire, il est difficile d'établir si cette association est causale³⁷³. Dans le cas de notre étude, c'est probablement le faible effectif et donc un manque de puissance qui nous empêche de montrer une différence statistiquement significative.

La famille des *Anelloviridae* est divisée en trois genres majeurs : *Torque Teno Virus*, *Torque Teno Mini Virus* et *Torque Teno Midi Virus*⁵⁵. Dans notre étude, les 3 genres ont été retrouvés respectivement dans 47,2%, 69,8,7% et 64,2% des échantillons. La proportion des différents genres varie énormément d'un pays à l'autre dans la population générale et en fonction de l'âge et du statut immunitaire³⁷⁶. Aucun de ces 3 genres n'était associé à la sévérité contrairement à ce qui a été montré dans la littérature notamment pour les TTV. En effet, une étude sur population pédiatrique (nourrissons âgés de 1 à 24 mois) a montré que la présence et la charge élevée de TTV étaient associées à certaines maladies respiratoires aiguës³⁹⁰. Il semble que les TTV entrent en contact avec de nombreux récepteurs PRR associés aux agents pathogènes PAMP activant ainsi des réponses immunitaires et inflammatoires au cours des IRA^{376,391}. De manière intrigante, une autre étude n'a pas montré de corrélation significative entre la présence d'un des genres d'*Anellovirus* et les IRA à répétition chez l'enfant³⁹².

L'analyse au niveau de l'espèce a révélé la présence de nombreuses coinfections par différentes espèces d'*Anellovirus* dans chaque échantillon. Cette forte prévalence de coinfections avec de multiples lignées a déjà été relevée dans une récente étude⁴⁶⁰. Seulement 3 espèces de TTMV ont pu être associées à la sévérité en raison d'un trop faible effectif pour réaliser les analyses sur toutes les espèces présentes. Il serait donc intéressant de réaliser ce type d'analyse sur de plus grande cohorte de patients.

2.4.5.2 *Picornaviridae*

Une analyse sur la famille des *Picornaviridae* retrouvée dans 24 échantillons (45,3%) a été réalisée. Que ce soit à partir des analyses sur la matrice des présence/absence (OR=0,1357) ou sur la matrice ALR (OR=0,1147), les OR suggéraient qu'il pourrait y avoir un effet protecteur lorsqu'un *Picornaviridae* est présent. Cependant, pour les deux matrices, ces données n'étaient statistiquement pas associées à la sévérité. Pourtant, une étude sur les *rhinovirus* (RV, famille *Picornaviridae*) avait montré une réduction de la gravité de la maladie liée à deux autres virus respiratoires létaux chez la souris⁴⁶¹. De plus, il a été démontré que le RV inhibe la réplication du virus de la grippe A et du SarS-CoV-2 dans les cellules épithéliales des voies respiratoires en culture^{19,462}. L'interférence des virus respiratoires au sein d'un hôte peut contribuer à réduire la gravité de la maladie et à modifier la dynamique virale au niveau de la population. En effet, des études épidémiologiques ont suggéré que les virus en co-circulation, notamment les RV, peuvent inhiber la dynamique de diffusion d'autres virus respiratoires^{19,463,464}. Une autre grande étude multicentrique sur des nourrissons a révélé une association négative significative entre le VRS et le RV⁴⁶⁵. D'autres études sur des cohortes de taille plus importante sont nécessaires pour mieux comprendre le rôle éventuel d'une coinfection avec un *Picornaviridae* dans la pathogenèse et l'épidémiologie virale.

2.4.5.3 Nouveaux virus

Grâce aux nouvelles technologies de séquençage, des virus jusqu'alors inconnus ont été découverts dans le virome pulmonaire d'individus sains, mais aussi dans celui d'individus souffrant d'IRA.

Initialement trouvés dans les champignons, les *Genomoviridae* ont également été identifiés dans le sang et les matières fécales d'animaux, les eaux usées, les insectes, certains végétaux, et récemment dans le sang, des prélèvements respiratoires, liquide céphalo-rachidien et les matières fécales d'humain⁴⁶⁶. Sur les 53 échantillons testés, seul 2 échantillons contenaient des séquences associées à la famille des *Genomoviridae* suggérant une présence rare de ce virus dans les prélèvements respiratoires de cette population pédiatrique. Il est possible que d'autres espèces de cette famille avec des séquences divergentes et non référencées soient présentes dans nos échantillons comme cela a déjà été observé⁴⁶⁷. A noter qu'une partie des virus de cette famille est capable d'infecter des champignons, une éventuelle contamination par l'environnement du laboratoire ou par les méthodes d'extraction des acides nucléiques

doit être envisagée bien que l'identification d'un *Genomoviridae* dans seulement 2 échantillons rende la contamination peu plausible. Par ailleurs, grâce au séquençage de plus en plus de virus de la famille des *Genomoviridae* seront probablement identifiés. Bien qu'à ce jour aucune relation directe n'a pu être établie entre la présence d'un *Genomoviridae* et une quelconque maladie humaine, une étude récente a rapporté la présence d'un *Gemykibivirus* chez un patient atteint de pneumonie sévère⁴⁶⁸. Il serait donc intéressant de faire une étude à plus grande échelle afin de mieux connaître la prévalence et la pathogenèse éventuelle des *Genomoviridae* chez l'homme.

Une autre famille virale récemment identifiée dans les voies respiratoires est celle des *Redondoviridae*. Cependant, aucune trace de *Redondoviridae* n'a été retrouvée dans les échantillons de notre cohorte contrairement à ce qui a été précédemment décrit^{469–472}. En effet, le premier génome de *Redondoviridae* a été découvert dans les voies respiratoires d'un patient fébrile⁴⁷³. Par la suite, les détectons de *Redondoviridae* ont été faites exclusivement dans des échantillons humains et principalement dans les voies respiratoires et les sites oropharyngés où cette famille était la 2^{ème} famille de virus à ADN eucaryotes la plus répandue après les *Anelloviridae*⁴⁶⁹. Les séquences de *Redondovirus* étaient associées aux maladies parodontales, et leur abondance diminuait avec le traitement⁴⁶⁹. Des *Redondoviridae* ont également été détectés dans les expectorations d'un patient présentant des symptômes respiratoires en l'absence de tout pathogène respiratoire identifié⁴⁷². A l'inverse, Tu *et al.*, n'ont pas mis en évidence de différences significatives entre les patients avec et sans *Redondoviridae* au niveau des symptômes cliniques de l'IRA chez les patients⁴⁷¹. La preuve d'une association ou d'une relation de cause à effet entre cette famille de virus et les maladies respiratoires aiguës doit encore faire l'objet d'études supplémentaires. Aux vues de ces différentes études, il est étonnant de n'avoir retrouvé aucune séquence de *Redondoviridae* dans notre cohorte. Une hypothèse est que les *Redondoviridae* pourraient être acquis plus tardivement dans le virome respiratoire car contrairement aux jeunes patients de la cohorte VibraFlu, ceux des études citées ci-dessus sont tous âgés de plus de 18 ans. Par ailleurs de très récentes études, qui ont également mis en évidence la présence de *Redondovirus* dans la cavité humaine, ont identifié l'amibe buccale *Entamoeba gingivalis* comme hôte probable du virus et favorisant sa réplication^{474,475}.

Enfin, la dernière famille analysée était celle des *Circoviridae* retrouvée dans 2 échantillons du groupe LRTI. Une récente étude sur population pédiatrique au Chili avait déjà signalé la présence d'un HuACyV (genre *Cyclovirus*, famille *Circoviridae*) chez 3,3% des enfants atteints d'une IRA⁴⁷⁶. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à obtenir des plots de couvertures pour ces deux échantillons. Ceci peut être dû à une erreur d'assignation ou à une absence de séquence de référence adaptée dans la base de données utilisée pour l'alignement. En effet, les bases de données spécifiques aux virus doivent être améliorées de manière significative en ajoutant davantage de séquences virales.

2.4.6 Analyse des séquences VRS

L'analyse des séquences a permis d'obtenir 45 séquences génome complet de VRS réparties entre les deux génogroupes : VRS-A (29,6%) et VRS-B (70,4%). Une récente étude a montré que le virome respiratoire au cours de l'infection par le VRS présentait une fréquence élevée de co-infections par les VRS-A et VRS-B (56 %) notamment chez les enfants présentant une forme sévère de la maladie²⁴⁴. Ce résultat est plutôt étonnant puisque nous n'avons eu qu'un seul cas probable de co-infections dans notre cohorte ce qui se rapproche d'autres études antérieures qui n'avait montré que 0,1% à 0,4% cas de co-infections entre VRS-A et VRS-B^{477,478}. Aucun des deux génogroupes n'étaient statistiquement associé à la sévérité dans nos données.

Plusieurs études ont examiné le lien potentiel entre le génotype du VRS et la sévérité clinique sans parvenir à un consensus puisque les études aboutissent à des conclusions contradictoires⁴⁷⁹. Les raisons de ces divergences peuvent être multiples : différences dans les critères d'inclusion ou critères de classification de la sévérité, taille et démographie des cohortes. Par exemple, une étude sur des nourrissons hospitalisés a suggéré que le génotype ON1 du VRS-A aggravait la sévérité clinique de la bronchiolite⁴⁸⁰. Une autre étude a révélé que le génotype GA5 (VRS-A) était associé à une augmentation de la sévérité⁴⁸¹. A contrario, d'autres études n'ont trouvé aucune association entre le génotype VRS-A ou VRS-B et la sévérité clinique chez les patients hospitalisés⁴⁸²⁻⁴⁸⁴.

L'analyse de la séquence du gène de la protéine G des différents échantillons a montré que toutes les séquences VRS-A étaient regroupées dans le génotype ON1. En ce qui concerne les séquences VRS-B, il est plus difficile de déterminer un génotype précis car à l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus sur les critères de discrimination entre les génotypes^{92,93}. Les

effectifs étant petits nous n'avons pas pu faire de tests statistiques pour déterminer si un génotype était associé à la sévérité. A noter cependant que tous les VRS-A ON1 étaient dans le groupe LRTI et qu'il n'y avait aucun regroupement de séquences des patients URTI et LRTI sur l'arbre phylogénétique pour les VRS-B.

2.4.7 Limite de l'étude

Notre étude présente plusieurs limites. Premièrement notre méthode d'échantillonnage. En effet, une IRA implique une inflammation des voies respiratoires supérieures mais peut aussi induire une inflammation des voies respiratoires inférieures et notre étude est basée sur l'étude d'aspiration nasopharyngée seulement. Cependant, une étude a montré que l'échantillonnage des voies aériennes supérieures fournit une représentation fiable du microbiome pulmonaire⁴⁸⁵. De plus, l'utilisation d'échantillons des voies aériennes supérieures est préférable car les méthodes d'échantillonnage des voies aériennes inférieures seraient trop invasives chez les jeunes nourrissons.

L'analyse du virome se heurte à des difficultés supplémentaires qui le rendent moins accessible que le microbiome bactérien c'est pourquoi il existe peu d'études axées sur la caractérisation de l'ensemble du virome respiratoire humain lors d'une IRA. Cela est principalement dû à la grande diversité de type de génome pour les virus : il est difficile de séquencer simultanément les virus à ADN et à ARN, notamment car au moment de l'échantillonnage, des mesures expérimentales pour extraire l'ADN ont été employées sans chercher à préserver ou à récupérer l'ARN²⁸⁸. Ce problème a été contourné dans notre étude puisque nous avons utilisé un protocole optimisé au laboratoire permettant l'amplification simultanée de l'ADN et de l'ARN²⁸⁹. Une autre limite est que l'on n'a probablement pas pu étudier toute la diversité du virome lors du séquençage en raison d'une compétition due à la forte présence de VRS mais aussi des séquences bactériennes et humaines (protocole de déplétion efficace mais pas à 100%). En effet, notre contrôle interne (MS2, *Leviviridae*) n'a été retrouvé que dans 36 échantillons, ce qui indique probablement un manque de profondeur de séquençage pour les 17 échantillons et donc une diversité virale pas totalement représentée. C'est en grande partie pour cette raison que nous n'avons pas fait d'analyse de diversité. Par ailleurs, il est plus intéressant de réaliser une analyse de diversité au niveau de l'espèce, or ici nous nous sommes limités à l'analyse des familles virales.

Une autre difficulté lors de la caractérisation de l'ensemble du virome respiratoire est que l'analyse bio-informatique est beaucoup plus complexe. L'assignation des séquences obtenues repose principalement sur l'alignement de ces séquences avec des virus de référence regroupés dans des bases de données. Or, parmi les séquences alignées sur des virus de référence, il est possible que certaines ne soient pas assignées car l'alignement est limité à l'homologie avec des agents pathogènes bien caractérisés²⁸⁸. Dans notre étude, nous n'avons pas fait d'assemblage de novo et donc il était impossible de découvrir de nouveau virus. En effet, une grande partie des séquences virales n'ont aucune similarité de séquence avec des références connues, elles font parties de ce qu'on appelle la matière noire virale et peuvent inclure de nouveaux virus très divergents qui ne sont pas reconnaissables⁴⁸⁶. Les études actuelles ne présentent donc souvent qu'une vue partielle du virome ce qui est dommage car l'étude de la « matière noire » a permis de faire des découvertes telles que les crAssphages, le bactériophage le plus abondant dans le virome entérique humain⁴⁸⁷. Il est également important de noter que les différentes étapes utilisées lors de l'analyse bio-informatique peuvent contribuer de manière significative à la variabilité des résultats et dans certains cas à des conclusions contradictoires entre les études²⁸⁸. Toutefois, une discussion détaillée sur les aspects liés aux étapes détaillées de l'analyse bio-informatique dépasse le cadre de cette étude.

Enfin, la dernière limite de cette étude est liée à la classification des patients en fonction de la gravité des infections respiratoires. De nombreux scores ont été proposés dans la littérature mais il n'existe pas à l'heure actuelle de score de référence validé pour classer les patients en fonction de la sévérité des infections à VRS (comme indiqué dans l'introduction). Des différences dans les méthodes de classifications de la gravité de l'infection à VRS peuvent conduire à des résultats contradictoires. En effet, le choix des critères de jugement de la sévérité et la définition même de l'IRA légère, modérée ou sévère sont variables selon les pratiques cliniques et les pays⁴⁶. Une méthode de classification universelle serait bénéfique pour étudier les biomarqueurs liés à la gravité de la maladie du VRS mais aussi pour pouvoir comparer les différentes études entre elles.

2.5 Conclusion

Malgré les efforts considérables déployés pour caractériser le virome humain, les connaissances actuelles sur cette question sont encore limitées. L'absence d'une vision globale du virome respiratoire chez l'enfant est, au moins partiellement, due au petit nombre de rapports basés sur de grandes cohortes d'échantillons mais aussi aux défis méthodologiques et informatiques qui doivent encore être relevés. Cette étude a révélé un taux élevé de détection de diverses familles virales et surtout de nombreuses co-infections virales dans les ANP d'enfants présentant des symptômes respiratoires. Parmi ces familles virales, en plus des virus respiratoires connus, ont été retrouvées de nombreuses familles de phages mais aussi des *Anelloviridae*. Aucune association entre une de ces familles virales et la sévérité de l'IRA n'a pu être rapportée. Les pipelines pour l'analyse des données de virome sont encore en cours de développement afin de pouvoir générer ces mêmes analyses au niveau du genre et même de l'espèce. En effet, la grande majorité des séquences virales sont encore mal annotées et présentent peu ou pas d'homologie avec les bases de données de référence. Les années à venir seront sans aucun doute le témoin de nombreuses autres études démontrant les associations entre le virome et diverses maladies grâce à l'amélioration des protocoles existants et au développement de nouvelles approches bio-informatique nécessaire pour diminuer de manière significative la fraction de matière noire virale. Des études sur de plus grandes cohortes ainsi que des études longitudinales sont nécessaires afin de mieux définir le rôle et la composition du virome chez les sujets sains et malades ainsi que les interactions virome-hôte. En outre, une meilleure compréhension pourrait conduire au développement de nouvelles thérapies (telle que la phagothérapie) ou à la découverte de biomarqueurs (tels que la famille des *Anelloviridae* : charge en TTV) dans le but d'améliorer et personnaliser la prise en charge des IRA chez l'enfant.

3 Analyse des *Anelloviridae* dans les voies respiratoires d'enfants atteints d'IRA sans étiologie retrouvée ou à VRS (URTI seulement)

3.1 Introduction

Des études ont mis en évidence une corrélation entre la charge virale de TTV et l'immunosuppression ou encore la gravité des infections respiratoires chez l'enfant^{386,390,391}, ce qui pourrait permettre d'utiliser les TTV comme marqueur pour évaluer le risque d'un rejet de greffe ou de développer des IRA sévères. Le TTMV et le TTMDV ont été moins étudiés, mais la prévalence dans le sang est considérablement inférieure à celle du TTV²⁸⁹. Bien que considérés comme non pathogènes, les *Anelloviridae* pourraient être associés à l'apparition de certains troubles respiratoires dans l'enfance^{372,376,488,489}. Une co-infection entre le TTV et les virus respiratoires courants a été rapportée, mais la composition détaillée des *Anelloviridae*, y compris la caractérisation du TTMV et du TTMDV, a été mal explorée chez les enfants atteints d'infections à virus respiratoire^{490,491}. Dans cette étude, nous avons décrit la composition *en Anelloviridae* dans le virome respiratoire d'enfants de moins de cinq ans hospitalisés pour IRA avec ou sans agents étiologiques identifiés.

Brief Report

Metagenomic Analysis Reveals High Abundance of Torque Teno Mini Virus in the Respiratory Tract of Children with Acute Respiratory Illness

Antonin Bal ^{1,2,3}, Gregory Destras ^{1,2,3}, Marina Sabatier ^{1,2}, Maxime Pichon ^{4,5} , Hadrien Regue ³, Guy Oriol ⁶, Yves Gillet ⁷, Bruno Lina ^{1,2,3} , Karen Brengel-Pesce ⁶, Laurence Josset ^{1,2,3,*}  and Florence Morfin ^{1,2,3,*}

- ¹ Laboratoire de Virologie, Institut des Agents Infectieux, Laboratoire Associé au Centre National de Référence des Virus des Infections Respiratoires, Hospices Civils de Lyon, 69004 Lyon, France; antonin.bal@chu-lyon.fr (A.B.); gregory.destras@chu-lyon.fr (G.D.); marina.sabatier@hotmail.fr (M.S.); bruno.lina@chu-lyon.fr (B.L.)
- ² Univ Lyon, Université Lyon 1, CIRI, Inserm U1111 CNRS UMR5308, Virpath, 69007 Lyon, France
- ³ GenEPII Platform, Institut des Agents Infectieux, Hospices Civils de Lyon, 69004 Lyon, France; hadrien.regue@chu-lyon.fr
- ⁴ Bacteriology Laboratory, Infectious Agents Department, Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, 86021 Poitiers, France; maxime.pichon@chu-poitiers.fr
- ⁵ Inserm U1070 Pharmacology of Antimicrobial Agents and Resistance, University of Poitiers, 86073 Poitiers, France
- ⁶ Laboratoire Commun de Recherche HCL-bioMerieux, Centre Hospitalier Lyon Sud, 69495 Pierre-Bénite, France; guy.oriol@biomerieux.com (G.O.); karen.brengel-pesce@biomerieux.com (K.B.-P.)
- ⁷ Hospices Civils de Lyon, Urgences Pédiatriques, Hôpital Femme Mère Enfant, 69500 Bron, France; yves.gillet@chu-lyon.fr
- * Correspondence: laurence.josset@chu-lyon.fr (L.J.); florence.morfin-sherpa@chu-lyon.fr (F.M.)



Citation: Bal, A.; Destras, G.; Sabatier, M.; Pichon, M.; Regue, H.; Oriol, G.; Gillet, Y.; Lina, B.; Brengel-Pesce, K.; Josset, L.; et al. Metagenomic Analysis Reveals High Abundance of Torque Teno Mini Virus in the Respiratory Tract of Children with Acute Respiratory Illness. *Viruses* **2022**, *14*, 955. <https://doi.org/10.3390/v14050955>

Academic Editors: Leyi Wang and Ganwu Li

Received: 21 March 2022

Accepted: 26 April 2022

Published: 3 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Human *Anelloviridae* is a highly prevalent viral family, including three main genera—*Alphatorquevirus* (Torque teno virus, TTV), *Betatorquevirus* (Torque teno mini virus, TTMV), and *Gammatorquevirus* (Torque teno midi virus, TTMDV). To date, the characterization of *Anelloviridae* in the respiratory tract of children with acute respiratory infection (ARI) has been poorly reported and mainly focused on TTV. We performed a metagenomic analysis of eight respiratory samples collected from children with an ARI of unknown etiology (eight samples tested negative with a multiplex PCR assay, out of the 39 samples initially selected based on negative routine diagnostic testing). A total of 19 pediatric respiratory samples that tested positive for respiratory syncytial virus (RSV, $n = 13$) or influenza virus ($n = 6$) were also sequenced. *Anelloviridae* reads were detected in 16/27 samples, including 6/8 negative samples, 7/13 RSV samples and 3/6 influenza samples. For samples with a detection of at least one *Anelloviridae* genus, TTMV represented 87.1 (66.1–99.2)% of *Anelloviridae* reads, while TTV and TTMDV represented 0.8 (0.0–9.6)% and 0.7 (0.0–7.1)%, respectively ($p < 0.001$). Our findings highlight a high prevalence of TTMV in respiratory samples of children with an ARI of unknown etiology, as well as in samples with an RSV or influenza infection. Larger studies are needed to explore the role of TTMV in childhood respiratory diseases.

Keywords: torque teno virus; torque teno mini virus; *Anelloviridae*; metagenomics; acute respiratory infection; respiratory virus

1. Introduction

Human *Anelloviridae* is a highly prevalent viral family characterized by an important genetic diversity. More than eighty species are grouped into three main genera: *Alphatorquevirus* (Torque teno virus, TTV), *Betatorquevirus* (Torque teno mini virus, TTMV) and *Gammatorquevirus* (Torque teno midi virus, TTMDV) [1,2]. The viral load of TTV in plasma or blood is considered as a surrogate marker of immune competence and might be used to assess the immune status of transplant patients [3,4]. TTMV and TTMDV have been less

studied, but the prevalence in blood is considerably lower than that of TTV [5,6]. *Anelloviridae* has also been detected in almost all parts of the human body, including the respiratory tract, and is recognized as the main component of the human viral flora [5,7,8]. While considered to be non-pathogenic, *Anelloviridae* might be associated with the occurrence of some disorders, including respiratory disorders in childhood [9–13]. Co-infection between TTV and common respiratory viruses have been reported, but the detailed composition of *Anelloviridae*, including the characterization of TTMV and TTMDV, has been poorly explored in children with respiratory virus infections [14,15].

Due to a complex genetic diversity, PCR-based detection of *Anelloviridae* genera might be difficult to optimize, and no diagnostic PCR has been validated in respiratory samples so far [5,8,16]. As untargeted methods, metagenomic next-generation sequencing (mNGS) has become a powerful tool for the characterization of the whole viral communities in clinical samples, and has been used to describe the abundance and/or dynamics of TTV, TTMV and TTMDV [4,6,17,18]. Herein, we aim to describe the *Anelloviridae* composition within the respiratory virome of children under five years presenting an ARI with or without identified etiologic agents.

2. Materials and Methods

2.1. Samples Selection

A retrospective study was conducted on samples received at the virology laboratory at the University Hospital of Lyon, France, between 2010 and 2016. Nasopharyngeal aspirates from hospitalized children under five years old with ARI were selected according to the following criteria: (1) absence of documented infections on two consecutive samples (collected up to two weeks apart) with routine techniques that included bacterial/viral cultures, reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) assay detecting human rhinovirus, and respiratory syncytial (RSV) and influenza viruses (MWS r-gene™ respiratory panel; bioMérieux, Lyon, France); (2) negative results with a large screening multiplex PCR (FilmArray® Respiratory Panel, bioMérieux, Lyon, France). This assay allows to detect the main viral and bacterial respiratory pathogens, including adenovirus, human coronavirus (229E, HKU1, OC43, NL63), human metapneumovirus, human rhinovirus/enterovirus, influenza (A, A/H1, A/H1-2009, A/H3, B), human parainfluenza virus, RSV, bordetella pertussis, chlamydomphila pneumonia and mycoplasma pneumonia.

Nineteen respiratory samples from hospitalized children under five with ARI that tested positive with RSV RT-PCR ($n = 13$) or influenza RT-PCR ($n = 6$) were also sequenced.

2.2. Metagenomic Workflow

A metagenomic workflow including quality controls, evaluated for the detection of a comprehensive panel of DNA and RNA viruses in respiratory samples, was used [19]. Briefly, after sample viral enrichment, total nucleic acid was extracted, randomly amplified, and Illumina libraries were prepared using the Nextera XT DNA Library preparation kit, according to the manufacturer's recommendations (Illumina, San Diego, CA, USA). Libraries were sequenced on Illumina NextSeq500™ platform with mid-output 2×150 bp flowcells. Raw fastq files generated were cleaned with cutadapt (version 1.18). The host reads were then removed using bwa mem (version 0.7.8) alignment to the human genome (GRCh37.p2). Unmapped reads extracted with samtools tool (version 1.3.1) were then mapped to the nr database (non-redundant protein sequences database) (downloaded on 25 September 2018) using Diamond (version 0.9.22). We also explored the prevalence of *Anelloviridae* species, as previously described [6]. Briefly, non-human NGS reads were aligned using BLAST on a manually curated database composed of 56 reference sequences of human *Anelloviridae* (TTV-1 to TTV-29, TTMV-1 to TTMV-12, TTMDV-1 and TTMDV-15).

To correct the difference in sequencing depth between samples, the number of reads were normalized in reads per million mapped reads (RPM). To reduce false positive results, only viruses with a count of >1 RPM were considered.

2.3. Statistical Analysis

Statistical analyses were conducted using R software, version 4.0.5 (R Foundation for Statistical Computing). Continuous variables are presented as the median with interquartile range (IQR) and compared using non-parametric Kruskal–Wallis or Mann–Whitney tests. Differences are considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Study Population

Between 2010 and 2016, 39 hospitalized patients with ARI were tested negative on two successive samples with routine diagnostic techniques. Among them, eight remained negative after testing with a large multiplex PCR assay and were analyzed in mNGS. The median (IQR) age was 12.0 (6.3–22.5) months; three patients had comorbidities, including spinal muscular atrophy, sickle cell anemia and cardiac congenital disease. Two patients presented severe respiratory distress that required admission in the intensive care unit (ICU).

Nineteen respiratory samples from hospitalized children with ARI that tested positive for RSV ($n = 13$) or influenza ($n = 6$) were sequenced. The median age was 2.3 (1.3–2.8) months and 1.3 (1.0–4.1) months for RSV and influenza patients, respectively; no ICU admission nor comorbidities were noticed.

3.2. Composition of Metagenomic Sequences

Libraries were sequenced to a median of 11,880,612 (9,085,799–15,865,360) reads, passing quality filters. Viral reads represented 0.7 (0.2–1.8)% of the total reads generated from samples that tested negative (vs. 1.2 (0.3–4.2)% and 0.3 (0.03–0.7)% for RSV and influenza samples, respectively, $p = 0.63$). Of note, viral reads mapping to RSV or influenza were detected in all samples of the RSV or influenza groups, respectively.

Viral contamination represented 0.04% of total reads detected in the no-template control and mainly (97.5%) derived from bacteriophages. General metagenomic data are summarized in Table 1.

Table 1. Composition of metagenomic reads generated from samples that tested negative and samples that tested positive for RSV or influenza.

Group	Sample ID	Total Number of Reads	Number of Reads for PCR-Positive Virus	% Human	% Viruses	% Bacteria
Negative samples ($n = 8$)	Ab1_S1	13,242,872	NA	68.1	0.2	39.8
	Ab2_S2	21,124,748	NA	53.7	1.0	36.1
	Ab3_S3	18,613,428	NA	88.5	2.7	32.7
	Ab4_S4	5,729,468	NA	40.9	2.1	38.3
	Ab5_S5	6,506,898	NA	74.6	0.4	38.6
	Ab6_S18	9,719,338	NA	58.1	0.2	36.8
	Ab8_S20	12,453,484	NA	58.9	0.2	50.2
	Ab9_S21	5,124,554	NA	42.2	1.7	42.1
	Ab12_S24	10,533,108	232,827	67.6	1.6	35.2
RSV samples ($n = 13$)	V10	4,547,410	102	87.0	0.0	3.7
	V32	14,911,096	57,606	88.5	0.4	2.1
	V53	10,826,666	361,365	88.8	3.4	1.5
	V89_1	6,622,864	58,284	87.5	0.9	2.2
	V47	11,747,124	182,776	85.9	1.6	3.1
	V22_1	16,819,624	77	87.6	0.0	2.8
	V124	19,598,588	540,934	84.3	2.8	3.0
	V121	14,490,590	62,279	87.9	0.4	2.1
	V24	8,452,260	81,253	8.6	24.0	7.0
	V85_1	19,138,760	892	83.8	0.0	4.2
	V114	12,516,284	1,673,602	52.0	13.6	9.7
	V21	16,928,282	406,594	64.9	6.6	6.0
	V126	7,910,142	1125	87.2	0.01	3.6
Influenza samples ($n = 6$)	V23	18,131,472	103	90.7	0.001	0.6
	V26_2	13,672,726	53,556	82.7	0.5	4.8
	V34_2	11,880,612	8058	90.0	0.1	1.4
	V113_2	10,944,276	78,193	49.6	0.7	16.0
	V115_1	11,403,046	2108	3.0	59.9	6.7
NTC	NTC	7,210,744	NA	8.5	0.04	46.5

NTC: No-template control, RSV: respiratory syncytial virus, NA: not applicable.

3.3. Anelloviridae Abundance and Composition within the Respiratory Virome

Among the 27 patients included in the present study, *Anelloviridae* reads were detected in 16/27 (59.3%) samples, including 6/8 (75%) negative samples, 7/13 (53.8%) RSV samples and 3/6 (50%) influenza samples (Figure 1). The median abundances of *Anelloviridae* reads were 48.2 (24.6–6066.0) RPM for influenza samples, 51.4 (27.0–370.3) RPM for RSV samples and 1131.8 (181.6–2761.7) RPM for negative samples ($p = 0.4$).

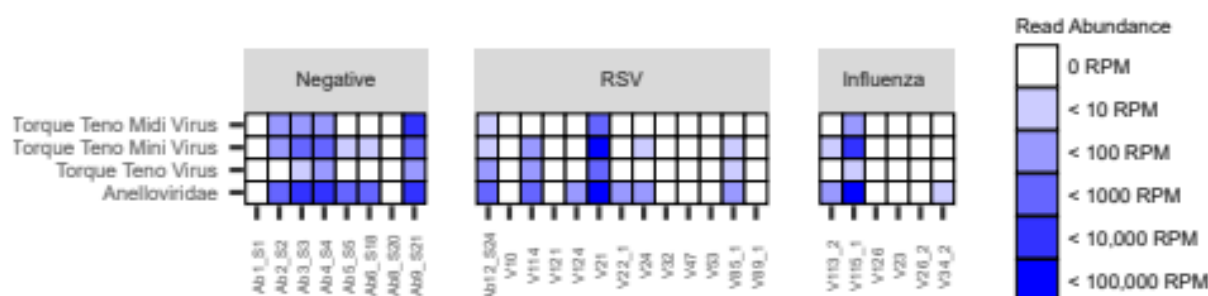


Figure 1. Abundance of *Anelloviridae*, TTV, TTMV and TTMDV in negative, RSV and influenza samples. *Anelloviridae* reads include TTV, TTMV, TTMDV reads, as well as reads from unclassified *Anelloviridae*. To correct the difference of sequencing depth between samples, the number of reads were normalized in reads per million mapped reads (RPM). Only viruses with a count of >1 RPM were considered.

To investigate the composition of *Anelloviridae*, relative abundances of TTMV, TTV and TTMDV were computed according to the normalized number of reads identified as genus level. For samples with a detection of specific reads mapping to at least one *Anelloviridae* genus ($n = 13$), TTMV represented 87.1 (66.1–99.2)% of *Anelloviridae* reads, while TTV and TTMDV represented 0.8 (0.0–9.6)% and 0.7 (0.0–7.1)%, respectively ($p < 0.001$; Figure 2). No significant differences were observed between the relative abundance of TTV vs. TTMDV ($p = 0.57$). Of note, for 2/13 samples, the main genus detected was not TTMV (TTMDV for one negative sample and TTV for one RSV sample, Figure 2). No significant differences regarding *Anelloviridae* genus abundances were noticed between negative, RSV and influenza samples.

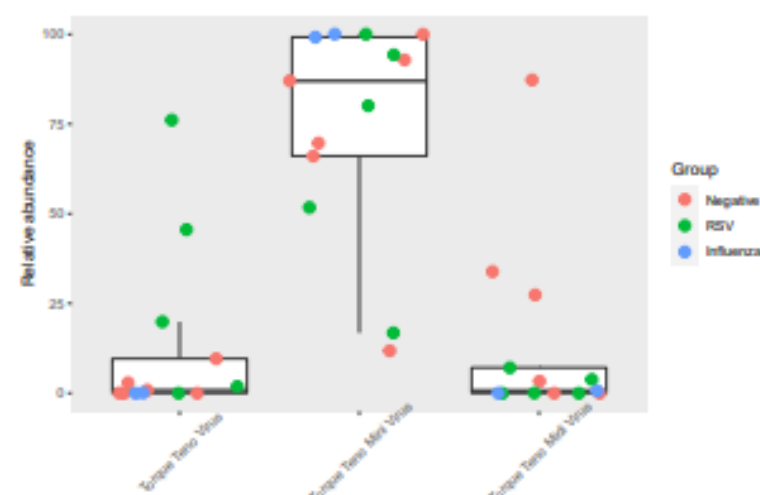


Figure 2. Relative abundance of *Anelloviridae* genera among negative, RSV and influenza samples. Relative abundances of TTMV, TTV and TTMDV were computed according to the normalized number of reads identified as genus level. The three groups (negative, RSV and influenza) are represented by dots of different colors.

At the species level, a high inter-individual variability was noticed with multiple species detection for most individuals. TTMV-10 and TTMV-5 were the two most frequent species detected in the negative group, while the most prevalent species in the RSV group were TTMV-10, followed by TTMV-11, TTMV-6, and TTMV-5. Regarding the two patients with a detection of *Anelloviridae* species in the influenza group, TTMV-10, TTMV-5, TTMV-4, TTMV-3 and TTMV-1 were co-detected (Figure 3).

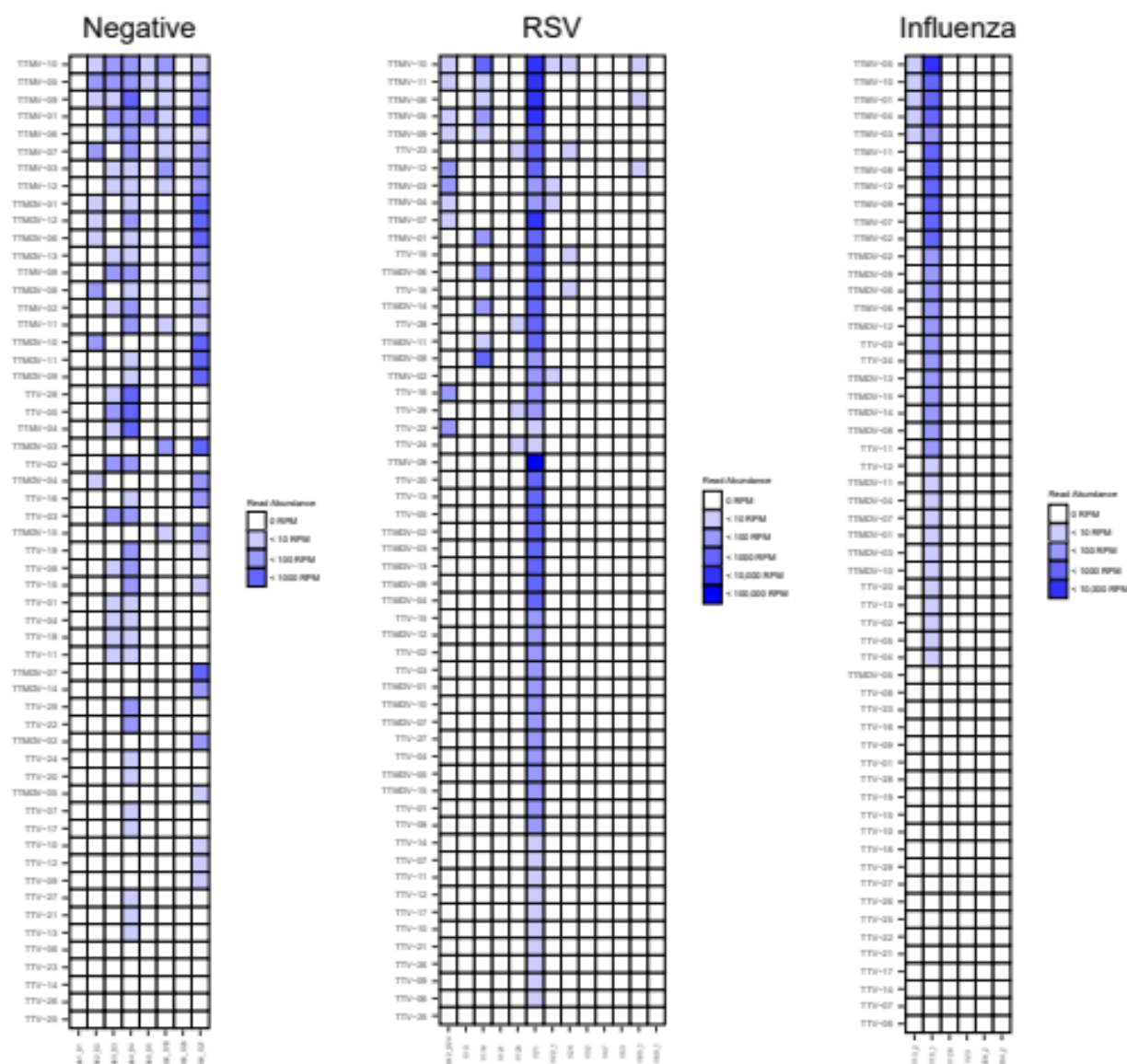


Figure 3. Abundance of *Anelloviridae* species in negative, RSV and Influenza samples. Species are ranked by frequency of detection in each group. To correct difference of sequencing depth between samples, number of reads were normalized in read per million mapped read (RPM). Only viruses with a count >1 RPM were considered.

4. Discussion

In this present study, *Anelloviridae* was detected in about 60% of respiratory samples of children under five, highlighting a high inter-individual variability in *Anelloviridae* detection, as previously reported in blood or plasma samples [6,8,14]. Furthermore, we

found a high abundance of TTMV in samples associated with or without viral pathogen detection (RSV or influenza). Although considered as commensal virome, *Anelloviridae* might contribute to respiratory diseases by activating the production of inflammatory cytokines [11,13]. TTMV has already been identified in several pathogenic settings, including empyema, encephalitis and periodontitis, suggesting a possible association of TTMV infection with inflammation [10,20,21]. In addition, in vitro replication of TTMV in alveolar epithelial cells has been demonstrated [10] and a recent mNGS study found that the upper respiratory virome composition of children with pneumonia was mainly represented by TTMV [12].

In contrast, Wang et al., showed that the majority of *Anelloviridae* reads mapped to TTV in children with severe ARI as well as in the control group constituted of 15 children without respiratory symptoms [9]. In addition, no differences in TTMV detection were noticed in respiratory samples of febrile pediatric patients compared to afebrile controls [22]. The differences in the *Anelloviridae* composition within the respiratory tract might be explained by clinical features, including the level of immunosuppression and the presence of viral co-infections, as well as by age, sex, geographical, or environmental factors which may influence the virome composition [23]. Importantly, we used the same mNGS methods as a previous study performed on the plasma samples of autologous stem cell transplant patients where TTV represented the most abundant genus (91.7% of *Anelloviridae* reads), while TTMDV and TTMV represented 6.4% and 1.9%, respectively [6].

As TTMV were found in all groups herein and in line with the limited number of patients included, we could not draw a conclusion regarding the respiratory pathogenicity of TTMV. This needs to be investigated in larger pediatric cohorts, including a healthy control group. The impact of TTMV levels, TTMV species diversity and TTMV co-infection (found in about 50% of influenza and RSV samples herein) on disease severity also need to be explored. Studies focusing on TTV found that a higher level or a co-infection with common respiratory viruses were associated with a more severe disease [14,24].

Overall, the present study emphasizes the high prevalence of *Anelloviridae* within the respiratory tract of children with ARI, and that the *Anelloviridae* composition is mainly represented by TTMV in the presence, or not, of common respiratory viruses. The characterization of whole viral communities is crucial for understanding the complex role of the human virome in respiratory diseases.

Author Contributions: A.B., G.D., L.J., F.M. and K.B.-P. conceived the study. A.B., M.S., G.D. and M.P., performed the sample preparations and sequencing. L.J., H.R. and G.O., performed bioinformatics analysis. L.J. is the guarantor for the NGS data. Y.G., B.L. and F.M. are the guarantors for the clinical data and sample collection. A.B. and G.D. were the main writers of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by a metagenomic grant received in 2014 from the French foundation of innovation in infectious diseases (FINOVI, fondation innovation en infectiologie). This work was also supported by the LABEX ECOFECT (ANR-11-LABX-0048) of Université de Lyon, within the program “Investissements d’Avenir” (ANR-11-IDEX-0007), operated by the French National Research Agency (ANR).

Institutional Review Board Statement: This monocentric retrospective study received approval from HCL board of the French data protection authority (Commission Nationale de l’Informatique et des Libertés) and was registered with the national data protection agency, number 17-024.

Informed Consent Statement: During their hospitalization in the HCL, patients were made aware that their de-identified data, including clinical samples, may be used for research purposes, and they could opt out if they objected to the use of their data.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available upon request from the authors.

Acknowledgments: We thank Audrey Guichard, Gwendolyne Burfin, Delphine Falcon and Cecile Darley for their technical assistance.

Conflicts of Interest: K.B.-P. and G.O. are employees of bioMérieux. A.B. has served as a consultant to bioMérieux, and received a research grant from bioMérieux. The other authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Biagini, P. Classification of TTV and related viruses (anelloriviruses). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2009**, *331*, 21–33. [\[CrossRef\]](#)
2. Anelloviridae—ssDNA Viruses (2011)—ssDNA Viruses (2011)—ICTV. Available online: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/ssdna-viruses-2011/w/ssdna_viruses/139/anelloviridae (accessed on 8 March 2022).
3. Jaksch, P.; Kundi, M.; Görzer, I.; Muraközy, G.; Lambers, C.; Benazzo, A.; Hoetenecker, K.; Klepetko, W.; Puchhammer-Stöckl, E. Torque teno virus as a novel biomarker targeting the efficacy of immunosuppression after lung transplantation. *J. Infect. Dis.* **2018**, *218*, 1922–1928. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. De Vlaminck, I.; Khush, K.K.; Strehl, C.; Kohli, B.; Luikart, H.; Neff, N.F.; Okamoto, J.; Snyder, T.M.; Cornfield, D.N.; Nicolls, M.R.; et al. Temporal response of the human virome to immunosuppression and antiviral therapy. *Cell* **2013**, *155*, 1178–1187. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Spandole, S.; Cimponeriu, D.; Berca, L.M.; Mihăescu, G. Human anelloviruses: An update of molecular, epidemiological and clinical aspects. *Arch. Virol.* **2015**, *160*, 893–908. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Bal, A.; Sarkozy, C.; Josset, L.; Cheynet, V.; Oriol, G.; Becker, J.; Vilchez, G.; Sesques, P.; Mallet, F.; Pachot, A.; et al. Metagenomic next-generation sequencing reveals individual composition and dynamics of anelloviruses during autologous stem cell transplant recipient management. *Viruses* **2018**, *10*, 633. [\[CrossRef\]](#)
7. Popgeorgiev, N.; Temmam, S.; Raoult, D.; Desnues, C. Describing the silent human virome with an emphasis on giant viruses. *Intervirology* **2013**, *56*, 395–412. [\[CrossRef\]](#)
8. Arze, C.A.; Springer, S.; Dudas, G.; Patel, S.; Bhattacharyya, A.; Swaminathan, H.; Brugnara, C.; Delagrave, S.; Ong, T.; Kahvejian, A.; et al. Global genome analysis reveals a vast and dynamic anellovirus landscape within the human virome. *Cell Host Microbe* **2021**, *29*, 1305–1315.e6. [\[CrossRef\]](#)
9. Wang, Y.; Zhu, N.; Li, Y.; Lu, R.; Wang, H.; Liu, G.; Zou, X.; Xie, Z.; Tan, W. Metagenomic analysis of viral genetic diversity in respiratory samples from children with severe acute respiratory infection in China. *Clin. Microbiol. Infect.* **2016**, *22*, 458.e1–458.e9. [\[CrossRef\]](#)
10. Galmès, J.; Li, Y.; Rajoharison, A.; Ren, L.; Dollet, S.; Richard, N.; Vernet, G.; Javouhey, E.; Wang, J.; Telles, J.-N.; et al. Potential implication of new torque teno mini viruses in parapneumonic empyema in children. *Eur. Respir. J.* **2013**, *42*, 470–479. [\[CrossRef\]](#)
11. Freer, G.; Maggi, F.; Pifferi, M.; Di Cicco, M.E.; Peroni, D.G.; Pistello, M. The virome and its major component, anellovirus, a convoluted system molding human immune defenses and possibly affecting the development of asthma and respiratory diseases in childhood. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 686. [\[CrossRef\]](#)
12. Espinoza, J.A.; Moreno-Valencia, Y.; Coronel-Tellez, R.H.; Castillejos-López, M.; Hernández, A.; Domínguez, A.; Miliari-García, A.; Barbachano-Guerrero, A.; Perez-Padilla, R.; Alejandro-García, A.; et al. Virome and bacteriome characterization of children with pneumonia and asthma in Mexico City during winter seasons 2014 and 2015. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0192878. [\[CrossRef\]](#)
13. Dodi, G.; Attanasi, M.; Di Filippo, P.; Di Pillo, S.; Chiarelli, F. Virome in the lungs: The role of anelloviruses in childhood respiratory diseases. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1357. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Del Rosal, T.; García-García, M.L.; Casas, I.; Alcolea, S.; Iglesias-Caballero, M.; Pozo, F.; Rodrigo-Muñoz, J.M.; del Pozo, V.; Calvo, C. Torque teno virus in nasopharyngeal aspirate of children with respiratory infections. *Res. Square* **2022**, preprint. [\[CrossRef\]](#)
15. Prasetyo, A.A.; Desyardi, M.N.; Tanamas, J.; Suradi; Reviono; Harsini; Kageyama, S.; Chikumi, H.; Shimizu, E. Respiratory viruses and torque teno virus in adults with acute respiratory infections. *Intervirology* **2015**, *58*, 57–68. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Leijonhufvud, G.; Bajalan, A.; Soratto, T.A.T.; Gustafsson, B.; Bogdanovic, G.; Bjerkner, A.; Allander, T.; Ljungman, G.; Andersson, B. Better detection of Torque teno virus in children with leukemia by metagenomic sequencing than by quantitative PCR. *J. Med. Virol.* **2022**, *94*, 634–641. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Mokili, J.L.; Rohwer, F.; Dutilh, B.E. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Curr. Opin. Virol.* **2012**, *2*, 63–77. [\[CrossRef\]](#)
18. Taboada, B.; Morán, P.; Serrano-Vázquez, A.; Isa, P.; Rojas-Velázquez, L.; Pérez-Juárez, H.; López, S.; Torres, J.; Ximenez, C.; Arias, C.F. The gut virome of healthy children during the first year of life is diverse and dynamic. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0240958. [\[CrossRef\]](#)
19. Bal, A.; Pichon, M.; Picard, C.; Casalegno, J.S.; Valette, M.; Schuffenecker, I.; Billard, L.; Vallet, S.; Vilchez, G.; Cheynet, V.; et al. Quality control implementation for universal characterization of DNA and RNA viruses in clinical respiratory samples using single metagenomic next-generation sequencing workflow. *BMC Infect. Dis.* **2018**, *18*, 537. [\[CrossRef\]](#)
20. Eibach, D.; Hogan, B.; Sarpong, N.; Winter, D.; Struck, N.S.; Adu-Sarkodie, Y.; Owusu-Dabo, E.; Schmidt-Chanasit, J.; May, J.; Cadar, D. Viral metagenomics revealed novel betatorquevirus species in pediatric inpatients with encephalitis/meningoencephalitis from Ghana. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 2360. [\[CrossRef\]](#)
21. Zhang, Y.; Li, F.; Shan, T.-L.; Deng, X.; Delwart, E.; Feng, X.-P. A novel species of torque teno mini virus (TTMV) in gingival tissue from chronic periodontitis patients. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 26739. [\[CrossRef\]](#)

22. TeKippe, E.M.; Wylie, K.M.; Deych, E.; Sodergren, E.; Weinstock, G.; Storch, G.A. Increased prevalence of anellovirus in pediatric patients with fever. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e50937. [[CrossRef](#)]
23. Unger, S.A.; Bogaert, D. The respiratory microbiome and respiratory infections. *J. Infect.* **2017**, *74*, S84–S88. [[CrossRef](#)]
24. Maggi, F.; Pifferi, M.; Fornai, C.; Andreoli, E.; Tempestini, E.; Vatteroni, M.; Presciuttini, S.; Marchi, S.; Pietrobelli, A.; Boner, A.; et al. TT Virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: Relations to viremia and disease severity. *J. Virol.* **2003**, *77*, 2418–2425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4 Discussion - Conclusion Générale Virome

De réelles avancées en matière de diagnostic et de caractérisation de virus connus et inconnus ont été réalisées grâce aux nouvelles techniques de séquençage NGS. Cependant, il est important de noter que ces techniques font face à plusieurs limites. De ce fait, la mise en place de technique visant à explorer le virome nécessite la résolution d'un certain nombre d'obstacles techniques et analytiques. L'ensemble des étapes requises à la préparation des échantillons à séquencer (prétraitement des échantillons, extraction, amplification) ainsi que l'analyse bio-informatique constituent des sources potentielles d'introduction de biais^{425,430,492–494}.

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons montré que les deux plateformes d'extraction automatisées couramment utilisées dans les laboratoires de diagnostic (eMAG de bioMérieux et le MagNA Pure 24 de Roche) permet d'extraire et donc de séquencer une plus grande proportion de virus ADN et ARN par rapport au kit d'extraction manuelle QIAamp Viral RNA Mini Kit de Qiagen. Nous avons également montré que la méthode d'extraction pouvait avoir un impact variable sur la contamination inter-échantillons et la contamination par le kitome. En effet, une contamination inter-échantillons plus importante était observée avec l'extracteur automatisé MP24 et une contamination par le kitome était plus marquée avec le kit manuel de Qiagen. Ces deux types de contamination constituent une préoccupation majeure et doivent être évalués avec précision car elles peuvent conduire à des erreurs d'interprétations comme cela a été le cas avec l'identification d'un chlorovirus associé à la survenue de troubles cognitifs qui faisait en fait partie du kitome de kits commerciaux^{495,496}. Bien qu'elles représentent une avancée significative pour l'étude du virome, il est évident que les méthodes de métagénomique couramment utilisées n'ont pas encore permis de détecter toute la gamme des virus présents dans les échantillons cliniques. Nos connaissances sur la composition du virome reste incomplète et une amélioration des protocoles et des analyses bio-informatiques sont encore nécessaires pour limiter au maximum l'introduction de biais.

Dans la seconde et la dernière partie de ce chapitre, nous avons observé la composition du virome respiratoire globale chez les enfants de moins de 7 mois de la cohorte ViBRaFlu, puis nous nous sommes focalisés sur la famille des *Anelloviridae* dans cette même cohorte ainsi que sur un groupe d'enfants de moins de 5 ans hospitalisés pour IRA avec ou sans agents étiologiques identifiés. Les familles virales retrouvées correspondent à celles décrites dans la

littérature. A noter que le virome des voies respiratoires présente une faible diversité notamment à la naissance et que cette diversité augmente progressivement en fonction de l'environnement et des épisodes infectieux^{270,376,497}. L'autre aspect important est qu'il ne semble pas y avoir de virome partagé, il existe une grande variabilité interindividuelle^{374,376,497}. En ce qui concerne les *Anelloviridae*, ils étaient retrouvés dans 66% des échantillons de la cohorte ViBRaFlu et dans 59,4% des échantillons de la seconde étude. Ces pourcentages sont cohérents avec les données déjà décrites dans la littérature puisque les *Anelloviridae* sont considérés comme la famille de virus la plus répandue au sein du virome respiratoire^{291,374,376,459,498}. Bien que les *Anelloviridae* soient considérés comme non pathogènes, ils pourraient être associés à l'apparition de troubles respiratoires chez les enfants en activant la production de cytokines inflammatoires^{372,376,488,489}. La composition détaillée en *Anelloviridae* a été peu étudiée chez les enfants souffrant d'infections virales respiratoires⁴⁹⁹. Dans nos deux études, le genre le plus retrouvé était le *TTMV*. En raison du nombre limité de patients inclus dans les 2 études, nous n'avons pas pu tirer de conclusion quant à la pathogénicité respiratoire des *TTMV* hormis pour 3 espèces dans l'étude Vibraflu qui étaient associés à la sévérité (*TTMV 3*, *TTMV 6* et *TTMV 9* ; p-value respectives à 0,0054 ; 0,0486 et 0,0431). Au contraire les *TTMV 10* et *5* étaient les plus prévalents chez les patients hospitalisés pour ARI d'étiologie inconnue, sans lien avec la sévérité. Le lien entre la composition en *Anelloviridae* et la sévérité doit être plus précisément étudié dans des cohortes pédiatriques de plus grande taille, et si possible avec un groupe de patients sains. Le *TTMV* a déjà été identifié dans plusieurs types d'infections telles que l'empyème, l'encéphalite, la parodontite et la pneumonie, ce qui suggère une association entre la présence de *TTMV* et l'inflammation^{489,500–502}. Dans l'ensemble, les 2 études mettent en évidence la forte prévalence des *Anelloviridae*, et en particulier des *TTMV*, dans les voies respiratoires des enfants atteints d'IRA, et le fait que la composition des *Anelloviridae* est très variée d'un enfant à l'autre.

Enfin, dans la seconde partie du chapitre virome, nous avons cherché s'il y avait une association entre la sévérité de la bronchiolite et la composition du virome respiratoire. Bien que certaines familles étaient plus abondantes dans le groupe LRTI ou dans le groupe URTI, aucune différence significative n'a été relevée. Les mêmes résultats ont été observés en regardant les groupes avec et sans nécessité de supplémentation en O₂. Ceci était assez

étonnant puisque des études ont auparavant mis en évidence qu'une dysbiose du virome pourrait être impliquée dans les formes sévères d'IRA^{390,438}. On sait peu de choses sur le rôle du virome respiratoire dans l'homéostasie et la santé. Il a été suggéré que le virome pourrait moduler le système immunitaire ce qui aurait un impact sur le développement de l'asthme et des maladies respiratoires chez l'enfant⁴⁸⁸. Une récente étude a classé les patients de sa cohorte en fonction des profils majoritaires de leur virome (profil dominant eucaryote, profil dominant *Anelloviridae* et un profil dominant procaryote), et a mis évidence une libération élevée de cytokines associée à une augmentation de profil de virome procaryote et une diminution des profils de virome d'eucaryotes et d'anellovirus⁵⁰³. Dans cette même étude, la présence de *Picornaviridae* était associée à de faibles réponses à l'interféron⁵⁰³. Une autre étude sur une cohorte d'enfants asthmatiques a montré que les patients en bonne santé présentaient un virome plus riche et plus diversifié en phages alors que les enfants asthmatiques présentaient une augmentation de la diversité des virus eucaryotes et une réduction du nombre de phages⁴⁹⁸.

En conclusion, il existe des parallèles étroits entre le virome respiratoire et les réponses immunitaires potentielles de l'hôte. L'élucidation de ces interactions offre de nouvelles possibilités d'intervention pour la prévention des maladies.

Chapitre 3 : Caractérisation du bactériome respiratoire chez l'enfant

1 Introduction

Les infections des voies respiratoires inférieures chez les enfants sont fréquentes et, bien que souvent bénignes, elles constituent une cause majeure de mortalité et d'hospitalisation. C'est pourquoi la capacité à différencier de manière rapide et efficace les cas d'infection légère et d'infection grave pourrait être importante pour guider la stratégie de traitement et améliorer la prise en charge des patients afin d'obtenir de meilleurs résultats face à l'infection⁴³⁹.

Récemment, le microbiome respiratoire a été associé à la fois à la susceptibilité et à la gravité des infections des voies respiratoires inférieures. Différentes études ont d'ailleurs démontré l'existence d'associations entre la composition du microbiome respiratoire bactérien et la gravité des infections respiratoires chroniques dans des cohortes d'enfants asthmatiques, en bonne santé ou malades, et atteints de bronchiolite^{318,321,329,504,505}. En effet, en combinant les données relatives aux virus infectants, au microbiome respiratoire et à l'hôte, il a été signalé que les enfants atteints d'infection respiratoire à répétition peuvent être différenciés des témoins sains³¹⁸. De plus, des profils de microbiomes bactériens ont été associés à la gravité de certaines infections respiratoires d'origine virale^{290,310,319,321,333}.

L'objectif de cette partie a été dans un premier temps de caractériser le microbiome respiratoire bactérien des patients de la cohorte VibraFlu atteints d'infections légères et sévères. Ensuite, nous avons combiné des données sur le microbiome bactérien, les données sur les infections virales et les paramètres cliniques des patients pour trouver des associations avec la sévérité des IRA.

2 Matériels et Méthodes

2.1 Population étudiée

L'ensemble des échantillons de la cohorte ViBraFlu ont été séquencés pour cet axe d'étude.

2.2 Séquençage bactériome

Nous avons utilisé un protocole de séquençage ciblé du gène de l'ARNr 16S développé dans notre laboratoire²⁸⁴.

Les échantillons ont été extraits à l'aide de la plateforme NucliSENS EasyMAG (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Le protocole spécifique B 2.0.1 a été sélectionné. A la fin de

l'extraction, une précipitation à l'éthanol (2 h à - 80 °C) a été réalisée. Après dosage, 5 ng d'ADN génomique de chaque échantillon ont été utilisés pour amplifier les régions V1-V3 du gène de l'ARNr 16S (510 pb) à l'aide d'amorces maison²⁸⁴ et de 25 cycles de PCR (Failsafe, Epicentre). Les amplicons 16S ont ensuite été purifiés à l'aide de billes 0,9X AMPure XP (Beckman Coulter) en suivant les instructions du fabricant. Une fois purifiés, les indexs Nextera (Nextera XT adaptors, Illumina) ont été incorporés en effectuant 10 cycles de PCR (Failsafe, Epicentre). Les librairies ont ensuite été purifiées à l'aide de billes 0,7X AMPure XP (Beckman Coulter) selon les recommandations du fabricant puis quantifiées et multiplexées en utilisant des rapports équimolaires pour chaque échantillon. Ce pool final a été chargé sur un séquenceur MiSeq à 8 pM avec un contrôle PhiX de 5 % et séquencées à l'aide d'amorces personnalisées pour éliminer les séquences d'amorces 16S V1-V3²⁸⁴. Chaque échantillon a été séquencé à une profondeur de lecture moyenne de 150K (2x300bp, paired-end).

2.3 Analyse bio-informatique et statistique

L'ensemble des analyses des données bactériome a été réalisé avec l'outil Qiime2 (version 2021.4). Les reads brutes ont été trimmées avec cutadapt : les indexs ont été retirés avec un overlap (chevauchement) de 3 bases et un phred-score de 20 a été retenu afin de conserver les séquences de meilleures qualités. La réduction des bruits de fond a été faite avec dada2 (package R) pour générer des Amplicon Sequence Variant (ASV). Une décontamination de chaque échantillon a été effectuée avec decontam (Package R) en utilisant les deux méthodes suivantes :

- Méthode de la prévalence : la prévalence (présence/absence dans les échantillons) de chaque OTU dans les échantillons est comparée à la prévalence dans les contrôles négatifs afin d'identifier les contaminants.
- Méthode de la quantité relative ou « fréquence » : ici, la distribution de la quantité relative de chaque OTU en fonction de la concentration des librairies (ADN dosé en qubit) est utilisée pour identifier les contaminants.

Les tables de contage décontaminées ont été ensuite réalisées en clustérisant les ASV décontaminées à 99%.

Les tables d'OTUs ont toutes été normalisées par la méthode TMM (trimmed mean of M values)⁵⁰⁶ avec edgeR (version 3.32.1).

Les séquences représentatives des OTUs obtenus ont été alignées avec mafft. Les zones non informatives ont été masquées et un arbre phylogénétique a été généré et rooté par fasttree. Les indices d'alpha-diversité et de beta-diversité ont été calculés pour la table d'OTUs normalisées obtenus en s'appuyant sur l'arbre phylogénétique pour les indices concernés.

α-diversité

Il existe plusieurs indices pour estimer la diversité à l'intérieur d'un échantillon. L'indice le plus brut utilisé est le nombre d'OTUs différents et présents dans un échantillon : « observed OTU » (mesure qualitative de la richesse communautaire). L'indice Chao1 est très semblable à l'indice « observed OTU », mais est pondéré sur les taxons rares dans l'échantillon. L'indice de Shannon prend en compte le nombre d'espèces d'un milieu et la répartition des individus au sein de ces espèces (mesure quantitative de la richesse communautaire). Enfin, l'indice de Simpson mesure la probabilité que deux individus sélectionnés au hasard appartiennent à la même espèce dans un échantillon.

Le plot d'alpha-rarefaction représentant les OTUs observés a été réalisé en 10 itérations avec des pas de 100 reads jusqu'à une profondeur maximale de 10 000 reads.

La recherche de corrélation a été faite par une méthode de Spearman.

β-diversité

La β-diversité est une mesure de la diversité qui permet d'estimer la différence de diversité INTER-échantillons. Ces indices peuvent être séparés en deux catégories :

- les indices de similarité binaire qui reposent sur des données de présence/absence des taxons. C'est le cas de l'indice de Jaccard.
- les indices de diversités quantitatifs, basés sur les abondances relatives de chaque taxon. C'est le cas de l'indice de Bray-Curtis.

Les tests de significativité de comparaison de diversité beta ont été faits par méthode permanova.

Pour les analyses compositionnelles, les OTUs ont été assignés taxonomiquement grâce à la classification en se basant sur la zone 27F-519R du gène 16S des séquences de la base de données greengenes du 13-8-99. Ces analyses ont été effectuées aux niveaux taxonomiques suivants : genre et espèce.

La représentation des groupes taxonomiques a été faite sous forme de heatmap et la recherche de taxons significativement associés à une métadonnée a été faite par méthode Ancom (Analysis of composition of microbiomes). Cette méthode compare le rapport logarithmique de l'abondance de chaque taxon à l'abondance de tous les taxons restants deux à deux⁵⁰⁷.

3 Résultats

3.1 Caractéristiques Cliniques et démographiques de la cohorte

En raison d'un problème de contaminations lors des extractions des acides nucléiques de certains batchs d'échantillons, seul le premier run a pu être analysé ici. A l'époque le financement limité ne permettait pas de refaire les extractions, PCR et le séquençage pour les échantillons contaminés.

Parmi les 79 patients inclus dans le run non contaminé, 64,6% (n=51) ont été classés comme souffrant d'une infection des voies respiratoires basses LRTI et 35,4% (n=28) ont été classés comme souffrant d'une infection des voies respiratoires hautes URTI. Les prélèvements étaient tous des ANP.

En ce qui concerne les virus infectants, 12,6% des patients (n=10) étaient infectés par le virus de la grippe A, 64,6% (n=51) étaient infectés par le VRS, 12,6% (n=10) étaient infectés par le MPV, 6,3% (n=5) étaient infectés par un *Picornaviridae*. Dans 11,4% (n=9) des prélèvements, aucun de ces virus respiratoires n'avaient été détecté. Par ailleurs, dans 7,6% (n=6) des coinfections virales ont été détectées, notamment 2 à VRS/*Picornaviridae*, 2 à VRS/Grippe A, 1 à VRS/MPV et 1 à *Picornaviridae*/MPV.

Les caractéristiques cliniques et démographiques des patients du run non contaminé sont résumées dans le **tableur 15**.

Tableau 15 Caractéristiques cliniques et démographiques des 79 patients inclus pour l'étude du bactériome respiratoire.

	URTI (n=28)	LRTI (n=51)
Sexe : masculin	14 (50%)	32 (62,7%)
Âge médian, mois (min-max)	2,2 (0,5-41,6)	1,9 (0,3-44,2)
Prématurité	1 (3,6%)	5 (9,8%)
Mode de vie (Domicile-Crèche)	Domicile : 22 (78,6%)	Domicile : 44 (86,3%)
Tabagisme passif	14 (50%) – Na : 3 (10,7%)	20 (39,2%) – Na : 4 (7,8%)
Présence de Fratrie	20 (71,4%)	45 (88,2%)
Type d'alimentation	Allaitement maternel : 6 (21,4%) Allaitement artificiel : 9 (32,1%) Mixte : 5 (17,9%) Diversification : 8 (28,6%)	Allaitement maternel : 17 (33,3%) Allaitement artificiel : 13 (25,5%) Mixte : 12 (23,5%) Diversification : 9 (17,7%)
Présence d'un support ventilatoire	1 (3,6%)	34 (66,7%)
Supplémentation en Oxygène	1 (3,6%)	34 (66,7%)
Durée d'hospitalisation médian (min-max)	1 (1-5)	3 (0-11)
Virus infectants	Grippe: 7 (25%) VRS: 9 (32,1%) MPV: 3 (10,7%) Pico: 2 (7,1%) Na: 7 (25%) Coinfection: 0	Grippe: 3 (5,9%) VRS: 42 (82,4%) MPV: 7 (13,7%) Pico: 3 (5,9%) Na: 2 (3,9%) Coinfection: 6 (11,8%)

Abbreviations : URTI : Upper Respiratory Tract Infection ; LRTI : Lower Respiratory Tract Infection ; VRS : Virus Respiratoire Syncytial ; MPV : MétaPneumoVirus ; Pico : Picornaviridae ; Na : Données non disponibles.

3.2 Analyse descriptive des données de bactériome

3.2.1 Analyse compositionnelle au niveau taxonomique : Genre

Dans les 79 échantillons de la cohorte, 10 genres ont principalement été détectés.

Parmi eux, les *Streptococcus*, les *Moraxella*, les *Haemophilus*, les *Veillonella*, les *Prevotella*, les *Porphyromonas* et les *Fusobacterium*, les *Neisseria*, les *Corynebacterium* et les *Alloiococcus* étaient retrouvés respectivement dans 98,7% (n=78), 91,1% (n=72), 89,9% (n=71), 67,1% (n=53), 53,2% (n=42), 46,8% (n=37), 43% (n=34), 38% (n=30), 25,3% (n=20) et 25,6% (n=21) des échantillons.

Leurs abondances relatives au sein de chaque échantillon étaient supérieures à 20% principalement pour 7 genres : les *Streptococcus* pour 36/79 (45,6%) patients, les *Moraxella* pour 31/79 (39,2%), les *Haemophilus* pour 29/79 (36,7%), les *Corynebacterium*, les *Prevotella* et *Neisseria* pour 2/79 (2,5%) et les *Alloiococcus* pour 1/79 (1,3%).

Les valeurs médianes (minimales - maximales) et moyennes des abondances relatives des principaux genres sont répertoriées dans le **tableur 16**.

Tableau 16 Valeurs médianes (minimales -maximales) et moyennes des abondances relatives (en %) des principaux genres chez les 79 patients étudiés.

	Médiane (Min – Max)	Moyenne
<i>Corynebacterium</i>	0 (0 – 43,4)	1,2
<i>Porphyromonas</i>	0 (0 – 11,8)	0,5
<i>Prevotella</i>	0,004 (0 – 30,7)	1,4
<i>Alloiococcus</i>	0 (0 – 61,8)	0,8
<i>Streptococcus</i>	12,49 (0 – 99,9)	29,5
<i>Veillonella</i>	0,05 (0 – 19,1)	1,1
<i>Fusobacterium</i>	0 (0 – 13,2)	0,3
<i>Neisseria</i>	0 (0 – 26)	1,5
<i>Haemophilus</i>	1,42 (0 – 100)	29,7
<i>Moraxella</i>	8,96 (0 – 100)	30,0

3.2.2 Analyse compositionnelle au niveau taxonomique : Espèce

Lors de l'analyse compositionnelle au niveau taxonomique espèce, 30% des OTUs ont pu être assignés à une espèce bactérienne. Lorsqu'un OTU ne pouvait pas être assigné à une espèce, celui-ci était assigné au dernier ancêtre commun le plus proche (souvent au genre en général). L'espèce n'a pu être attribuée que pour *Haemophilus (influenzae* et *parainfluenzae)*, les *Veillonella dispar*, *Prevotella (melaninogenica, nanceiensis* et *pallens)*, et *Neisseria (cinerea* et *subflava)*.

Dans les 79 échantillons de la cohorte, les *Haemophilus influenzae*, les *Veillonella dispar*, les *Prevotella melaninogenica*, les *Neisseria cinerea*, les *Haemophilus parainfluenzae*, les *Neisseria subflava*, les *Prevotella nanceiensis* et les *Prevotella pallens* étaient respectivement retrouvées dans 62% (n= 49), 49,4% (n=39), 41,8% (n=33), 36,7% (n=29), 32,9% (n=26), 19% (n=15), 17,7% (n=14) et 7,6% (n=6).

La principale espèce était les *Haemophilus influenzae*, retrouvée à plus de 20% dans 35,4% (n=28) des échantillons.

Les valeurs médianes (minimales -maximales) et moyennes des pourcentages de répartitions des principales espèces retrouvées sont répertoriés dans le **tableur 17**.

Tableau 17 Valeurs médianes (minimales -maximales) et moyennes des abondances relatives (en %) des principales espèces chez les 79 patients étudiés.

	Médiane (Min – Max)	Moyenne
<i>Prevotella melaninogenica</i>	0 (0 – 22,2)	0,7
<i>Prevotella nanceiensis</i>	0 (0 – 30,6)	0,4
<i>Prevotella pallens</i>	0 (0 – 5,4)	0,1
<i>Veillonella dispar</i>	0 (0 – 10,3)	0,4
<i>Neisseria cinerea</i>	0 (0 – 26)	1,1
<i>Neisseria subflava</i>	0 (0 – 18,5)	0,4
<i>Haemophilus influenzae</i>	0,006 (0 – 100)	28,5
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	0 (0 – 14,2)	0,4

3.3 Analyse de diversité

Les courbes de raréfaction permettent de savoir si la profondeur de séquençage est assez élevée pour détecter les micro-organismes en faible proportion. Dans le cas de notre étude, les 79 échantillons ont atteint une asymptote ce qui indique une profondeur de séquençage suffisante (donnée non montrée ici).

L'association entre diversité et chaque variable clinique a été testée par un test kruskal-wallis pour l'alpha-diversité et une analyse permanova pour la bêta diversité. Les p-values sont répertoriées dans le **tableur 18**.

Tableau 18 Tableur récapitulatif des p-values associées à chaque indice de diversité pour chaque variable étudiée.

Les p-values inférieures à 0,05 et donc significatives sont en surlignées en rouge dans le tableur.

Variables	Diversité α				Diversité β	
	Observed_OTU	Chao 1	Shannon	Simpsons	Bray-Curtis	Jaccard
Age	0,4045	0,4443	0,9453	0,7686	0,015	0,08
Sexe	0,7353	0,7617	0,4207	0,3981	0,938	0,781
Prématurité	0,7460	0,7460	0,8387	0,8387	0,930	0,687
Type d'alimentation	Artificiel vs Diversification	0,4877	0,5426	0,2456	0,1333	0,197
	Artificiel vs Maternel	0,8647	0,8469	0,5858	0,5703	0,155
	Artificiel vs Mixte	0,0088	0,0092	0,0029	0,0235	0,059
	Diversification vs Maternel	0,7117	0,7323	0,4684	0,4196	0,215
	Diversification vs Mixte	0,1432	0,1432	0,1092	0,1965	0,062
	Maternel vs Mixte	0,0037	0,0039	0,0042	0,0504	0,552
Mode de vie	0,0951	0,1037	0,9338	0,9118	0,038	0,076
Fratrie	0,7433	0,7629	0,6439	0,5209	0,789	0,555
Tabagisme passif	0,2889	0,2942	0,4566	0,4167	0,504	0,513
URTI vs LRTI	0,5694	0,5591	0,1456	0,1728	0,374	0,125
Durée de soins	0,1828	0,1701	0,1163	0,3059	0,702	0,041
Nécessité d'un support ventilatoire	0,3586	0,3359	0,1611	0,2442	0,612	0,058
Coinfections virales	0,8122	0,7981	0,9563	0,9563	0,401	0,299

Abréviations: URTI: Upper Respiratory Tract Infection; LRTI: Lower Respiratory Tract Infection.

En ce qui concerna l'alpha-diversité globale (estimée par observed OTU, chao 1 et les indices de diversité de Shannon et Simpsons), les p-values étaient significatives pour le type d'alimentation (artificiel vs Mixte) ($p < 0.05$). Les p-values étaient également significatives pour le type d'allaitement (maternel vs mixte) ($p < 0.05$) en regardant l'alpha-diversité estimée par observed OTU, et les indices de diversité de Shannon et Simpsons. Dans tous les cas, une diversité plus importante était observée pour les nourrissons allaités de façon mixte c'est-à-dire avec du lait maternel et du lait artificiel (**Figure 25** et **Figure 26**).

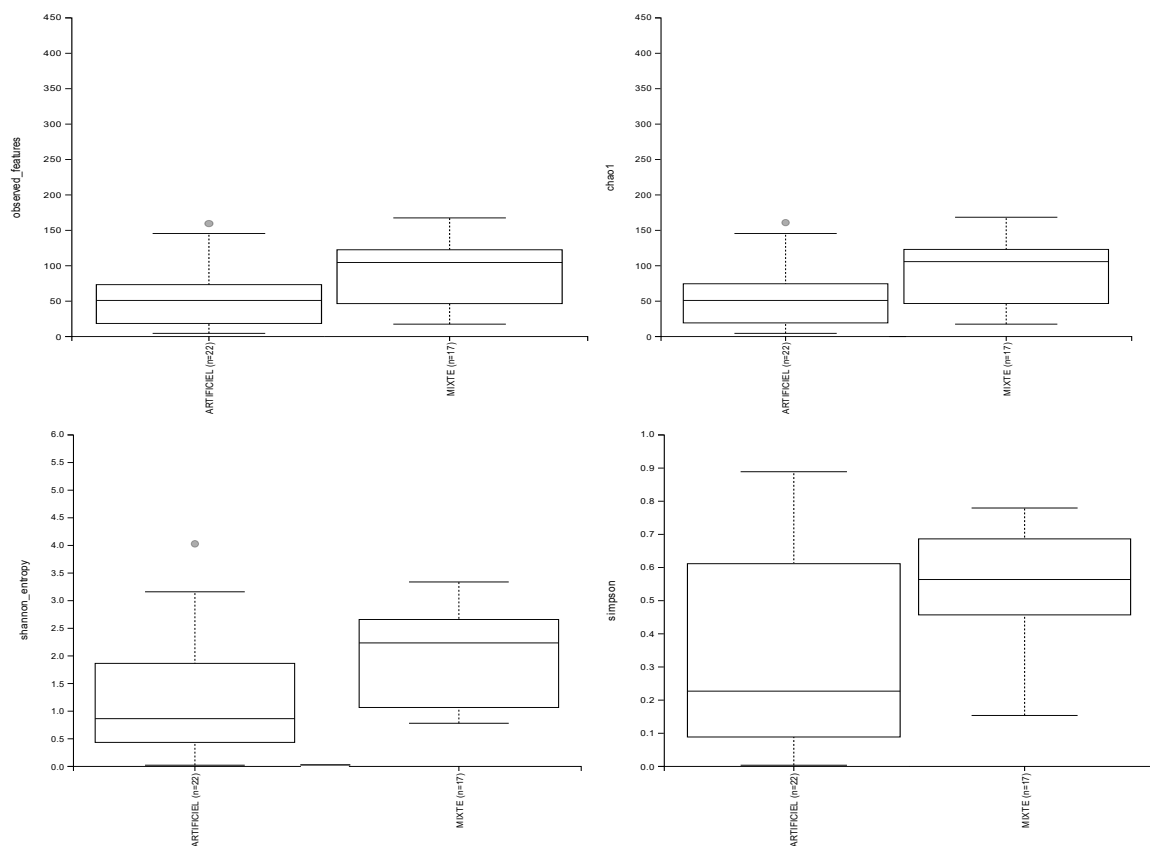


Figure 25 Représentation de l'alpha diversité globale (estimée par observed OTU, chao 1 et les indices de diversité de Shannon et Simpsons) entre les groupes de nourrissons ayant reçu une alimentation avec du lait artificiel et ceux avec une alimentation mixte (maternel + artificiel).

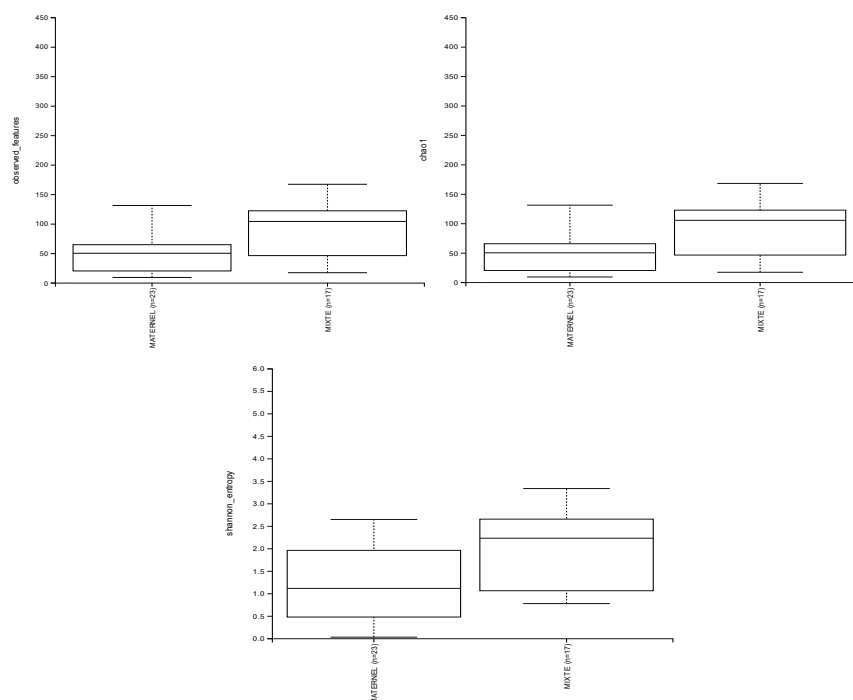


Figure 26 Représentation de l'alpha diversité globale (estimée par observed OTU, chao 1 et l'indice de diversité de Shannon) entre les groupes de nourrissons ayant reçu une alimentation avec du lait maternel et ceux avec une alimentation mixte (maternel + artificiel).

La diversité du bactériome nasopharyngée était donc impactée par certaines covariables cliniques mais n'était pas significativement différente selon la sévérité de l'infection respiratoire virale bien que l'on puisse observer une tendance vers une baisse de la diversité dans le groupe LRTI (**Figure 27**).

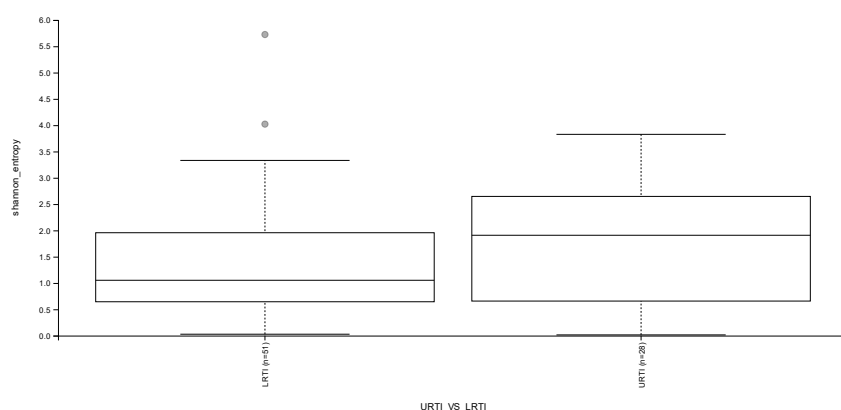


Figure 27 Représentation de l'alpha diversité calculée avec l'indice de Shannon entre les groupes de patients URTI et LRTI.

Abréviations: URTI: Upper Respiratory Tract Infection; LRTI: Lower Respiratory Tract Infection.

Une bêta diversité significative était associée à l'âge et au mode de vie avec l'indice de Bray-Curtis ($p < 0.05$). Cette analyse montre donc une différence significative de la composition du bactériome globale en fonction de l'âge, et du mode de vie. Une bêta diversité significative était associée au type d'alimentation (Artificiel vs Mixte, Diversification vs Mixte et Maternel vs Mixte) et à la durée des soins avec l'indice de Jaccard ($p < 0.05$).

3.4 Analyse compositionnelle en fonction des critères cliniques et démographiques

Les covariables étudiées dans cette partie étaient les suivantes : l'âge, le sexe, la prématurité, le type d'alimentation (maternel, artificiel, mixte ou diversification), le mode de vie (crèche ou à domicile), le tabagisme passif, la durée des soins, la présence de coinfections virales et la nécessité de supplémentation en O₂.

Par ANCOM, seul un OTU (au niveau du genre) était différenciellement abondant en fonction du mode de vie des patients. L'OTU jugé significativement différent entre les nourrissons vivant à domicile et ceux étant en crèche était assigné au genre *Capnocytophaga* ($W=127$) avec une abondance moyenne de 0,02 chez les nourrissons vivant à domicile et de 0,18 chez ceux étant en crèche. La valeur W représente le nombre de fois où l'hypothèse nulle (l'abondance moyenne d'une espèce donnée dans un groupe est égale à celle de l'autre groupe) a été rejetée pour un OTU donné.

3.5 Analyse compositionnelle en fonction des groupes URTI/LRTI

L'analyse ANCOM n'a pas permis de mettre en évidence une différence d'abondance d'OTUs en fonction des groupes URTI et LRTI, quel que soit le niveau taxonomique. En effet, les mêmes genres, ou espèces étaient retrouvés en majorité dans les deux groupes (**Figure 28**).

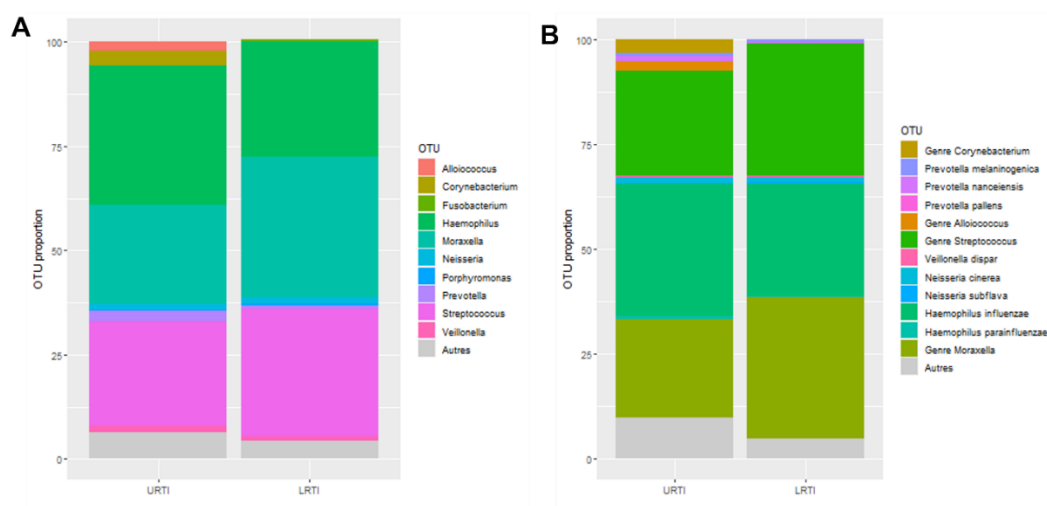


Figure 28 Représentation graphique des moyennes des abondances relatives des OTUs retrouvés en majorité en fonction du groupe LRTI ou URTI à différent niveau taxonomique en A- au niveau du genre et en B- au niveau de l'espèce.

Abréviations: OTU: Operational Taxonomic Unit; URTI: Upper Respiratory Tract Infection; LRTI: Lower Respiratory Tract Infection.

Sur le heatmap réalisé à partir des OTUs au niveau du genre, aucun regroupement en fonction du groupe LRTI OU URTI n'a été noté ce qui veut dire qu'au niveau du genre, l'ensemble des données du bactériome ne permettent pas de différencier les groupes URTI ou LRTI (**Figure 29**). A noter que ces tests ont également été réalisés uniquement sur les patients séquencés dans l'axe virome afin d'enlever le biais dû à l'âge et au virus infectant (uniquement des patients VRS+ et âgés de moins de 7 mois) et qu'aucune différence d'abondance d'OTUs (au niveau du genre et de l'espèce) n'a pu être mise en évidence.

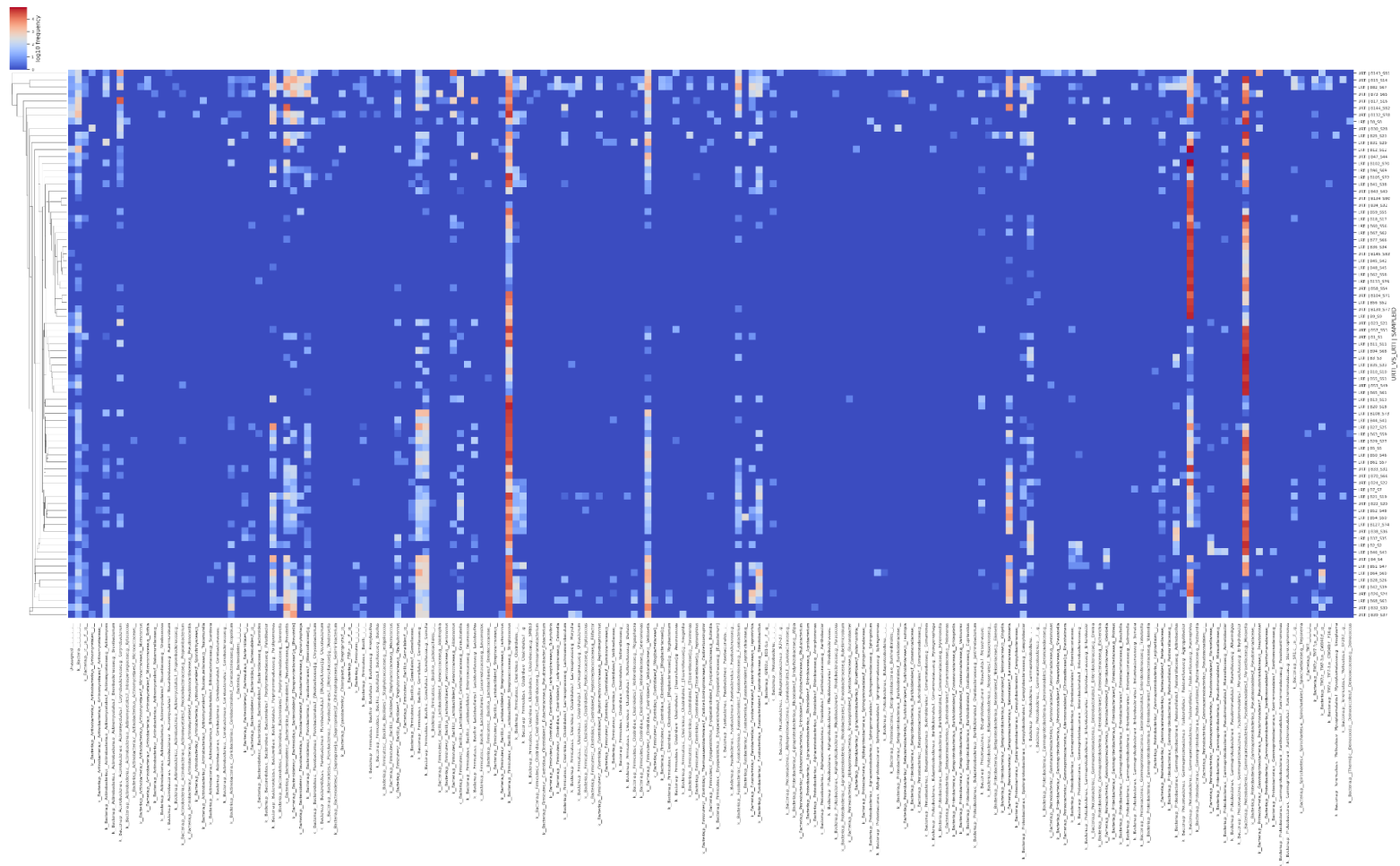


Figure 29 Heatmap des OTUs retrouvés en majorité en fonction du groupe LRTI ou URTI.

L'heatmap générés à de la table d'OTUs normalisés affiche l'abondance relative de chaque genre détecté dans chaque échantillon. L'abondance relative est représentée par une échelle de gradient.

Abréviations : OTU: Operational Taxonomic Unit; URTI: Upper Respiratory Tract Infection; LRTI: Lower Respiratory Tract Infection.

Une autre analyse basée sur le profil majoritaire du bactériome a été réalisée. Pour chaque échantillon le profil majoritaire, c'est-à-dire le genre retrouvé à plus de 50% dans l'échantillon a été déterminé. Quatre profils majoritaires ont été retrouvés : profil *Moraxella* dominant, profil *Haemophilus* dominant, profil *Streptococcus* dominant et profil *Alloiococcus* dominant. Lorsqu'aucun profil n'était retrouvé à plus de 50% dans un échantillon, l'échantillon n'était pas pris en compte. La répartition des profils majoritaire en fonction des groupes URTI et LRTI est résumée dans le **tableur 19**.

Tableau 19 Effectifs et pourcentages des profils majoritaires en fonction des groupes URTI et LRTI.

Profil majoritaire (OTU > 50%)	URTI n= 28	LRTI n= 51	Fisher test P-value
<i>Moraxella</i>	6 (21,4%)	15 (29,4%)	0,5958
<i>Haemophilus</i>	10 (35,7%)	14 (27,4%)	0,4557
<i>Streptococcus</i>	7 (25%)	16 (31,4%)	0,6129
<i>Alloiococcus</i>	1 (3,6%)	/	/
Aucun OTU > 50%	4 (14,3%)	6 (11,8%)	/

Abréviations: OTU: Operational Taxonomic Unit; URTI: Upper Respiratory Tract Infection; LRTI: Lower Respiratory Tract Infection.

Aucun profil dominant n'a pu être statistiquement associé à la sévérité (Fisher test p-value >0.05).

Parmi les profils majoritaires, il n'y avait pas de différence significative d'abondance relative entre les groupes URTI et LRTI (profil *Moraxella* dominant : p-value à 0,2089 ; profil *Haemophilus* dominant : p-value à 0,6597 ; profil *Streptococcus* dominant : p-value à 0,1191).

La sévérité des bronchiolites étant parfois définie par la nécessité d'une oxygénothérapie, une analyse similaire a été effectuée en comparant les groupes avec ou sans oxygène, et ne retrouve pas d'association statistiquement significative avec un profil dominant du bactériome.

4 Discussion

Le nombre d'études mettant en évidence le lien entre les perturbations de la composition et de la fonction du bactériome des voies respiratoires et les maladies respiratoires pédiatriques a considérablement augmenté au cours de la dernière décennie²⁹⁰. Comprendre pourquoi certains enfants développent une bronchiolite sévère alors que la plupart des enfants souffrent d'une infection des voies respiratoires supérieures légères reste un problème important qui doit être résolu pour améliorer la prise en charge et les soins des enfants souffrant d'IRA. Dans cette étude, la composition du microbiote bactérien nasopharyngé de nourrissons atteints d'une IRA virale sévère a été évaluée et comparée à celui des nourrissons souffrant d'une IRA virale légère. Nous avons tenté en comparant l'abondance relative et la diversité des populations bactériennes dans les voies respiratoires supérieures des enfants au moment de l'hospitalisation d'identifier des profils bactériens qui différenciaient les enfants qui présentaient une maladie grave par rapport aux autres.

Dix genres bactériens ont été principalement retrouvés dans notre cohorte : les *Streptococcus* (98,7%), les *Moraxella* (91,1%), les *Haemophilus* (89,9%), les *Veillonella* (67,1%), les *Prevotella* (53,2%), les *Porphyromonas* (46,8%), les *Fusobacterium* (46,8%), les *Neisseria* (43%), les *Corynebacterium* (38%), et les *Alloiococcus* (25,6%) (genre annoté sous le nom de *Dolosigranulum* dans certaines bases de données). Ces données correspondent à ce qui avait été trouvé précédemment dans la littérature dans le bactériome nasopharyngé d'enfants^{46,290,508–512}.

A noter que 3 profils dominants ont été identifiés : profil *Haemophilus* dominant, profil *Moraxella* dominant, et profil *Streptococcus* dominant comme c'était le cas dans plusieurs études sur des enfants souffrant d'IRA^{310,321,329,439,513}. Dans notre étude, ces profils dominants sont plus fréquents chez les enfants avec LRTI, mais cette association n'est pas significative, probablement à cause de la taille limitée de la cohorte. Un profil dominant *Alloiococcus* n'a été identifié que chez un enfant du groupe URTI ce qui n'est pas étonnant puisque ce profil est souvent retrouvé chez les enfants en bonne santé^{310,315,321}.

Enfin, parmi les OTUs qui pouvaient être classifiées au niveau de l'espèce, *Haemophilus influenzae* étaient l'espèce la plus retrouvée (62% des échantillons). Cette espèce est

fréquemment associée aux bronchiolites à VRS⁵¹⁴ et peut être responsable de surinfection pulmonaires.

Dans un second temps, nous avons réalisé des analyses de type ANCOM afin de déterminer si des critères cliniques ou démographiques (l'âge, le sexe, la prématurité, le type d'alimentation, le mode de vie, le tabagisme passif, la durée des soins, la présence de coinfections, la nécessité de supplémentation en O₂ et le virus infectant) exerçaient une influence sur la composition et l'abondance du microbiome bactérien.

Au niveau du genre, un seul OTU était différentiellement abondant en fonction du mode de vie des patients : le genre *Capnocytophaga*. Ce genre était différentiellement exprimés entre les enfants vivants à domicile et ceux étant en crèche et étonnamment plus exprimé dans le groupe de nourrissons allant à la crèche. Les bactéries *Capnocytophaga* sont des bactéries commensales de la flore gingivale des espèces canines et félines qui peuvent se transmettre par léchage, morsure ou simple contact avec les animaux⁵¹⁵. A notre connaissance, aucune autre étude n'a rapporté cette différence et malheureusement la variable « présence d'animaux de compagnie au domicile » n'a pas été relevé lors de la constitution de notre cohorte. Par ailleurs, d'autres études ont montré que l'abondance en *Moraxella*, *S. pneumoniae* et *H. influenzae* était plus élevée chez les nourrissons fréquentant une crèche^{332,516}. L'exposition à des conditions de surpeuplement, comme la fréquentation d'une garderie et la présence de jeunes frères et sœurs sont connus pour influencer sur le développement du microbiome respiratoire⁸.

Dans cette étude, aucune différence significative en fonction de l'âge (nourrissons de < 2 ou ≥ 2 mois) n'a été retrouvée avec l'analyse ANCOM bien que la bêta diversité soit significativement différente entre les deux groupes de patients. Pourtant, une étude récente a mis en évidence des différences de profil de microbiome bactérien entre les nourrissons âgés de < 4 ou ≥ 4 mois pour *Haemophilus* et *Moraxella*, et les genres minoritaires *Gemella*, *Rothia* et *Mannheimia*⁵¹⁶. Dans cette étude, l'abondance relative d'*Haemophilus* était plus élevée chez les nourrissons âgés de moins de 4 mois.

Contrairement à ce qui a été observé dans notre étude, il a été mis en évidence que l'âge gestationnel (enfants prématurés *versus* enfant nés à terme), le tabagisme passif, les

infections respiratoires antérieures et l'utilisation d'une assistance respiratoire peuvent également affecter le microbiome du nourrisson^{8,291,309,508,516}.

Dans notre étude, nous n'avons pas pu mettre en évidence une relation directe entre la composition du microbiome et la sévérité de l'IRA. Deux variables ont été observées concernant la sévérité : URTI vs LRTI et nécessité ou non d'une supplémentation en O₂. Quelque soit le niveau taxonomique étudié, aucune différence d'abondance d'OTUs en fonction des groupes URTI et LRTI ou en fonction des groupes avec ou sans supplémentation en O₂ n'a été retrouvée. De plus, en réalisant une analyse basée sur le profil majoritaire de chaque échantillon, aucun profil dominant n'a pu être associé à la sévérité.

Ces résultats ne correspondent pas à ce qui a été précédemment décrit dans la littérature bien que l'on puisse observer une tendance lorsque l'on regarde les genres dominants. En effet, la majorité des études s'accordent à dire qu'il existe un lien entre la sévérité de l'IRA et un profil dominé par *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* et *Streptococcus pneumoniae*^{244,310,314,316,320,321,324–332,504,510,516–518}. A l'inverse, un profil dominé par *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* ou *Dolosigranulum (Alloiococcus)*^{310,315,316,320,321,323,516} était plutôt corrélé négativement à la sévérité des IRA. Cependant, la littérature actuelle présente des résultats contradictoires concernant les genres associés à la sévérité des IRA^{315,318,320,328,329,334,519}. Les raisons potentielles des divergences entre les études sont multiples : les différences entre les populations de patients, les méthodes d'échantillonnage (écouvillon nasal ou aspiration nasopharyngée) et les techniques de laboratoire (culture ou séquençage). Bien que nous n'ayons pas trouvé de différences significatives de compositions entre nos deux groupes il est important de noter que les 3 genres associés à la sévérité (*Moraxella*, *Haemophilus* et *Streptococcus*) étaient retrouvés en grande quantité dans tous nos échantillons. Une explication possible pourrait être que, bien que nous ayons stratifié les patients en fonction de la gravité (URTI vs LRTI ou avec et sans supplémentation en O₂), tous les patients inclus dans notre étude ont été hospitalisés et donc présentent déjà une certaine sévérité par rapport aux enfants renvoyés à domicile. Les différences de sévérité de la maladie sont peut-être trop subtiles pour être corrélées à la composition microbienne.

En ce qui concerne l'analyse des diversités, en comparant l'abondance relative et la diversité des populations microbiennes dans les voies respiratoires supérieures des enfants au moment de l'hospitalisation, nous n'avons pas pu identifier de profils associés ou de différence de diversité entre les enfants qui développaient une IRA sévère par rapport à ceux ayant une IRA légère (URTI vs LRTI) à l'aide de cinq indices de diversité différents. Ces résultats sont contradictoires avec ceux retrouvés dans la littérature puisque plusieurs études ont mis en évidence un lien entre une diminution de la diversité et la sévérité des IRA^{244,331,519,520}.

Notre étude présente des limites. Premièrement, comme nous l'avons déjà notifié dans le Chapitre Virome, notre étude du microbiome est basée sur l'étude de prélèvement respiratoire haut et non pas bas (comme déjà développé page 180). Deuxièmement, la taille de la cohorte est relativement faible par rapport au nombre de variables examinées ce qui a pu nous empêcher de mettre en évidence des différences de composition. Malgré nos efforts, il manquait des données cliniques pour certains échantillons mais cela n'a pas interféré avec les analyses effectuées et le nombre de participants inclus dans chaque comparaison est indiqué de manière adéquate dans chaque tableau et figure. Par ailleurs, le bactériome a été décrit précédemment comme changeant avec les saisons³⁶⁸, mais dans notre étude les échantillons ont tous été prélevés pendant l'hiver il n'y a donc pas d'effet saisonnier à prendre en compte. Troisièmement, l'existence de différents systèmes de classification des symptômes afin d'évaluer la sévérité de la maladie pose des défis et peuvent conduire à des résultats contradictoires⁴⁶. De plus, l'évaluation de la sévérité peut parfois être subjective puisque certains parents sont plus prudents que d'autres pour signaler des symptômes plus légers. Un système de notation universellement appliqué serait bénéfique pour étudier les biomarqueurs liés à la sévérité des infections respiratoires. Pour finir, nous n'avions pas de groupe avec des témoins sains pour mettre en évidence une différence dans le microbiome d'un individu avec ou sans IRA afin de déterminer les relations de causes à effet entre le pathogène et la composition de la flore. Une étude longitudinale où des échantillons seraient prélevés avant, pendant et après une IRA, seraient idéales pour mettre en lumière les interactions entre les pathogènes et la flore.

5 Conclusion

La sévérité d'une IRA chez les nourrissons peut être déterminée par plusieurs facteurs. Plusieurs études suggèrent que le bactériome respiratoire pourrait jouer un rôle important dans le développement et la sévérité des IRA chez les enfants. Notre étude a permis de mettre en évidence des profils de microbiome distincts dans le tractus nasopharyngé des enfants présentant des symptômes respiratoires : les profils à dominante *Haemophilus*-, *Moraxella*- et *Streptococcus* étant les plus répandus. Bien que nous n'ayons pas pu mettre en lumière des associations significatives entre ces profils et la sévérité de la maladie (groupe URTI vs LRTI), la détection prédominante des profils susmentionnés, par rapport aux profils souvent trouvés chez les enfants en bonne santé, indique des associations potentielles entre la composition du microbiome et les IRA. D'autres études sont donc nécessaires pour vérifier si le profil microbien peut être utilisé comme biomarqueur de progression de la maladie ou d'un mauvais pronostic.

Chapitre 4 : Analyse préliminaire du transcriptome de l'hôte

1. Introduction

Les facteurs de risque connus n'expliquent qu'incomplètement la variabilité de la gravité de la maladie du VRS, en particulier chez les enfants en bonne santé³²¹. En effet, malgré les efforts importants déployés au cours des dernières décennies pour développer une meilleure compréhension du VRS, des lacunes importantes subsistent, notamment l'identification de marqueurs moléculaires robustes comme outils prédictifs de la sévérité de la maladie chez les nourrissons⁴⁶. Chez les enfants ne présentant aucun facteur de risque prédisposant à une maladie grave, la sévérité de la maladie a été liée à une réponse immunitaire de l'hôte excessive, caractérisée entre autres par des réponses cytokines inadéquates¹⁵⁶ et un afflux de neutrophiles dans les voies respiratoires⁵²¹.

L'objectif de cet axe d'étude était de comparer la réponse transcriptomique des patients en fonction des groupes URTI/LRTI, avec ou sans supplémentation en O₂ et avec ou sans coinfections virales, afin de voir si certains gènes étaient différemment exprimés.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Population étudiée

Pour cet axe d'étude, seuls les enfants de moins de 7 mois et testés positifs au VRS ont été inclus afin d'obtenir une population plus homogène (n= 53). Cette sélection est la même que pour l'axe d'étude du virome.

2.2. Séquençage transcriptome

Afin d'évaluer l'expression des ARNm respiratoires de l'hôte en réponse à l'infection virale, un protocole de mRNA-Seq a été utilisé.

Les aliquots des échantillons conservés en RNAlater ont été extraits à l'aide du kit d'extraction RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) selon les recommandations du fabricant avec ajout des étapes facultatives (Ajout du β -mercaptoéthanol au tampon RLT et ajout de l'étape de digestion avec la DNase I Rnase Free). La qualité et la quantité de l'ARN a été évaluée par Bioanalyzer avec le kit Agilent High Sensitivity RNA kit (Agilent). Etant donné les faibles quantités d'ARN, les bibliothèques de séquençage ont été préparées avec le kit NEBNext Single Cell/Low Input RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs) selon les recommandations du fabricant. A noter qu'avec ce kit la sélection des ARNm se fait via la queue poly-A de ceux-ci, de ce fait il

sera possible d'analyser les transcrits de l'hôte et des virus uniquement. La qualité des librairies a ensuite été vérifiée sur Bioanalyzer avec le kit Agilent High Sensitivity DNA kit (Agilent). Les librairies finales ont été séquencées sur la plateforme NextSeq™ (Illumina) sur une cassette NextSeq 500/550 High Output kit v2 (2x75pb, paired-end) (Illumina).

2.3. Analyse bio-informatique et statistique

Les reads bruts ont été trimmés avec Trimmomatic PE. Les reads ont été alignés sur le génome humain (grch38) avec Hisat2. La table de comptage des reads sur chaque transcript humain a été obtenue avec featureCounts sur la version d'annotation gencode v32.basic.

A partir de la matrice de comptage obtenue, une sélection a été effectuée selon les critères de qualités suivants :

- Nombre de gènes minimum exprimés dans l'échantillon = 5000
- Nombre de reads minimum mappant sur le transcriptome humain par échantillon = 200 000.
- Nombre de reads pour considérer un gène comme exprimé = 1

Seuls les échantillons correspondant à ces critères ont été conservés pour la suite de l'analyse. Avant de procéder à l'analyse d'expression différentielle des gènes, une normalisation des données a été effectuée afin d'éliminer les biais dus aux effets batchs et manipulations expérimentales mais également de corriger les biais biologiques (par exemple la longueur des gènes car plus un gène est long plus il a de chance d'être séquencé). La normalisation ainsi que l'analyse d'expression différentielle ont été réalisées grâce à la librairie R DESeq2.

Une analyse d'expression différentielle permet d'établir si certains gènes sont différemment exprimés entre deux groupes de patients, ici les patients URTI vs LRTI, les patients avec ou sans supplémentation en O₂ et les patients avec ou sans coinfections (avec un membre des familles suivantes : *Adenoviridae*, *Coronaviridae* et *Parvoviridae*). DESeq2 va fournir un tableau avec diverses informations concernant chaque gène tel que :

- Le log2fold-change (log2FC) qui correspond au rapport d'expression d'un gène donné dans une condition A par rapport à une condition B.
- La p-value value associée et la p-value ajustée obtenue grâce à une correction statistique : la méthode de Benjamini-Hochberg qui permet de réduire le nombre de faux positifs⁵²².

On considère alors qu'un gène est différemment exprimé entre nos deux conditions lorsque la p-value ajustée sera inférieure au seuil fixé, ici 0,05. Les heatmaps des gènes significatifs ont été réalisés à partir de la table transformée par DESeq2⁵²³.

3. Résultats des analyses préliminaires du transcriptome de l'hôte

Trois analyses ont été réalisées pour comparer les groupes de patients classés URTI vs LRTI, les patients avec ou sans supplémentation en O₂ et les patients avec ou sans coinfections (avec un membre des familles suivantes : *Adenoviridae*, *Coronaviridae* et *Parvoviridae*).

Parmi les échantillons séquencés, 36 échantillons ont passé les filtres des critères de qualité établie et ont donc été considérés pour la suite de l'analyse. En moyenne 7 813 688 reads ont été obtenues par échantillon (min= 283 823 ; max= 38 116 690). En moyenne 12 293 gènes étaient exprimés par échantillon (min= 5 913 ; max= 20 985).

3.1 Analyse préliminaire entre les groupes URTI et LRTI

Parmi les 36 patients inclus dans l'analyse, 13,9% (n=5) des patients étaient classés dans le groupe URTI et 86,1% (n=31) dans le groupe LRTI.

L'analyse différentielle a permis de mettre en évidence seulement 6 gènes différemment exprimés entre le groupe de patients URTI et le groupe de patients LRTI (**Tableur 20**).

Tableau 20 Tableur des gènes exprimés différemment entre les groupes URTI et LRTI ainsi que leur Log2FC, p-value ajustée et statut (sous ou surexprimé).

L'analyse différentielle a montré une différence d'expression entre les groupes URTI et LRTI pour 6 gènes. Le référentiel pour interpréter les Log2FC est le groupe URTI, ce qui signifie qu'un Log2FC négatif correspondra à un gène sous-exprimé dans le groupe LRTI (Statut DOWN) par rapport au groupe URTI, alors qu'un Log2FC positif correspondra à un gène surexprimé dans le groupe LRTI (Statut UP) par rapport au groupe URTI. La p-value ajustée correspond à la p-value initiale corrigée via la méthode de Benjamini-Hochberg permettant de réduire le nombre de faux positifs.

Gènes	log2FC	padj	status
AC012306.2	19,28	1,48E-05	UP
AF228727.1	7,61	1,48E-05	UP
CSN1S1	24,98	1,62E-11	UP
CSN3	22,97	0,0015	UP
TESC	6,25	0,0011	UP
VIT	19,06	0,0079	UP

Abréviations : Log2FC : Log2 Fold Change ; DOWN : gène sous-exprimé ; UP : gène surexprimé ; AC012306.2 et AF228727.1 : gènes non caractérisés ; CSN1S1 : Casein Alpha S1 ; CSN3 : Casein Kappa ; TESC : Tescalcin ; VIT : Vitrine.

Une représentation du positionnement de tous les gènes en fonction de leur seuil de p-value ajustée et de leur ratio d'expression en Log2FC est présentée sur le Volcanoplot ci-dessous (Figure 30).

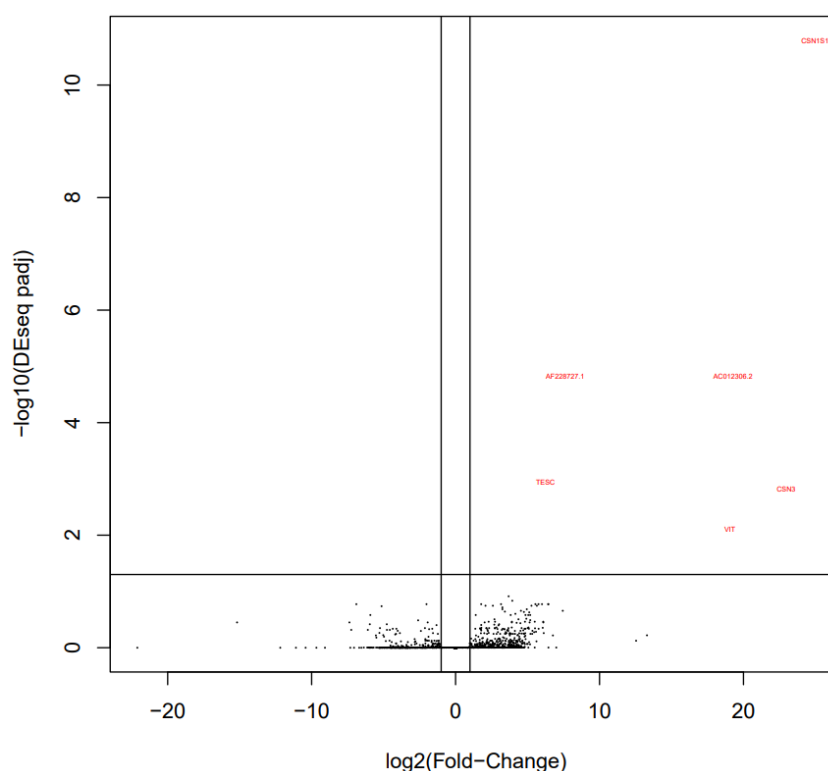


Figure 30 Volcano plot des gènes différentiellement exprimés chez les enfants infectés par le VRS des groupes URTI et LRTI.

L'axe des abscisses représente les log2FC des gènes entre les deux groupes. L'analyse différentielle a montré une différence d'expression entre les groupes URTI et LRTI pour 6 gènes. En vert, on retrouve les gènes ayant un Log2FC négatif et correspondant donc à des gènes sous-exprimés dans le groupe LRTI. En rouge, on retrouve les gènes ayant un Log2FC positif et correspondant donc à des gènes surexprimés dans le groupe LRTI. L'axe des ordonnées représente les valeurs des p-value ajustées (en échelle log10) pour chaque gène. Les valeurs les plus élevées indiquent une plus grande signification statistique. Les points noirs représentent tous les gènes testés pour lesquels la p-value ajustée n'était pas significative.

Abréviations : Log2FC : Log2 Fold Change ; DOWN : gène sous-exprimé ; UP : gène surexprimé ; AC012306.2 et AF228727.1 : gènes non caractérisés ; CSN1S1 : Casein Alpha S1 ; CSN3 : Casein Kappa ; TESC : Tescalcin ; VIT : Vitrine ; padj : p-value ajustée.

Parmi les gènes différemment exprimés entre le groupe URTI et LRTI, aucuns n'étaient associés aux voies de l'immunité.

Un heatmap des gènes exprimés différemment entre les groupes URTI et LRTI est présenté en **figure 31**.

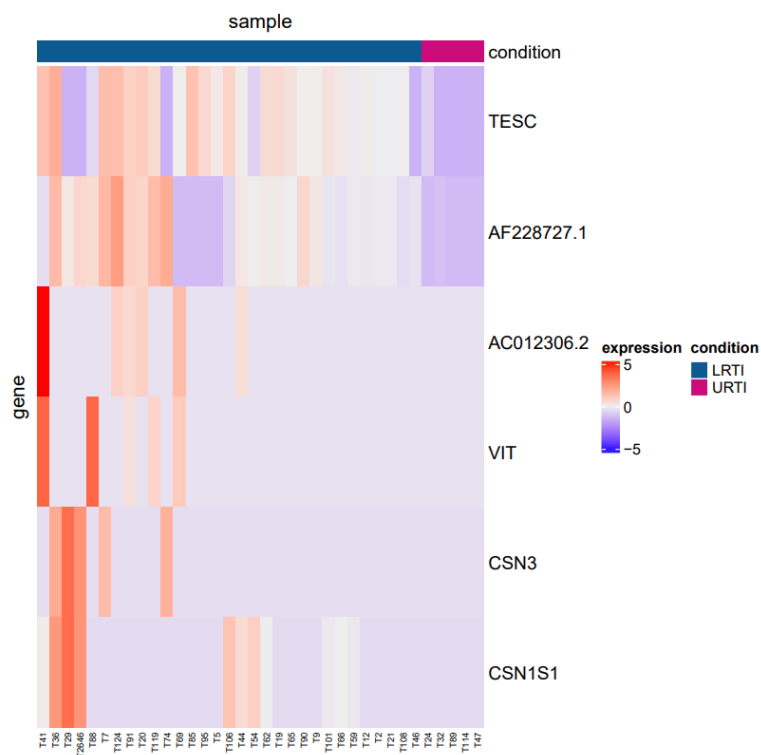


Figure 31 Heatmap des gènes exprimés différemment entre les groupes URTI et LRTI de manière significative.

Ce heatmap montre la variation des Log2FoldChange de l'expression des gènes significativement différemment exprimés entre les groupes URTI et LRTI. L'expression normalisée est indiquée comme surexprimée (rouge) ou sous-exprimée (bleu).

Abréviations : AC012306.2 et AF228727.1 : gènes non caractérisés ; CSN1S1 : Casein Alpha S1 ; CSN3 : Casein Kappa ; TESC : Tescalcin ; VIT : Vitrine ; padj : URTI : upper respiratory tract infection ; LRTI : lower respiratory tract infection.

Un heatmap avec des gènes associés à l'immunité a été réalisé pour observer d'éventuelles différences d'expression entre les groupes URTI et LRTI bien que non significatives. Ce heatmap est présenté en **figure 32**. Aucun regroupement n'a pu être effectué en regardant les gènes de l'immunité. Cependant, 3 clusters de patients sont observés : un cluster de seulement 2 patients avec une forte expression d'IL17A et d'IL2, un cluster de 18 patients avec une surexpression des cytokines inflammatoires (sauf IL-7 et IL-33), un dernier cluster de 16 patients avec peu d'expression des cytokines inflammatoires.

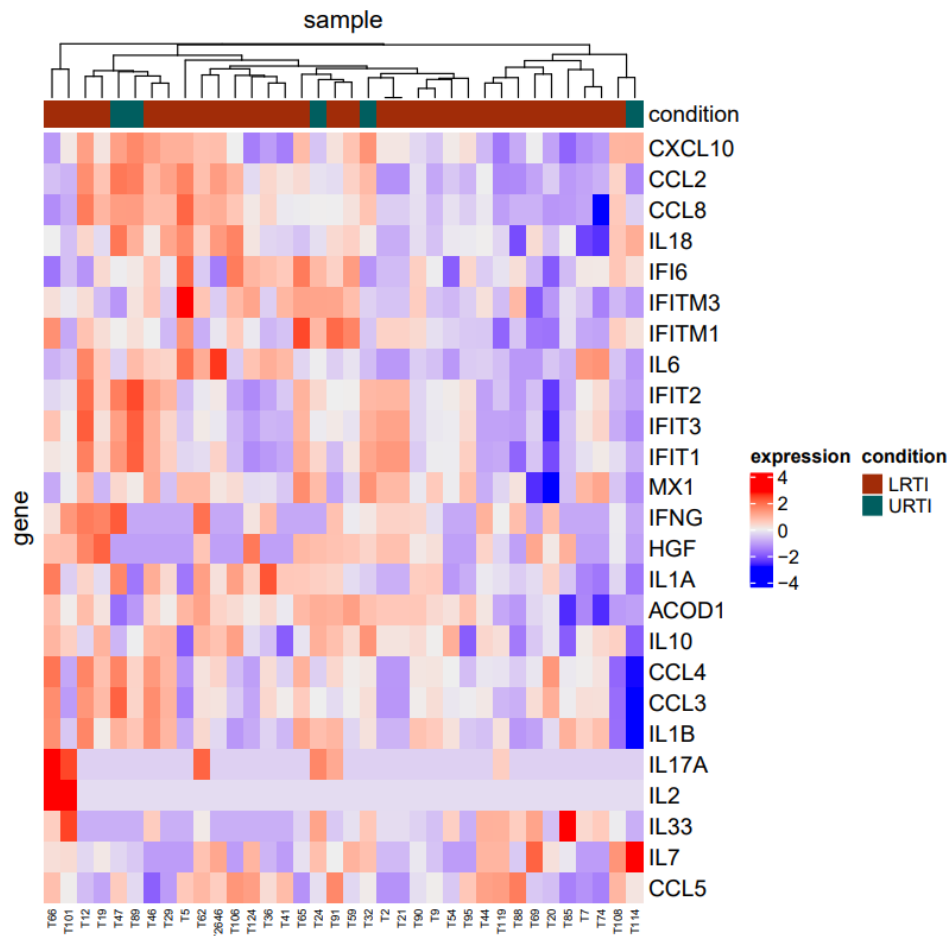


Figure 32 Heatmap des gènes associés aux voies de l'immunité en fonction des groupes URTI et LRTI.

Ce heatmap montre la variation des Log2FoldChange de l'expression des gènes associés aux voies de l'immunité dans les groupes URTI et LRTI. L'expression normalisée est indiquée comme surexprimée (rouge) ou sous-exprimée (bleu).

Abréviations : CXCL : C-X-C Motif Chemokine Ligand; CCL : C-C motif chemokine ligand; IL : Interleukine; IFI6 : Interferon Alpha Inducible Protein; IFITM : Interferon-induced transmembrane proteins; IFIT : Interferon Induced Protein With Tetratricopeptide Repeats; MX1 : MX Dynamin Like GTPase 1; IFN : Interferon; HGF : Hepatocyte growth factor; ACOD1 : Aconitate Decarboxylase 1; URTI : upper respiratory tract infection; LRTI : lower respiratory tract infection.

3.2 Analyse préliminaire entre les patients avec ou sans supplémentation en O₂

La présence d'une supplémentation en O₂ étant utilisée dans certaines études comme marqueur de sévérité de la bronchiolite, une analyse statistique du transcriptome a également été réalisée en utilisant ce critère. Parmi les 36 patients inclus dans l'analyse, 41,7% (n=15) des patients n'ont pas reçu de supplémentation en O₂ contre 58,3% (n=21) qui ont reçu une supplémentation en O₂.

L'analyse différentielle a permis de mettre en évidence 3 gènes différemment exprimés entre le groupe de patients ayant reçu ou non une supplémentation en O₂. (**Tableur 21, Figure 33 et Figure 34**).

Tableau 21 Tableur des gènes exprimés différemment entre les groupes ayant reçu ou non une supplémentation en O₂ ainsi que leur Log2FC, p-value ajustée et statut (sous ou surexprimé).

L'analyse différentielle a montré une différence d'expression entre les groupes ayant reçu ou non une supplémentation en O₂ pour 3 gènes. Le référentiel pour interpréter les Log2FC est le groupe n'ayant pas reçu une supplémentation en O₂, ce qui signifie qu'un Log2FC négatif correspondra à un gène sous-exprimé dans le groupe ayant reçu une supplémentation en O₂ (Statut DOWN) par rapport à ce groupe, alors qu'un Log2FC positif correspondra à un gène surexprimé dans le groupe ayant reçu une supplémentation en O₂ (Statut UP) par rapport au groupe n'ayant pas reçu une supplémentation en O₂. La p-value ajustée correspond à la p-value initiale corrigée via la méthode de Benjamini-Hochberg permettant de réduire le nombre de faux positifs.

Gènes	log2FC	padj	status
ACSM4	-15,55	0,0128	DOWN
CSN3	25,75	1,29E-11	UP
SLCO1A2	-13,44	0,0462	DOWN

Abréviations : Log2FC : Log2 Fold Change ; DOWN : gène sous-exprimé ; UP : gène surexprimé ; CSN3 : Casein Kappa ; ACSM4 : Acyl-CoA Synthetase Medium Chain Family Member 4 ; SLCO1A2 : Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 1A2.

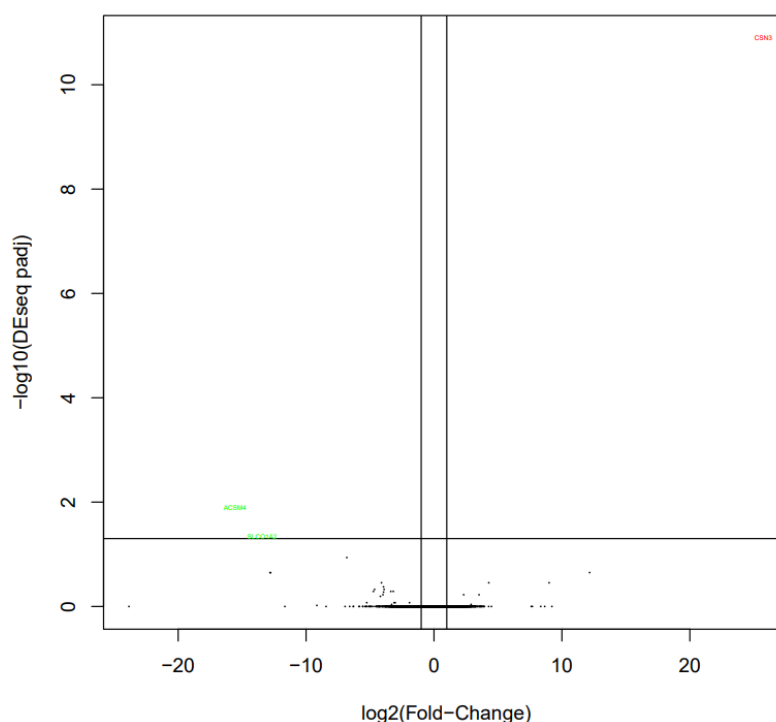


Figure 33 Volcano plot des gènes différentiellement exprimés chez les enfants infectés par le VRS des groupes ayant reçu ou non une supplémentation en O₂.

L'axe des abscisses représente les log₂FC des gènes entre les deux groupes. L'analyse différentielle a montré une différence d'expression entre les groupes ayant reçu ou non une supplémentation en O₂ pour 3 gènes. En vert, on retrouve les gènes ayant un Log₂FC négatif et correspondant donc à des gènes sous-exprimés dans le groupe ayant reçu une supplémentation en O₂. En rouge, on retrouve les gènes ayant un Log₂FC positif et correspondant donc à des gènes surexprimés dans le groupe ayant reçu une supplémentation en O₂. L'axe des ordonnées représente les valeurs des p-value ajustées (en échelle log₁₀) pour chaque gène. Les valeurs les plus élevées indiquent une plus grande signification statistique. Les points noirs représentent tous les gènes testés pour lesquels la p-value ajustée n'était pas significative.

Abréviations: CSN3: Casein Kappa; ACSM4 : Acyl-CoA Synthetase Medium Chain Family Member 4; SLC01A2 : Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 1A2.

Parmi les gènes différemment exprimés entre le groupe ayant reçu ou non une supplémentation en O₂, aucuns n'étaient associés aux voies de l'immunité et l'expression des cytokines inflammatoires ne permettaient pas de grouper les patients selon leur supplémentation en O₂ (**Figure 34** et **Figure 35**).

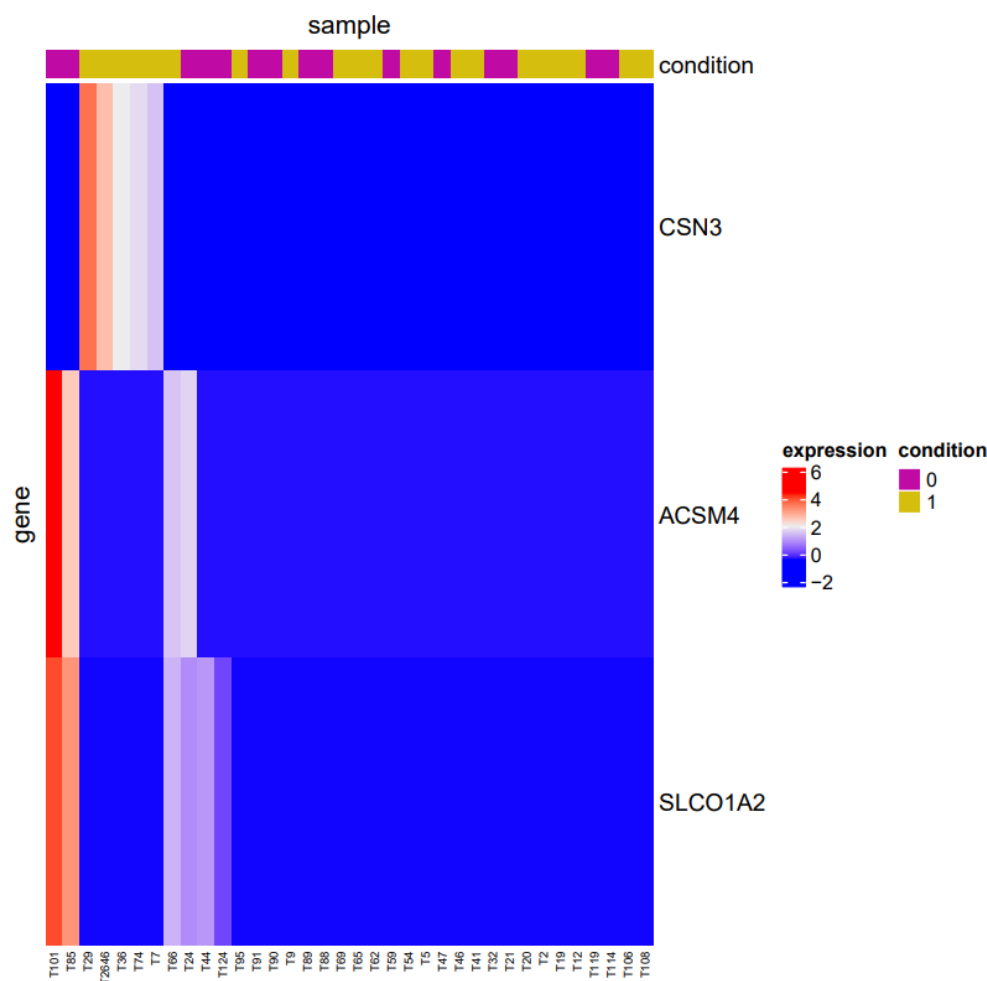


Figure 34 Heatmap des gènes exprimés différemment entre les groupes ayant reçu ou non une supplémentation en O₂ de manière significative.

Ce heatmap montre la variation des Log2FoldChange de l'expression des gènes significativement différemment exprimés entre les groupes ayant reçu ou non une supplémentation en O₂. L'expression normalisée est indiquée comme surexprimée (rouge) ou sous-exprimée (bleu). La condition 0 correspond au groupe de patient n'ayant pas reçu de supplémentation en O₂ et la condition 1 correspond au groupe de patients ayant reçu une supplémentation en O₂.

Abréviations: Abréviations: CSN3: Casein Kappa; ACSM4: Acyl-CoA Synthetase Medium Chain Family Member 4; SLCO1A2: Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 1A2.

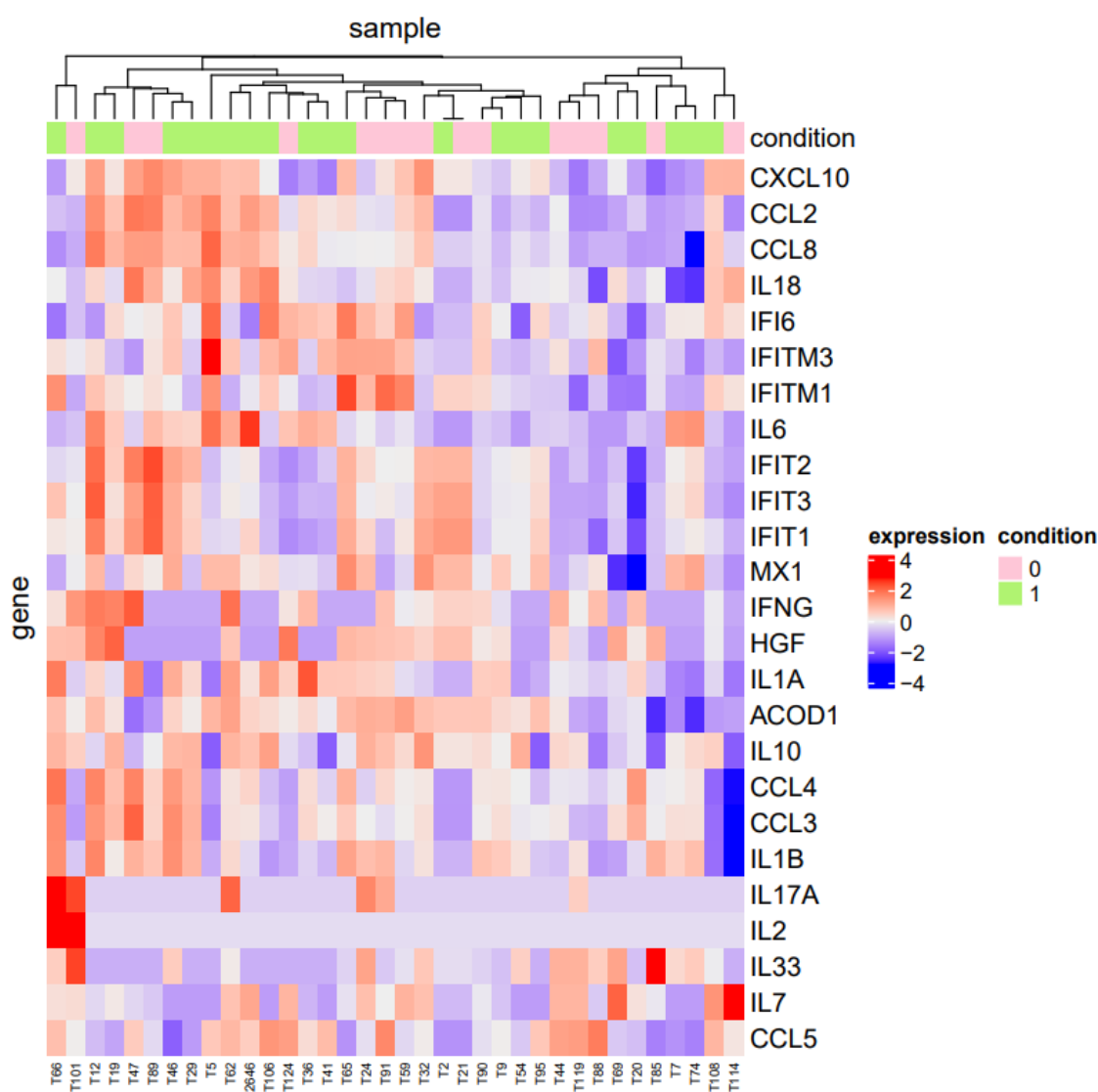


Figure 35 Heatmap des gènes associés aux voies de l'immunité en fonction des groupes ayant reçu ou non une supplémentation en O₂.

Ce heatmap montre la variation des Log2FoldChange de l'expression des gènes associés aux voies de l'immunité dans les groupes ayant reçu ou non une supplémentation en O₂. L'expression normalisée est indiquée comme surexprimée (rouge) ou sous-exprimée (bleu). La condition 0 correspond au groupe de patient n'ayant pas reçu de supplémentation en O₂ et la condition 1 correspond au groupe de patients ayant reçu une supplémentation en O₂.

Abréviations : CXCL : C-X-C Motif Chemokine Ligand ; CCL : C-C motif chemokine ligand; IL : Interleukine; IFI6 : Interferon Alpha Inducible Protein; IFITM : Interferon-induced transmembrane proteins; IFIT : Interferon Induced Protein With Tetratricopeptide Repeats; MX1 : MX Dynamin Like GTPase 1; IFN : Interferon; HGF : Hepatocyte growth factor; ACOD1 : Aconitate Decarboxylase 1.

3.3 Analyse préliminaire entre les patients avec ou sans coinfection

Afin de déterminer si la présence de coinfections virales pourrait influencer sur la réponse transcriptomique, l'analyse statistique a été réalisée en prenant en compte la présence de coinfection déterminées grâce aux données du virome. Parmi les 36 patients inclus dans l'analyse, 22,2% (n=8) des patients avaient une coinfection (avec un membre des familles suivantes : *Adenoviridae*, *Coronaviridae* et *Parvoviridae*), 47,2% (n=17) des patients ne présentaient pas de coinfections. A noter que pour 30,6% (n=11) des patients, il n'a pas été possible de déterminer s'il y avait une coinfection ou non.

Lors de l'analyse réalisée avec les paramètres donnés dans le matériels et méthodes, une liste de 264 gènes étaient identifiés comme étant différemment exprimés entre le groupe de patients avec ou sans coinfection. La majorité des gènes de cette liste étaient des pseudogènes. Après filtration de ces gènes, seuls 20 gènes étaient identifiés comme étant différemment exprimés entre le groupe de patients avec ou sans coinfection (**Tableur 22, Figures 36 et 37**).

Tableau 22 Tableur des gènes exprimés différemment entre les groupes de patients avec ou sans coinfection ainsi que leur Log2FC, p-value ajustée et statut (sous ou surexprimé).

L'analyse différentielle a montré une différence d'expression entre les groupes de patients avec ou sans coinfection pour 20 gènes. Le référentiel pour interpréter les Log2FC est le groupe de patients avec une coinfection, ce qui signifie qu'un Log2FC négatif correspondra à un gène sous-exprimé dans ce groupe (Statut DOWN) par rapport au groupe n'ayant pas de coinfections, alors qu'un Log2FC positif correspondra à un gène surexprimé dans le groupe de patients avec coinfection (Statut UP) par rapport au groupe n'en ayant pas. La p-value ajustée correspond à la p-value initiale corrigée via la méthode de Benjamini-Hochberg permettant de réduire le nombre de faux positifs.

Gènes	log2FC	padj	status
A2ML1	-5,43	0,0141	DOWN
AC005343.4	-4,00	0,0390	DOWN
AL122020.1	-4,12	0,0495	DOWN
AQP4-AS1	-4,07	0,0380	DOWN
ARL6	4,07	0,0333	UP
C5orf66-AS1	3,79	0,0079	UP
CCDC85B	5,91	0,0016	UP
CD44-AS1	-3,72	0,0193	DOWN
CDK19	-2,76	0,0129	DOWN
CFD	4,03	0,0036	UP

Gènes	log2FC	padj	status
<i>HADHAP2</i>	-5,77	0,0330	DOWN
<i>HNRNPA1L2</i>	-3,14	0,0203	DOWN
<i>ICA1L</i>	4,64	0,0017	UP
<i>LEF1</i>	-4,84	0,0420	DOWN
<i>MKNK1-AS1</i>	-5,31	0,0444	DOWN
<i>NUP188</i>	-4,15	0,0109	DOWN
<i>RABGAP1L-IT1</i>	4,83	0,0133	UP
<i>SPINT1</i>	2,16	0,0265	UP
<i>TWSG1</i>	-3,35	0,0246	DOWN
<i>USP37</i>	-2,90	0,0319	DOWN

Abréviations : Log2FC : Log2 Fold Change ; DOWN : gène sous-exprimé ; UP : gène surexprimé ; AC005343.4 et AL122020.1 : gènes non caractérisés ; A2ML1 : Alpha-2-Macroglobulin Like 1 ; AQP4-AS1 : AQP4 Antisense RNA 1 ; ARL6 : ADP Ribosylation Factor Like GTPase 6 ; C5orf66-AS1, CD44-AS1, MKNK1-AS1 et RABGAP1L-IT1: gènes lncRNA (long non-coding RNA) ; CCDC85B : Coiled-Coil Domain Containing 85B ; CDK19 : Cyclin Dependent Kinase 19 ; CFD : Complement Factor D ; HNRNPA1L2 : Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 Like 2 ; ICA1L : Islet Cell Autoantigen 1 Like ; LEF1 : Lymphoid Enhancer Binding Factor 1 ; NUP188 : Nucléopore 188 ; SPINT1 : Serine Peptidase Inhibitor, Kunitz Type 1 ; TWSG1 : Twisted Gastrulation BMP Signaling Modulator 1 ; USP37 : Ubiquitin Specific Peptidase 37.

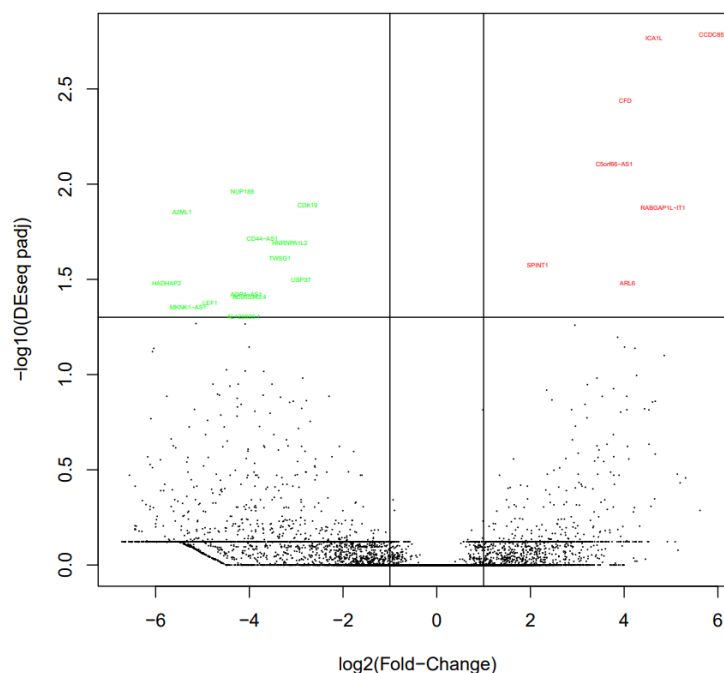


Figure 36 Volcano plot des gènes différentiellement exprimés chez les enfants infectés par le VRS des groupes avec ou sans coinfection.

L'axe des abscisses représente les log2FC des gènes entre les deux groupes. L'analyse différentielle a montré une différence d'expression entre les groupes avec ou sans coinfection pour 20 gènes. En vert, on retrouve les gènes ayant un Log2FC négatif et correspondant donc à des gènes sous-exprimés dans

le groupe des patients avec une coinfection. En rouge, on retrouve les gènes ayant un Log2FC positif et correspondant donc à des gènes surexprimés dans le groupe des patients avec une coinfection. L'axe des ordonnées représente les valeurs des p-value ajustées (en échelle log10) pour chaque gène. Les valeurs les plus élevées indiquent une plus grande signification statistique. Les points noirs représentent tous les gènes testés pour lesquels la p-value ajustée n'était pas significative.

Abréviations : Log2FC : Log2 Fold Change ; DOWN : gène sous-exprimé ; UP : gène surexprimé ; AC005343.4 et AL122020.1 : gènes non caractérisés ; A2ML1 : Alpha-2-Macroglobulin Like 1 ; AQP4-AS1 : AQP4 Antisense RNA 1 ; ARL6 : ADP Ribosylation Factor Like GTPase 6 ; C5orf66-AS1, CD44-AS1, MKNK1-AS1 et RABGAP1L-IT1 : gènes lncRNA (long non-coding RNA) ; CCDC85B : Coiled-Coil Domain Containing 85B ; CDK19 : Cyclin Dependent Kinase 19 ; CFD : Complement Factor D ; HNRNPA1L2 : Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 Like 2 ; ICA1L : Islet Cell Autoantigen 1 Like ; LEF1 : Lymphoid Enhancer Binding Factor 1 ; NUP188 : Nucléopore 188 ; SPINT1 : Serine Peptidase Inhibitor, Kunitz Type 1 ; TWSG1 : Twisted Gastrulation BMP Signaling Modulator 1 ; USP37 : Ubiquitin Specific Peptidase 37.

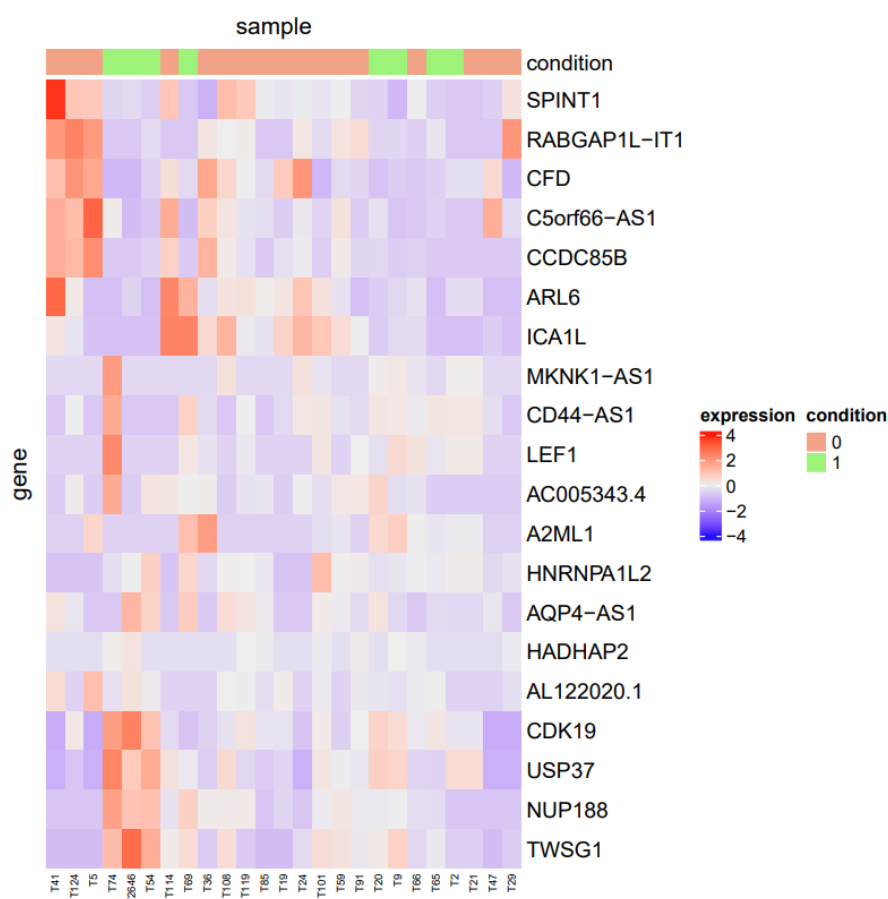


Figure 37 Heatmap des gènes exprimés différemment groupes de manière significative entre les patients avec ou sans coinfection.

Ce heatmap montre la variation des Log2FoldChange de l'expression des gènes significativement différemment exprimés entre les patients avec ou sans coinfection. L'expression normalisée est

indiquée comme surexprimée (rouge) ou sous-exprimée (bleu). La condition 0 correspond au groupe de patient n'ayant pas de coinfection et la condition 1 correspond au groupe de patients ayant une coinfection.

Abréviations : AC005343.4 et AL122020.1 : gènes non caractérisés ; A2ML1 : Alpha-2-Macroglobulin Like 1 ; AQP4-AS1 : AQP4 Antisense RNA 1 ; ARL6 : ADP Ribosylation Factor Like GTPase 6 ; C5orf66-AS1, CD44-AS1, MKNK1-AS1 et RABGAP1L-IT1 : gènes lncRNA (long non-coding RNA) ; CCDC85B : Coiled-Coil Domain Containing 85B ; CDK19 : Cyclin Dependent Kinase 19 ; CFD : Complement Factor D ; HNRNPA1L2 : Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 Like 2 ; ICA1L : Islet Cell Autoantigen 1 Like ; LEF1 : Lymphoid Enhancer Binding Factor 1 ; NUP188 : Nucléopore 188 ; SPINT1 : Serine Peptidase Inhibitor, Kunitz Type 1 ; TWSG1 : Twisted Gastrulation BMP Signaling Modulator 1 ; USP37 : Ubiquitin Specific Peptidase 37.

Aucun regroupement des patients n'était observé en fonction des gènes de l'immunité (**Figure 38**).

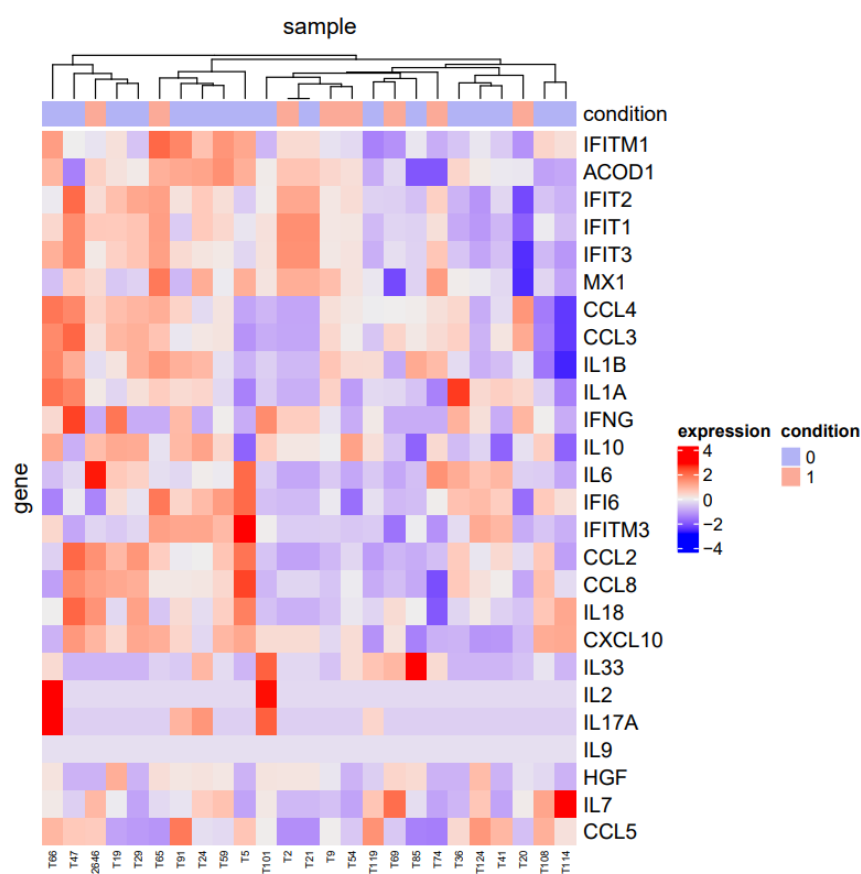


Figure 38 Heatmap des gènes associés aux voies de l'immunité en fonction des groupes avec ou sans coinfection.

Ce heatmap montre la variation des Log2FoldChange de l'expression des gènes associés aux voies de l'immunité dans les groupes de patients avec ou sans coinfection. L'expression normalisée est indiquée

comme surexprimée (rouge) ou sous-exprimée (bleu). La condition 0 correspond au groupe de patient n'ayant pas de coinfection et la condition 1 correspond au groupe de patients ayant une coinfection.

Abréviations : AC005343.4 et AL122020.1 : gènes non caractérisés ; A2ML1 : Alpha-2-Macroglobulin Like 1 ; AQP4-AS1 : AQP4 Antisense RNA 1 ; ARL6 : ADP Ribosylation Factor Like GTPase 6 ; C5orf66-AS1, CD44-AS1, MKNK1-AS1 et RABGAP1L-IT1: gènes lncRNA (long non-coding RNA) ; CCDC85B : Coiled-Coil Domain Containing 85B ; CDK19 : Cyclin Dependent Kinase 19 ; CFD : Complement Factor D ; HNRNPA1L2 : Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 Like 2 ; ICA1L : Islet Cell Autoantigen 1 Like ; LEF1 : Lymphoid Enhancer Binding Factor 1 ; NUP188 : Nucléoporeine 188 ; SPINT1 : Serine Peptidase Inhibitor, Kunitz Type 1 ; TWSG1 : Twisted Gastrulation BMP Signaling Modulator 1 ; USP37 : Ubiquitin Specific Peptidase 37.

4. Discussion

Lors des analyses préliminaires de ces données de mRNA-Seq, nous avons cherché à mettre en évidence une différence d'expression des gènes entre des groupes URTI et LRTI, entre les patients ayant reçu ou non une supplémentation en O₂ et enfin entre les patients avec ou sans coinfection. L'analyse différentielle a permis de mettre en évidence 6 gènes différemment exprimés entre le groupe de patients URTI et le groupe de patients LRTI, 3 gènes entre le groupe de patients ayant reçu ou non une supplémentation en O₂ et 20 gènes entre le groupe de patients ayant ou non une coinfection.

Excepté le gène *Complement Factor D*, *CFD*, (surexprimé dans le groupe de patients avec coinfection), aucun gène différemment exprimé n'était associé aux voies de l'immunité. Une étude avait déjà mis en évidence une surexpression de ce gène dans les ANP de patients hospitalisés suite à une infection par le virus de la grippe A H1N1⁵²⁴.

De plus, excepté pour *HNRNPA1L2* (sous exprimé dans le groupe de patients avec coinfection), aucune étude à notre connaissance ne rapportait une différence d'expression des gènes retrouvés dans notre analyse dans d'autre cas d'IRA. En effet, une récente étude a mis en évidence la ribonucléoprotéine A1 codée par le gène *HNRNPA1*, était capable d'interagir avec la nucléoprotéine de la grippe A entravant ainsi sa réplication⁵²⁵. Il serait intéressant de regarder si cette interaction est possible avec les nucléoprotéines d'autres virus respiratoires. Ces premières analyses ne sont donc pas en accord avec les résultats formulés dans d'autres études récentes qui comparaient les signatures transcriptomiques nasopharyngées observées chez des nourrissons avec une infection plus ou moins sévère par le VRS⁵²⁶, ou chez des nourrissons présentant une bronchiolite à VRS et un groupe contrôle sain^{244,518}. Par exemple, McCall *et al.*, ont identifié une association entre la sévérité des infections à VRS et l'activation

des voies Th17 et Th2 ainsi que l'inhibition de la signalisation des récepteurs des cellules B⁵²⁶. *Rajagopala et al.*, ont pu mettre en évidence 2 878 gènes régulés à la hausse et 1 746 gènes régulés à la baisse chez les sujets atteints d'une IRA à VRS²⁴⁴. La plupart des gènes surexprimés étaient des gènes de réponse à l'interféron, des gènes de la signalisation de l'interleukine, des gènes associés à la voie de l'inflammasome et des TLR, des gènes associés à la réponse antivirale et des gènes codant pour les chimiokines telle que *CXCL10* comme c'est le cas dans notre étude²⁴⁴. A noter qu'une augmentation de l'expression de *CXCL10* a été rapporté dans d'autres études et été associée à une co-infection par le VRS et des bactéries ainsi qu'au recrutement massif de cellules immunitaires contribuant à la pathologie pulmonaire⁵¹⁴. Une récente étude a réalisé une comparaison des réponses de l'hôte face à l'infection par le VRS et trois autres virus respiratoires courants chez les enfants. L'étude transcriptomique comparative a permis de mettre en évidence que le recrutement des neutrophiles et des cellules dendritiques (DC) dans les voies respiratoires est plus important dans l'infection par le VRS que dans les autres infections virales. Lors de l'infection par le VRS, une augmentation de l'expression de deux ISG (*CXCL11* et *IDO1*) a également été observée⁵¹⁸. Globalement, la sévérité de l'infection par le VRS a été associée à une immunité innée dérégulée, une diminution de la réponse Th1, une augmentation de la réponse inflammatoire et une altération du recrutement des neutrophiles^{46,527,528}. De plus, des études réalisées sur des ANP ont montré que lors d'une infection sévère à VRS, l'IFN- γ était sous-exprimé^{157,162,247,249,251,252} alors que les cytokines IL-1 β ^{245,256}, IL-6^{245,248,256,529}, IL-8^{245,253,256} et macrophages inflammatory protein-1 β (MIP-1 β)^{245,248} étaient surexprimées.

Ces discordances peuvent s'expliquer par plusieurs facteurs. Premièrement, il peut s'agir d'un artefact technique. En effet, seuls 68% des échantillons étaient de qualité suffisante pour être interprétables mais nous ne pouvons pas exclure la possibilité que l'ARN des échantillons ait été trop dégradé pour observer un vrai signal. Une autre possibilité est que pour certains échantillons, un grand nombre de reads n'étaient pas humaines, il se peut que pour certains échantillons le transcriptome viral ait été plus séquencé que le transcriptome humain.

Deuxièmement, il est possible qu'il y ait un artefact bioinformatique. En effet, la plupart des gènes identifiés comme différentiellement exprimés sont détectés uniquement chez une minorité de patients. Par exemple sur la **figure 31**, on observe 4 gènes sur les 6 représentés qui ne sont pas du tout présents chez les patients du groupe URTI. En raison de ces données manquantes, il est possible que DESeq2 ne soit pas le plus approprié pour nos analyses à moins

d'envisager un paramètre de filtration plus strict avec le retrait des gènes exprimés chez une minorité de patients (moins de 50% des patients par exemple). Néanmoins les gènes de l'inflammation sont quasi tous exprimés et donc au moins une partie des données serait interprétable. D'autres méthodes de normalisation des données sont également à envisager pour affiner nos résultats, avec l'utilisation d'un gène de ménage ou une normalisation de type CLR (Centered Log Ratio) par exemple.

Enfin, les analyses liées à notre cohorte sont limitées. En effet, il n'y a pas de patients « sains » afin de comparer nos résultats à un groupe contrôle. Bien que certaines études se contentent de comparer des groupes de patients sévères versus non sévères (sans groupe témoins), la clinique entre les patients de notre cohorte pourrait être peu discriminante, les nourrissons étant tous hospitalisés.

Par la suite, des analyses plus poussées seront réalisées en regardant et stratifiant les variables cliniques telles que la prématurité ou l'âge du nourrisson par exemple. En effet, il a été montré que les nourrissons nés prématurément sont 3 fois plus susceptibles d'être hospitalisés pour une infection par le VRS que les nourrissons nés à terme¹⁶⁸ et que cela pourrait être dû à des profils immunitaires différentiels de nourrissons nés prématurés, par exemple, des proportions de neutrophiles plus faibles⁵³⁰ ou une réduction de l'expression de TLR4 dans les monocytes⁵³¹. En ce qui concerne la variable de l'âge, des différences d'expression de certains gènes ont déjà été observées chez les nourrissons infectés par le VRS¹⁶⁰. En effet, Mejias *et al.*, ont montré que les nourrissons plus jeunes infectés par le VRS (< 6 mois) présentaient une expression réduite des gènes liés à l'immunité innée et adaptative par rapport aux nourrissons plus âgés tout aussi malades (6 à 24 mois), indiquant une immunité globale supprimée chez les nourrissons plus jeunes¹⁶⁰.

Etant donné la faible taille de notre cohorte, il pourrait être intéressant d'analyser des voies biologiques en regroupant des gènes apparentés plutôt que de regarder les niveaux d'expressions de chaque gène comme cela a été réalisé mais sur des prélèvements sanguins⁵³². Par ailleurs, 3 clusters de patients étaient visibles sur les profils inflammatoires, il serait intéressant de regarder si ces clusters sont associés à une variable clinique particulière ou encore à un des profils de bactériome. Nos analyses nous permettront aussi de regarder le transcriptome viral afin de voir si certains transcrits viraux sont plus abondants et s'il peut y avoir une association avec la sévérité.

A noter que même avec des analyses plus approfondies, cette étude comportera plusieurs limites. Tout d'abord la petite taille de la cohorte sur laquelle nous avons analysé le transcriptome qui rend difficile l'utilisation de certains tests statistiques. Ensuite, comme pour les autres axes d'études, des différences dans la méthode de classification des critères de gravité de l'IRA à VRS peuvent conduire à des résultats contradictoires. Enfin, dans le contexte de cette analyse, il sera impossible d'établir si les différences d'expression de gènes ou encore les éventuelles associations microbiome-transcriptome identifiées sont la cause de la sévérité de l'IRA (si le microbiome influence la réponse transcriptomique, ou vice versa). Sans collecte de données chez les nourrissons avant l'infection par le VRS, nous ne pourrions qu'émettre l'hypothèse que ces associations pourrait aider à prévenir ou à minimiser l'impact de l'infection par le VRS.

Cependant, le point innovant est que la majorité des études transcriptomiques précédentes se sont concentrées sur les profils transcriptionnels sanguins^{160,321,527,533–535}. Bien que les cellules du sang périphérique soient impliquées dans la réponse immunitaire, elles ne sont pas directement infectées par le VRS et ne peuvent pas refléter les changements de composition des cellules immunitaires des voies respiratoires (principal site d'infection par le VRS)⁵³⁶. Par conséquent, l'analyse du transcriptome des échantillons respiratoires peut permettre d'obtenir des informations précieuses sur la pathogenèse du VRS.

5. Conclusion

Des analyses plus approfondies sont nécessaires avant de tirer des conclusions définitives. Le RNA-Seq pourrait permettre d'identifier des biomarqueurs spécifiques pour prédire les résultats après une infection par le VRS chez le nourrisson. Ces études de RNA-Seq pourraient également s'avérer utile pour quantifier la réponse à un vaccin anti-VRS par exemple, en s'assurant que ce vaccin ne provoque pas une réponse de l'hôte similaire à la réponse pouvant conduire à un état pathologique sévère. Des signatures multigéniques pourraient également contribuer à l'étude de futures cibles médicamenteuses contre l'infection par le VRS.

Partie C : Conclusion Générale

De nombreux facteurs sont associés à la pathogenèse du VRS notamment des facteurs liés au virus, à l'hôte, ou à l'environnement^{334,537}. Cependant les mécanismes qui expliquent la grande variabilité des symptômes ne sont pas complètement compris et ces facteurs même combinés n'expliquent pas entièrement pourquoi certains nourrissons développent une forme sévère de la maladie et d'autres non. Des études récentes suggèrent que l'interaction complexe entre le microbiome respiratoire, la réponse immunitaire de l'hôte et le virus peut avoir un impact sur la pathogenèse et la gravité de l'infection par le VRS^{270,272,290,313,393}. D'autres études ont démontré que la sévérité de l'infection était liée à une réponse immunitaire déséquilibrée^{514,537}. Les interactions entre les composants viraux et bactériens du microbiome, appelées interactions trans-règles, sont de plus en plus impliquées dans la santé et la maladie, mais n'ont pas encore été définies dans les voies respiratoires, notamment en pédiatrie où les échantillons sont souvent difficiles à obtenir pour des raisons à la fois techniques et éthiques.

Dans cette étude, nous avons d'abord caractérisé séparément la composition du bactériome, du virome et du transcriptome de l'hôte au niveau respiratoire à partir d'une collection prospective d'échantillons respiratoires de nourrissons souffrant d'une IRA plus ou moins sévère. Le but principal était de mettre en évidence les compositions du virome et du bactériome ainsi que les réponses transcriptomiques respiratoires de l'hôte à l'infection associées aux IRA sévères.

Concernant le bactériome, cette étude a mis en évidence la présence de profils de microbiome distincts dans le tractus nasopharyngé des enfants, les profils à dominante *Haemophilus*, *Moraxella* et *Streptococcus* étant les plus répandus. Bien que nous n'ayons pas pu mettre en lumière des associations significatives entre les profils du microbiome et la sévérité de la maladie, la détection prédominante des profils susmentionnés, par rapport aux profils dominés par les genres bactériens *Corynebacterium* ou *Dolosigranulum* fréquemment trouvés chez les enfants en bonne santé, indique des associations potentielles entre la composition du microbiome et les IRA.

Concernant le virome, les familles les plus représentées (hors *Pneumoviridae*) étaient les *Phenuiviridae*, les *Anelloviridae*, les *Picornaviridae* et les *Retroviridae*. De nombreuses coinfections avec des virus respiratoires et avec des phages ont été observées. Aucune

différence significative de composition au niveau des familles virales entre les échantillons les groupes URTI et LRTI n'ont été observée. Le genre *TTMV* de la famille des *Anelloviridae* était majoritairement présent dans les prélèvements respiratoires et certaines espèces (*TTMV 3*, *TTMV 6* et *TTMV 9*) étaient même significativement associée à la sévérité. Les *TTMV* sont des virus ubiquitaires dont l'implication dans la maladie respiratoire reste à déterminer^{491,538}. Les *Anelloviridae* pourraient contribuer aux maladies respiratoires en activant la production de cytokines inflammatoires^{376,488}. Les *TTMV* ont d'ailleurs été identifié dans plusieurs contextes pathogènes ce qui suggère une association possible entre l'infection par le *TTMV* et l'inflammation^{489,500,502,538}. Une récente étude a mis en évidence la structure d'une des espèces de *TTMV* : *TTMV LY1*⁵³⁹. Cette découverte pourrait être utilisée pour de futures recherches, notamment l'échappement face au système immunitaire et les interactions potentielles avec celui-ci. Concernant son rôle potentiel dans la maladie respiratoire, des cohortes pédiatriques plus importantes avec un groupe de contrôle sain sont nécessaires. Cette étude met tout de même en lumière une grande variabilité interindividuelle, ainsi qu'une acquisition rapide du virome après la naissance.

En ce qui concerne les analyses préliminaires du transcriptome de l'hôte, aucun regroupement n'a pu être effectué en regardant les gènes de l'immunité et les cytokines inflammatoires bien que 3 clusters de patients semblent se différencier. L'étude de l'association avec les données cliniques est en cours.

Pour chacun des axes nous nous sommes heurtés à des obstacles similaires concernant la cohorte et la méthode de classification de la sévérité des IRA. Compte tenu de la taille relativement faible de notre cohorte par rapport au nombre de variables examinées, nous nous sommes retrouvés face à un manque de puissance évident pour obtenir des statistiques significatives. Néanmoins, nos données apportent un soutien significatif aux études déjà réalisées notamment sur l'axe bactériome qui reste le plus étudié. Grâce à cette étude descriptive et exploratoire, il serait intéressant d'envisager le même travail sur une cohorte plus grande. De plus, l'absence d'un groupe d'enfants en bonne santé comme groupe témoin, nous empêche de déterminer si les modifications du microbiome et du transcriptome pourraient être liées ou non à la survenue d'une IRA. Une étude longitudinale comprenant des échantillons respiratoires prélevés avant, pendant et après une IRA, serait idéale pour mettre en lumière les interactions entre les pathogènes et la flore ainsi que l'évolution du profil

transcriptomique au cours de l'infection. Enfin, des différences dans la méthode de classification des critères de gravité de l'IRA à VRS entre les études publiées et la nôtre, ont pu conduire à des résultats contradictoires. En l'absence d'un score de référence, il est difficile de comparer les résultats entre études puisque les critères de sévérité sont différents entre les hôpitaux et les pays⁴⁶. Un système de notation universellement appliqué serait donc bénéfique pour étudier les biomarqueurs liés à la sévérité des IRA mais aussi pour pouvoir comparer les différentes études entre elles.

En dehors des limites liées à la cohorte, des problèmes techniques ont été rencontrés notamment concernant la standardisation des protocoles wet et dry lab. Comme décrit dans l'article "**Comparison of Nucleic Acid Extraction Methods for a Viral Metagenomics Analysis of Respiratory Viruses**", les différents protocoles (extraction, déplétion, enrichissement, amplification) peuvent avoir un impact sur la qualité des résultats. A noter que d'après cette étude, l'extracteur montrant les meilleurs résultats en introduisant le moins de biais était l'Emag (extracteur utilisé pour les extractions de cette thèse). Malgré cela, une contamination majeure lors de l'extraction nous a empêché d'analyser le 2^{ème} run de séquençage, d'où l'importance d'ajouter des contrôles négatifs (NTC). La comparaison et développement de protocole de métagénomique est important notamment pour la surveillance épidémiologique de virus (ré)émergents tel que l'EV-68 depuis 2014 ou plus récemment le SARS-CoV-2 (**Annexe 1 et 2**). Concernant le virome, une possible compétition avec le VRS présent à des charges élevées dans chaque échantillon a pu réduire la sensibilité de notre analyse en masquant la présence d'autres virus présents en plus faible quantité. De plus, il n'existe pas à ce jour de pipeline standard pour l'analyse du virome. Dans notre étude, il n'a pas été possible de réaliser des analyses spécifiques au niveau du genre ou de l'espèce par exemple car l'assignation taxonomique manquait de spécificité. Les récents projets étudiant le virome utilisent une approche *de novo* afin de descendre dans la taxonomie et ainsi réaliser des analyses plus précises. Les différentes étapes utilisées lors de l'analyse bio-informatique peuvent contribuer de manière significative à la variabilité des résultats et dans certains cas à des conclusions contradictoires entre les études²⁸⁸. De plus, les bases de données spécifiques aux virus doivent être améliorées de manière significative en ajoutant davantage de séquences virales. En effet, les premières études sur le virome digestif ont été affectées par le manque de séquences de référence dans les bases de données empêchant d'exploiter

l'intégralité des données recueillies⁵⁴⁰. Depuis nos analyses, de nombreux pipelines ont été publiés pour l'analyse du virome⁵⁴¹⁻⁵⁴⁴, mais les caractéristiques intrinsèques des virus (taxonomie incomplète notamment au niveau des phages et des espèces, grand nombre de séquences lié à la "matière noire virale", absence de marqueur universel comme pour les bactéries, ...) rendent la tâche difficile. La mise en place de stratégies pour parvenir à une plus grande standardisation entre les études (protocole et analyse bio-informatique) est nécessaire pour soutenir les futures méta-analyses à grande échelle sur le microbiome respiratoire.

Dans cette étude, nous n'avons finalement pas pu analyser les interactions entre virome, bactériome et transcriptome de l'hôte. En effet, sur les 144 échantillons de la cohorte, seulement 79 échantillons ont pu être analysé en raison de la contamination lors de l'extraction pour l'axe bactériome ; 36 échantillons (avec détection du contrôle interne) peuvent être utilisés pour l'analyse du virome parmi les 53 échantillons sélectionnés initialement car provenant d'enfants < 7 mois atteints de bronchiolite et malheureusement 36 échantillons différents parmi ces 53 étaient exploitables en transcriptome. Au final, nous avons pu obtenir un séquençage pour les 3 axes uniquement pour 16 échantillons (**Figure 39**) rendant impossible le croisement des données pour cette cohorte.

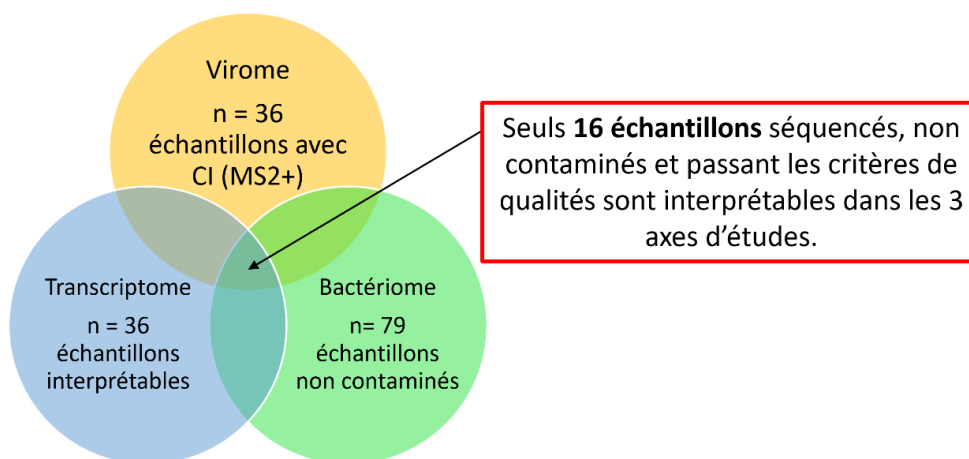


Figure 39 Diagramme de Venn indiquant le nombre d'échantillons interprétables par axe d'étude.

Sur les 144 échantillons totaux de la cohorte, 79 étaient interprétable pour l'axe bactériome en raison d'une contamination lors de l'extraction. Pour le virome et le transcriptome 53 échantillons VRS positif

et prélevés sur des enfants de moins de 7 mois ont été séquencés. Pour le virome, le contrôle interne était retrouvé pour 36 échantillons. Pour le transcriptome, 36 échantillons étaient interprétables.

Abréviation : CI : contrôle interne

Malgré le manque de résultats significatifs, des solutions sont envisageables pour obtenir d'autres données avec notre cohorte. Pour réduire le nombre de variable, une analyse des profils majoritaires viraux (profil du virome dominé par les virus d'eucaryote, profil dominant *Anelloviridae* et un profil dominant bactériophages) pourrait être réalisée, ou au contraire une analyse des contigs après assemblage de novo pourrait apporter des informations sur de nouveaux virus du virome. Des analyses supplémentaires des données mRNA-Seq pourraient aussi permettre d'analyser le transcriptome viral afin de voir si certains transcrits viraux sont plus abondants et en lien avec la sévérité.

Une collaboration avec le service des soins critiques – Réanimation de Lyon sud a été envisagée afin de mettre en lien une de leur étude sur la corrélation entre les données de pollution et les admissions en réanimation et notre étude sur la composition du microbiome respiratoire à partir des données atmosphériques relevées à Lyon (données jour par jour avec la température, les particules en suspension (PM), l'ozone (O₃), le protoxyde d'azote (N₂O) et le dioxyde de soufre (SO₂) dans différents points de l'agglomération lyonnaises). En effet, notre système respiratoire est constamment exposé aux substances toxiques de l'environnement qui sont connues pour déclencher une réponse immunitaire dérégulée pouvant conduire à une altération de la fonction pulmonaire et au développement de maladies respiratoires⁵⁴⁵. La façon dont le microbiome respiratoire peut réagir face à l'exposition environnementale n'est pas encore très claire. Une récente étude chinoise a montré que le microbiome des voies respiratoires peut à la fois être influencé par l'exposition et moduler à son tour son impact sur la santé respiratoire⁵⁴⁶. Une telle étude sur nos données serait intéressante pour l'étude des associations entre microbiome-exposome et sévérité de la bronchiolite.

Un protocole de métatranscriptomique permettant le séquençage simultané du virome, du bactériome et du transcriptome de l'hôte, a également été développé au sein de notre équipe (**Annexe 3**). Dans cette étude, une comparaison de la concordance des résultats obtenus entre trois approches indépendantes pour chaque axe et la métatranscriptomique a été étudiée. Cette méthode de métatranscriptomique pourrait être un bon choix pour l'identification des

co-infections virales dans le microbiome respiratoire et pourrait réduire le temps, le coût et les risques de contamination des études sur le microbiome et aider à différencier les microorganismes actifs des microorganismes latents. La métatranscriptomique a été utilisée en routine pour la surveillance épidémiologique du VRS entre 2019 et 2022, avec des données disponibles pour 531 enfants <2 ans hospitalisés aux HCL. L'analyse des données du microbiote actif et du transcriptome du patient en lien avec les données cliniques aurait une bien meilleure puissance statistique que l'étude réalisée dans cette thèse. Elle requiert néanmoins un accord éthique des patients qui a été donné pour l'instant uniquement pour l'étude épidémiologique du VRS.

Un projet semblable à VibraFlu est en cours de réalisation au sein de notre équipe. L'étude BMiG (Biomarqueurs du microbiome respiratoire pour prédire l'évolution clinique de la grippe chez l'enfant) prévoyait initialement le recrutement de 330 patients sur 3 ans. Un prélèvement respiratoire haut (ANP) ainsi que, si possible, un prélèvement respiratoire bas (aspiration trachéobronchique et lavage broncho alvéolaire) ont été réalisés à J0, J1, J2 et J5. Les prélèvements destinés à l'étude du transcriptome ont été directement placés dans du RNA later pour éviter la dégradation des ARNs. Les inclusions pour ce projet ont débuté en 2018 et seulement 145 enfants (<5 ans) admis aux urgences ou hospitalisés pour grippe sur 3 saisons (2018/2019, 2019/2020, 2021/2022) ont pu être inclus en raison du turnover important des médecins aux urgences. L'analyse du microbiote bactérien (séquençage V3-V4 du gène de l'ARN 16S) a été réalisé sur la plateforme GenEPII pour tous les prélèvements et l'analyse statistique est en cours en collaboration avec le Dr Bardel (LBBE). Les autres composantes du microbiome et la réponse transcriptomique de l'hôte seront analysées sur les prélèvements J0 via un nouveau protocole de métatranscriptomique développé et automatisée sur la plateforme GENEPII depuis 2022. A ce jour, aucune étude n'a été publiée sur l'association entre microbiote bactérien respiratoire et sévérité de la grippe chez l'enfant.

Une autre étude du laboratoire qui a été mise de côté pour le moment en l'absence de financement est l'étude ViBRaCov (Interactions Virome-Bactériome-Transcriptome impliquées dans la pathogenèse du Covid-19 chez l'enfant). Cette étude avait pour objectif d'étudier l'impact de la composition du microbiome respiratoire (virome/bactériome) et de la réponse de l'hôte (transcriptomique) lors d'une infection par le Sars-Cov-2 chez l'enfant. A partir des prélèvements respiratoires déjà réalisés, le séquençage des virus et bactéries

présents dans les échantillons devait être réalisé. En parallèle, afin de regarder la réponse immunitaire de l'hôte en réponse à l'infection et d'identifier d'éventuels des biomarqueurs pronostiques, le séquençage du transcriptome devait être effectué. Les résultats devaient être analysés en lien avec les informations cliniques (complications infectieuses, traitement antibiotiques, traitement antiviraux, etc). Cette cohorte a pour avantage d'avoir des patients « sains » qui pourront servir de groupe témoin. Cette étude reste très intéressante car bien que beaucoup d'études soient en cours ou publiées sur le Sars-Cov-2, le microbiome respiratoire et la sévérité de l'infection ; la majorité de ces études sont réalisées sur des cohortes d'adulte⁵⁴⁷⁻⁵⁴⁹.

En résumé, le développement du microbiome respiratoire est complexe et dynamique. L'évaluation de sa contribution sur la sévérité de la maladie lors des IRA est encore mal comprise bien qu'elle soit de plus en plus étudiée^{510,550}. Les options thérapeutiques limitées pour les enfants atteints d'une infection sévère par le VRS soulignent l'importance de la compréhension globale de la réponse immunitaire de l'hôte au cours de l'infection et du rôle du microbiome respiratoire dans celle-ci. Il est important de comprendre les interactions complexes entre les micro-organismes du microbiome respiratoire et les pathogènes potentiels et leurs conséquences à court et à long terme sur la santé pour améliorer le diagnostic, le traitement et la prévention de l'IRA pédiatrique. Générer des profils microbiens spécifiques permettant de discriminer la santé, des formes sévères de la maladie pourraient permettre aux cliniciens de prendre des décisions concernant la ventilation, ou encore la transplantation de nouveaux microbiomes. La découverte de biomarqueurs pronostiques permettrait donc d'améliorer la prise en charge et les soins des enfants souffrant d'IRA mais aussi sur le long terme de développer des thérapies personnalisées innovantes en ciblant les micro-organismes délétères du microbiome respiratoire par exemple.

Annexes : Autres travaux réalisés pendant la thèse

Annexe 1

Emergence of enterovirus D68 clade D1, France, August to November 2018

Antonin Bal, Marina Sabatier, Thierry Wirth, Marianne Coste-Burel, Mouna Lazrek, Karl Stefic, Karen Brengel-Pesce, Florence Morfin, Bruno Lina, Isabelle Schuffenecker, Laurence Josset.

Rapid communication

We report a seasonal increase of enterovirus D68 (EVD68) cases in France, with 54 cases detected between 19 August and 14 November 2018. Molecular typing revealed that 20 of 32 of the isolates belonged to clade D1, only sporadically detected before in France. Median age of D1-cases was 42 years, 10 developed severe respiratory signs and one had neurological complications. The 2018-D1 viruses showed a genetic divergence of 3.34 % with D1 viruses identified previously.

<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.3.1800699>

Annexe 2

Evaluation of NGS-based approaches for SARS-CoV-2 whole genome characterisation

Caroline Charre, Christophe Ginevra, Marina Sabatier, Hadrien Regue, Grégory Destras, Solenne Brun, Gwendolyne Burfin, Caroline Scholtes, Florence Morfin, Martine Valette, Bruno Lina, Antonin Bal, and Laurence Josset.

Abstract

Since the beginning of the COVID-19 outbreak, SARS-CoV-2 whole-genome sequencing (WGS) has been performed at unprecedented rate worldwide with the use of very diverse Next-Generation Sequencing (NGS) methods. Herein, we compare the performance of four NGS-based approaches for SARS-CoV-2 WGS. Twenty-four clinical respiratory samples with a large scale of Ct values (from 10.7 to 33.9) were sequenced with four methods. Three used Illumina sequencing: an in-house metagenomic NGS (mNGS) protocol and two newly commercialised kits including a hybridisation capture method developed by Illumina (DNA Prep with Enrichment kit and Respiratory Virus Oligo Panel, RVOP), and an amplicon sequencing method developed by Paragon Genomics (CleanPlex SARS-CoV-2 kit). We also evaluated the widely used amplicon sequencing protocol developed by ARTIC Network and combined with Oxford Nanopore Technologies (ONT) sequencing. All four methods yielded near-complete genomes (>99%) for high viral loads samples ($n = 8$), with mNGS and RVOP producing the most complete genomes. For mid viral loads (Ct 20–25), amplicon-based enrichment methods led to genome coverage >99 per cent for all samples while 1/8 sample sequenced with RVOP and 2/8 samples sequenced with mNGS had a genome coverage below 99 per cent. For low viral loads (Ct 25), amplicon-based enrichment methods were the most sensitive techniques. All methods were highly concordant in terms of identity in complete consensus sequence. Just one mismatch in three samples was observed in CleanPlex vs the other methods, due to the dedicated bioinformatics pipeline setting a high threshold to call SNP compared to reference sequence. Importantly, all methods correctly identified a newly observed 34nt-deletion in ORF6 but required specific bioinformatic validation for RVOP. Finally, as a major warning for targeted techniques, a loss of coverage in any given region of the genome should alert to a potential rearrangement or a SNP in primer-annealing or probe-hybridizing regions and would require further validation using unbiased metagenomic sequencing.

doi: 10.1093/ve/veaa075

Annexe 3

Analysis of the nasopharyngeal microbiome in infants suffering from respiratory viral infections: a comparison between independent single-kingdom approaches and an all-in-one metatranscriptomics method.

Destras G, Sabatier M, Simon B, Semanas Q, Lina B, Bal A and Josset.

Poster

Background: Respiratory infections represents the main cause of morbidity and mortality in children under 5 years old. A dysregulation among the different components of the respiratory microbiome (bacteriome, virome, mycobiome, host-immune response) may influence the clinical outcome. Targeted sequencing of each component of the microbiome have been deployed in the last decades, using 16S and ITS amplicon sequencing for the bacteriome and mycobiome, respectively, and viral metagenomics for the virome and mRNA-Seq for the host transcriptome. In contrast, metatranscriptomics allows an all-in-one analysis of all active microorganisms present within a sample, also including host-immune expression. In this study, we aimed to compare the concordance of the results obtained between three independent single-kingdom approaches and metatranscriptomics.

Methods: Nasopharyngeal samples from a cohort of 67 infants under 7 months, consulting at the pediatric emergency unit of Hospices Civils de Lyon for Respiratory Syncytial Virus (RSV) or influenza virus infection during winters 2015-2017, were selected. The study of bacteriome was performed using targeted 16S RNA V1-V3 sequencing, virome was analyzed with a metagenomics method after viral enrichment (filtration, centrifugation and DNase before extraction), and mRNA-Seq was used for host immune inflammation investigation. The metatranscriptomics method was performed using the Revelo kit (Tecan Diagnostic).

Results and discussion: The analysis of the concordance of bacterial OTUs, viruses and inflammatory genes detection is ongoing as well as the agreement for the co-identification of pathogens between the two approaches. Agreement between techniques likely depends of the competition for sequencing and of the abundance of each kingdom. As RNA viruses are major pathogens for respiratory infections, a metatranscriptomics method might be a good choice for the identification of viral co-infections in respiratory microbiome. Such a tool might

reduce the time/cost of microbiome investigation and help to differentiate active from latent microorganisms.

Analysis of the nasopharyngeal microbiome in infants suffering from respiratory viral infections: a comparison between independent single-kingdom approaches and an all-in-one metatranscriptomics method



Gregory Destras^{1,2,3}, Marina Sabatier¹, Bruno Simon^{2,3}, Quentin Semanas^{2,3}, Bruno Lina^{1,2,3}, Antonin Bal^{1,2,3} and Laurence Josset^{1,2,3}







1- Virologie et Pathologie Humaine (Virpath) - CIRI - INSERM U1111 - Lyon - France

2- Laboratoire de Virologie - Institut des Agents Infectieux - Hospices Civils de Lyon - Lyon - France

3- Génomique Épidémiologique des Maladies Infectieuses (genEPII) - Hospices Civils de Lyon - Lyon - France

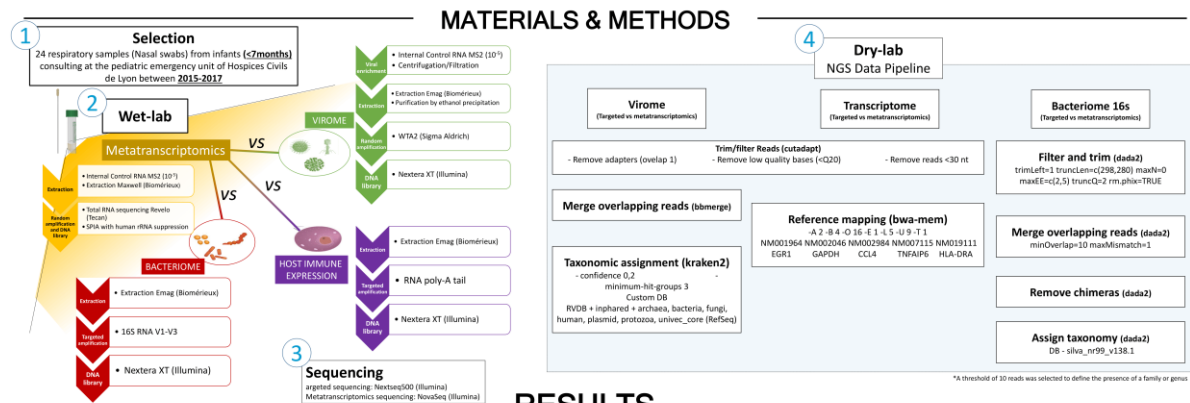
Hospices Civils de Lyon

GÉNOMIQUE ÉPIDÉMIOLOGIQUE des Maladies Infectieuses

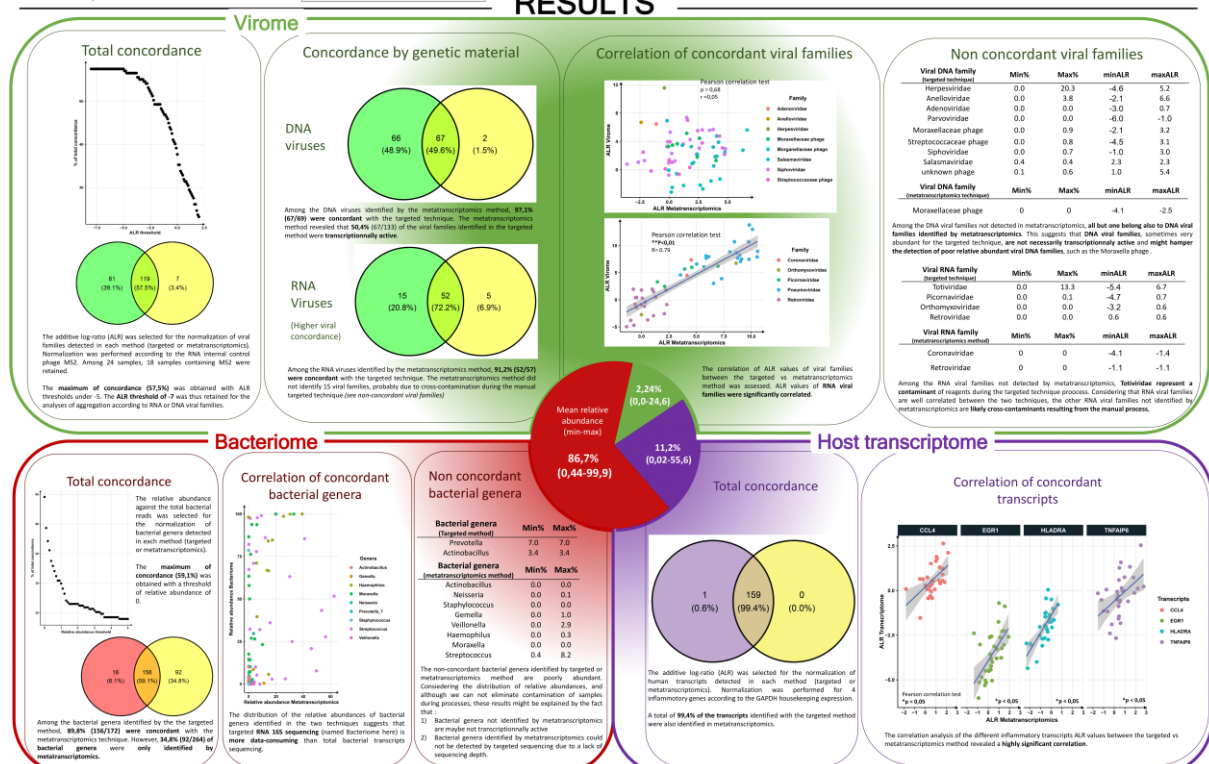
BACKGROUND

Since the last decades, **TARGETED SEQUENCING** of the microbiome allows to study independently **virome**, **bacteriome**, **host transcriptome**. **METATRANSCRIPTOMICS** allows an all-in-one analysis of **all active microorganisms** (including virome and bacteriome) present within a sample, also including **host-immune expression**.

AIM: To compare the CONCORDANCE of the results obtained BETWEEN INDEPENDENT SINGLE-KINGDOM APPROACHES and METATRANSCRIPTOMICS



RESULTS



CONCLUSION

This study suggests that the all-in-one process of **metatranscriptomics** performs as well as single-kingdom approaches, such as for RNA virome or host transcriptome investigation, while the technique may bring additional informations, notably about the differentiation between active or latent DNA microbiome.

As RNA viruses are major pathogens for respiratory infections, a metatranscriptomics method might be a good choice for the identification of viral co-infections in respiratory microbiome. Such a tool might reduce the time/cost of microbiome investigation and help to differentiate active from latent microorganisms in clinical cases.

Bibliographie

1. Demoré, B. & Charmillon, A. Traitement des infections respiratoires basses et hautes. in *Pharmacie Clinique et Thérapeutique* 801-814.e1 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-2-294-75077-9.00044-X.
2. van den Bergh, M. R. *et al.* Associations between Pathogens in the Upper Respiratory Tract of Young Children: Interplay between Viruses and Bacteria. *PLoS ONE* **7**, e47711 (2012).
3. Nair, H. *et al.* Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet* **375**, 1545–1555 (2010).
4. Stupka, J. E., Mortensen, E. M., Anzueto, A. & Restrepo, M. I. Community-acquired pneumonia in elderly patients. *Aging Health* **5**, 763–774 (2009).
5. Benito, N., Moreno, A., Miro, J. M. & Torres, A. Pulmonary infections in HIV-infected patients: an update in the 21st century. *European Respiratory Journal* **39**, 730–745 (2012).
6. Figueiredo-Mello, C., Naucler, P., Negra, M. D. & Levin, A. S. Prospective etiological investigation of community-acquired pulmonary infections in hospitalized people living with HIV. *Medicine* **96**, e5778 (2017).
7. Díaz-Chiguer, D. L. *et al.* Detection and molecular characterization of respiratory viruses that cause acute respiratory infection in the adult population. *GMM* **155**, 3214 (2019).
8. de Steenhuijsen Piters, W. A. A., Binkowska, J. & Bogaert, D. Early Life Microbiota and Respiratory Tract Infections. *Cell Host & Microbe* **28**, 223–232 (2020).
9. Troy, N. M. & Bosco, A. Respiratory viral infections and host responses; insights from genomics. *Respir Res* **17**, 156 (2016).
10. Organisation mondiale de la Santé. Centre de traitement des infections respiratoires aiguës sévères : manuel pratique pour la mise en place et la gestion d'un centre de traitement des IRAS et d'une unité de dépistage des IRAS dans les établissements de soins. Organisation mondiale de la Santé. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331756> (2020).
11. Brouard, J., Vallet, C., Marie, J. & Faucon, C. Les séquelles de virose en pneumopédiatrie. *Perfectionnement en Pédiatrie* **3**, 176–181 (2020).
12. Roser, M., Ritchie, H. & Dadonaite, B. Child and Infant Mortality. *Our World in Data* (2013).
13. World Health Organization, Pandemic and Epidemic Diseases, & World Health Organization. *Infection prevention and control of epidemic- and pandemic-prone acute respiratory infections in health care: WHO guidelines*. (2014).
14. Brucker, G. Le syndrome Respiratoire Aigu Sévère (SRAS). Première épidémie du XXI^e siècle. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* **187**, 977–981 (2003).
15. The World Health Organization Global Influenza Program Surveillance Network. Evolution of H5N1 Avian Influenza Viruses in Asia. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 1515–1526 (2005).
16. Michaelis, M., Doerr, H. W. & Cinatl, J. An influenza A H1N1 virus revival – pandemic H1N1/09 virus. *Infection* **37**, 381 (2009).
17. Bundschuh, M. & Klingelhofer, D. MERS-CoV: Ein aktueller Überblick. *Zbl Arbeitsmed* **63**, 296–297 (2013).
18. Chen, Y. *et al.* Human infections with the emerging avian influenza A H7N9 virus from wet market poultry: clinical analysis and characterisation of viral genome. *The Lancet* **381**, 1916–1925 (2013).
19. Wu, F. *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* (2020) doi:10.1038/s41586-020-2008-3.

20. Régnier, S. A. & Huels, J. Association Between Respiratory Syncytial Virus Hospitalizations in Infants and Respiratory Sequelae: Systematic Review and Meta-analysis. *Pediatric Infectious Disease Journal* **32**, 820–826 (2013).
21. Leruez-Ville, M. Diagnostic virologique des infections respiratoires☆. *Archives de Pédiatrie* **14**, 404–409 (2007).
22. Brouard, J., Flammang, A., L, Dina, J. & Vabret, A. Infections respiratoires aiguës virales des voies aériennes inférieures. *EMC - Pédiatrie* **13**, 11 (2018).
23. Hishiki, H. *et al.* Incidence of bacterial coinfection with respiratory syncytial virus bronchopulmonary infection in pediatric inpatients. *Journal of Infection and Chemotherapy* **17**, 87–90 (2011).
24. Siegel, S. J. & Weiser, J. N. Mechanisms of Bacterial Colonization of the Respiratory Tract. *Annu. Rev. Microbiol.* **69**, 425–444 (2015).
25. Esposito, S. *et al.* Characteristics of *Streptococcus pneumoniae* and Atypical Bacterial Infections in Children 2–5 Years of Age with Community-Acquired Pneumonia. *CLIN INFECT DIS* **35**, 1345–1352 (2002).
26. Juvén, T. *et al.* Etiology of community-acquired pneumonia in 254 hospitalized children: *The Pediatric Infectious Disease Journal* **19**, 293–298 (2000).
27. Bellinghausen, C. *et al.* Exposure to common respiratory bacteria alters the airway epithelial response to subsequent viral infection. *Respir Res* **17**, 68 (2016).
28. Bosch, A. A. T. M., Biesbroek, G., Trzcinski, K., Sanders, E. A. M. & Bogaert, D. Viral and Bacterial Interactions in the Upper Respiratory Tract. *PLoS Pathog* **9**, e1003057 (2013).
29. Simoes, E. A. F. Environmental and demographic risk factors for respiratory syncytial virus lower respiratory tract disease. *The Journal of Pediatrics* **143**, 118–126 (2003).
30. Shi, T. *et al.* Risk factors for respiratory syncytial virus associated with acute lower respiratory infection in children under five years: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Global Health* **5**, 020416 (2015).
31. Shi, T. *et al.* Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *The Lancet* **390**, 946–958 (2017).
32. Marmot, M. & Wilkinson, R. G. *Les déterminants sociaux de la santé: les faits*. (OMS Bureau régional de l'Europe, 2000).
33. Ngombe, L. K. *et al.* Acute respiratory infection and nutritional status in children 0-5 years: case of university clinics of Lubumbashi, Democratic Republic of Congo. *Pan Afr Med J* **19**, 393 (2014).
34. Ralston, S. L. *et al.* Clinical Practice Guideline: The Diagnosis, Management, and Prevention of Bronchiolitis. *PEDIATRICS* **134**, e1474–e1502 (2014).
35. Beaudry, M., Dufour, R. & Marcoux, S. Relation between infant feeding and infections during the first six months of life. *The Journal of Pediatrics* **126**, 191–197 (1995).
36. Guo, C. *et al.* Breastfeeding restored the gut microbiota in caesarean section infants and lowered the infection risk in early life. *BMC Pediatrics* **20**, (2020).
37. World Health Organizatio. Effect of breastfeeding on infant and child mortality due to infectious diseases in less developed countries: a pooled analysis. WHO Collaborative Study Team on the Role of Breastfeeding on the Prevention of Infant Mortality. *Lancet* **355**, 451–455 (2000).
38. WORLD HEALTH ORGANIZATION. THE OPTIMAL DURATION OF EXCLUSIVE BREASTFEEDING. https://www.who.int/nutrition/publications/optimal_duration_of_exc_bfeeding_report_eng.pdf (2002).

39. Bachrach, V. R. G., Schwarz, E. & Bachrach, L. R. Breastfeeding and the Risk of Hospitalization for Respiratory Disease in Infancy: A Meta-analysis. *Arch Pediatr Adolesc Med* **157**, 237 (2003).
40. Lu, L. *et al.* Epidemiological and clinical profiles of respiratory syncytial virus infection in hospitalized neonates in Suzhou, China. *BMC Infect Dis* **15**, 431 (2015).
41. Lanari, M. *et al.* Risk factors for bronchiolitis hospitalization during the first year of life in a multicenter Italian birth cohort. *Ital J Pediatr* **41**, 40 (2015).
42. Auger, N. *et al.* Association of Cesarean Delivery with Childhood Hospitalization for Infections Before 13 Years of Age. *The Journal of Pediatrics* **231**, 178-184.e2 (2021).
43. Nakamura, M. M. *et al.* Pediatric Readmissions After Hospitalizations for Lower Respiratory Infections. *Pediatrics* **140**, e20160938 (2017).
44. Aidou, S. *et al.* Poumon et VIH. *Revue des Maladies Respiratoires* **36**, A218 (2019).
45. Tahamtan, A., Askari, F. S., Bont, L. & Salimi, V. Disease severity in respiratory syncytial virus infection: Role of host genetic variation. *Reviews in Medical Virology* **29**, e2026 (2019).
46. Öner, D. *et al.* Biomarkers for Disease Severity in Children Infected With Respiratory Syncytial Virus: A Systematic Literature Review. *The Journal of Infectious Diseases* jiaa208 (2020) doi:10.1093/infdis/jiaa208.
47. Meddour, Y. Vulnérabilité génétique et Covid-19 : impact sur le risque et l'évolution de la maladie. 5 (2020).
48. Van Goethem, N. *et al.* Revue systématique et méta-analyse des facteurs génétiques de l'hôte associés à la sévérité de la grippe. *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique* **70**, S219 (2022).
49. Fienemika, A. E., IN, O. & Best O. Prevalence of Acute Respiratory Infections among Children Under-Five Years old in A Hospital in Port Harcourt, Nigeria:A Two Year Follow-Up study. *J Respir Med*, Vol 2(1) (2018).
50. Leowski, J. Mortality from acute respiratory infections in children under 5 years of age: global estimates. *World Health Stat Q* **39**, 138–144 (1986).
51. Adedemy, J. Epidémiologie, clinique et facteurs associés aux infections respiratoires aiguës chez l'enfant de 0- 5 ans au Centre Hospitalier Départemental de Parakou (Benin). *Journal Africain de Pédiatrie et de Génétique Médicale* **2**, 47-53. (2017).
52. Organisation mondiale de la Santé. Un environnement sain pour les enfants : OMS/Point de repère N°3, avril 2003. <https://www.who.int/world-health-day/previous/2003/backgrounder/fr/> (2003).
53. Organisation mondiale de la Santé. Pneumonie. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia> (2019).
54. Kafando, B. *et al.* Pollution de l'air intérieur et prévalence des infections respiratoires aiguës chez les enfants à Ouagadougou. *Santé Publique* **30**, 575 (2018).
55. Mourez, T., Burrel, S., Boutolleau, D. & Pillet, S. *Traité de virologie médicale*. (2019).
56. Obando-Pacheco, P. *et al.* Respiratory Syncytial Virus Seasonality: A Global Overview. *The Journal of Infectious Diseases* **217**, 1356–1364 (2018).
57. Meerhoff, T. J., Paget, J. W., Kimpen, J. L. & Schellevis, F. Variation of Respiratory Syncytial Virus and the Relation With Meteorological Factors in Different Winter Seasons. *Pediatric Infectious Disease Journal* **28**, 860–866 (2009).
58. Freymuth, F. Virus respiratoire syncytial et virus para-influenza humains : clinique. *EMC - Pédiatrie* **1**, 18–27 (2004).

59. Willson, D. F., Landrigan, C. P., Horn, S. D. & Smout, R. J. Complications in infants hospitalized for bronchiolitis or respiratory syncytial virus pneumonia. *The Journal of Pediatrics* **143**, 142–149 (2003).
60. Mammas, I. *et al.* Update on current views and advances on RSV infection (Review). *Int J Mol Med* **46**, 509–520 (2020).
61. Gorcea, C. M. *et al.* Effective use of oral ribavirin for respiratory syncytial viral infections in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients. *Journal of Hospital Infection* **95**, 214–217 (2017).
62. Foulongne, V. & Segondy, M. [Human bocavirus (HBoV)]. *Pathol Biol (Paris)* **57**, 197–202 (2009).
63. Gouarin, S. *et al.* Study of influenza C virus infection in France. *J. Med. Virol.* **80**, 1441–1446 (2008).
64. Vabret, A. *et al.* La grippe saisonnière. *Pathologie Biologie* **58**, e51–e57 (2010).
65. Cavallazzi, R. & Ramirez, J. A. Influenza and Viral Pneumonia. *Clinics in Chest Medicine* **39**, 703–721 (2018).
66. Kalil, A. C. & Thomas, P. G. Influenza virus-related critical illness: pathophysiology and epidemiology. *Crit Care* **23**, 258 (2019).
67. Loregian, A., Mercorelli, B., Nannetti, G., Compagnin, C. & Palù, G. Antiviral strategies against influenza virus: towards new therapeutic approaches. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 3659–3683 (2014).
68. Yen, H.-L. Current and novel antiviral strategies for influenza infection. *Current Opinion in Virology* **18**, 126–134 (2016).
69. Jordan, P. C., Stevens, S. K. & Deval, J. Nucleosides for the treatment of respiratory RNA virus infections. *Antivir Chem Chemother* **26**, 2040206618764483 (2018).
70. Furuta, Y., Komeno, T. & Nakamura, T. Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **93**, 449–463 (2017).
71. Freymuth, F. *et al.* Métapneumovirus humain. *Pathologie Biologie* **57**, 133–141 (2009).
72. Vabret, A., Dina, J., Brison, E., Brouard, J. & Freymuth, F. Coronavirus humains (HCoV). *Pathologie Biologie* **57**, 149–160 (2009).
73. Oberste, M. S. *et al.* Enterovirus 68 is associated with respiratory illness and shares biological features with both the enteroviruses and the rhinoviruses. *Journal of General Virology* **85**, 2577–2584 (2004).
74. Schubert, R. D. *et al.* Pan-viral serology implicates enteroviruses in acute flaccid myelitis. *Nat Med* **25**, 1748–1752 (2019).
75. Zhao, M.-C. *et al.* Molecular and clinical characterization of human adenovirus associated with acute respiratory tract infection in hospitalized children. *J Clin Virol* **123**, 104254 (2020).
76. Hall, C. B. Respiratory Syncytial Virus and Parainfluenza Virus. *N Engl J Med* **344**, 1917–1928 (2001).
77. Henrickson, K. J. Parainfluenza Viruses. *Clin Microbiol Rev* **16**, 242–264 (2003).
78. Freymuth, F. *et al.* Les virus des bronchiolites aiguës. *Archives de Pédiatrie* **17**, 1192–1201 (2010).
79. Li, Y. *et al.* Global patterns in monthly activity of influenza virus, respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and metapneumovirus: a systematic analysis. *The Lancet Global Health* **7**, e1031–e1045 (2019).
80. Hall, C. B. *et al.* The Burden of Respiratory Syncytial Virus Infection in Young Children. *N Engl J Med* **360**, 588–598 (2009).

81. Karron, R. A. & Black, R. E. Determining the burden of respiratory syncytial virus disease: the known and the unknown. *The Lancet* **390**, 917–918 (2017).
82. Blount, R. E., Morris, J. A. & Savage, R. E. Recovery of Cytopathogenic Agent from Chimpanzees with Goryza. *Experimental Biology and Medicine* **92**, 544–549 (1956).
83. Chanock, R. & Finberg, L. RECOVERY FROM INFANTS WITH RESPIRATORY ILLNESS OF A VIRUS RELATED TO CHIMPANZEE CORYZA AGENT (CCA). *American Journal of Epidemiology* **66**, 291–300 (1957).
84. Chanock, R. M. *et al.* Respiratory syncytial virus. I. Virus recovery and other observations during 1960 outbreak of bronchiolitis, pneumonia, and minor respiratory diseases in children. *JAMA* **176**, 647–653 (1961).
85. Gault, E. & Rameix-Welti, M.-A. Le virus respiratoire syncytial (VRS): état actuel des connaissances. *FEUILLETS DE BIOLOGIE* 29–41 (2017).
86. Anderson, L. J. *et al.* Antigenic Characterization of Respiratory Syncytial Virus Strains with Monoclonal Antibodies. *Journal of Infectious Diseases* **151**, 626–633 (1985).
87. Mufson, M. A., Orvell, C., Rafnar, B. & Norrby, E. Two Distinct Subtypes of Human Respiratory Syncytial Virus. *Journal of General Virology* **66**, 2111–2124 (1985).
88. Peret, T. C., Golub, J. A., Anderson, L. J., Hall, C. B. & Schnabel, K. C. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *Journal of General Virology* **79**, 2221–2229 (1998).
89. Melero, J. A., Mas, V. & McLellan, J. S. Structural, antigenic and immunogenic features of respiratory syncytial virus glycoproteins relevant for vaccine development. *Vaccine* **35**, 461–468 (2017).
90. Johnson, P. R., Spriggs, M. K., Olmsted, R. A. & Collins, P. L. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 5625–5629 (1987).
91. Bose, M. E. *et al.* Sequencing and Analysis of Globally Obtained Human Respiratory Syncytial Virus A and B Genomes. *PLoS ONE* **10**, e0120098 (2015).
92. Muñoz-Escalante, J. C. *et al.* Respiratory syncytial virus A genotype classification based on systematic intergenotypic and intragenotypic sequence analysis. *Sci Rep* **9**, 20097 (2019).
93. Muñoz-Escalante, J. C., Comas-García, A., Bernal-Silva, S. & Noyola, D. E. Respiratory syncytial virus B sequence analysis reveals a novel early genotype. *Sci Rep* **11**, 3452 (2021).
94. Peret, T. C. T. *et al.* Circulation Patterns of Group A and B Human Respiratory Syncytial Virus Genotypes in 5 Communities in North America. *J INFECT DIS* **181**, 1891–1896 (2000).
95. Venter, M., Madhi, S. A., Tiemessen, C. T. & Schoub, B. D. Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: identification of new subgroup A and B genotypes. *Journal of General Virology* **82**, 2117–2124 (2001).
96. Cui, G. *et al.* Genetic Variation in Attachment Glycoprotein Genes of Human Respiratory Syncytial Virus Subgroups A and B in Children in Recent Five Consecutive Years. *PLoS ONE* **8**, e75020 (2013).
97. Eshaghi, A. *et al.* Genetic Variability of Human Respiratory Syncytial Virus A Strains Circulating in Ontario: A Novel Genotype with a 72 Nucleotide G Gene Duplication. *PLoS ONE* **7**, e32807 (2012).
98. Griffiths, C., Drews, S. J. & Marchant, D. J. Respiratory Syncytial Virus: Infection, Detection, and New Options for Prevention and Treatment. *Clin Microbiol Rev* **30**, 277–319 (2017).

99. Huang, Y. T. & Wertz, G. W. The genome of respiratory syncytial virus is a negative-stranded RNA that codes for at least seven mRNA species. *J Virol* **43**, 150–157 (1982).
100. Collins, P. L. *et al.* Nucleotide sequences for the gene junctions of human respiratory syncytial virus reveal distinctive features of intergenic structure and gene order. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83**, 4594–4598 (1986).
101. Vanover, D. *et al.* RSV glycoprotein and genomic RNA dynamics reveal filament assembly prior to the plasma membrane. *Nat Commun* **8**, 667 (2017).
102. Levine, S., Klaiber-Franco, R. & Paradiso, P. R. Demonstration that Glycoprotein G Is the Attachment Protein of Respiratory Syncytial Virus. *Journal of General Virology* **68**, 2521–2524 (1987).
103. Collins, P. L. & Graham, B. S. Viral and Host Factors in Human Respiratory Syncytial Virus Pathogenesis. *Journal of Virology* **82**, 2040–2055 (2008).
104. Respiratory syncytial virus (ID 5145) - Genome - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=respiratory+syncytial+virus>.
105. Walsh, E. E. *et al.* Aims, Study Design, and Enrollment Results From the Assessing Predictors of Infant Respiratory Syncytial Virus Effects and Severity Study. *JMIR Research Protocols* **8**, e12907 (2019).
106. Crim, R. L., Audet, S. A., Feldman, S. A., Mostowski, H. S. & Beeler, J. A. Identification of Linear Heparin-Binding Peptides Derived from Human Respiratory Syncytial Virus Fusion Glycoprotein That Inhibit Infectivity. *J Virol* **81**, 261–271 (2007).
107. Connors, M., Collins, P. L., Firestone, C. Y. & Murphy, B. R. Respiratory syncytial virus (RSV) F, G, M2 (22K), and N proteins each induce resistance to RSV challenge, but resistance induced by M2 and N proteins is relatively short-lived. *J Virol* **65**, 1634–1637 (1991).
108. Gan, S. W., Ng, L., Lin, X., Gong, X. & Torres, J. Structure and ion channel activity of the human respiratory syncytial virus (hRSV) small hydrophobic protein transmembrane domain. *Protein Science* **17**, 813–820 (2008).
109. McLellan, J. S., Ray, W. C. & Peeples, M. E. Structure and Function of Respiratory Syncytial Virus Surface Glycoproteins. in *Challenges and Opportunities for Respiratory Syncytial Virus Vaccines* (eds. Anderson, L. J. & Graham, B. S.) vol. 372 83–104 (Springer Berlin Heidelberg, 2013).
110. Ke, Z. *et al.* The Morphology and Assembly of Respiratory Syncytial Virus Revealed by Cryo-Electron Tomography. *Viruses* **10**, 446 (2018).
111. Mitra, R., Baviskar, P., Duncan-Decocq, R. R., Patel, D. & Oomens, A. G. P. The Human Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Is Required for Maturation of Viral Filaments. *J. Virol.* **86**, 4432–4443 (2012).
112. Bermingham, A. & Collins, P. L. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 11259–11264 (1999).
113. Cosentino, G., Marougka, K. & Rameix-Welti, M.-A. Virus respiratoire syncytial et métapneumovirus humain. *EMC - Biologie médicale* **14** (2021) doi:10.1016/S2211-9698(21)41747-4.
114. Chirkova, T. *et al.* CX3CR1 is an important surface molecule for respiratory syncytial virus infection in human airway epithelial cells. *Journal of General Virology* **96**, 2543–2556 (2015).
115. Collins, P. L., Fearn, R. & Graham, B. S. Respiratory Syncytial Virus: Virology, Reverse Genetics, and Pathogenesis of Disease. in *Challenges and Opportunities for Respiratory Syncytial Virus Vaccines* (eds. Anderson, L. J. & Graham, B. S.) vol. 372 3–38 (Springer Berlin Heidelberg, 2013).

116. Tripp, R. A. *et al.* CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Nat Immunol* **2**, 732–738 (2001).
117. Tayyari, F. *et al.* Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. *Nat Med* **17**, 1132–1135 (2011).
118. HAS. Recommandations de bonne pratique. Prise en charge du 1er épisode de bronchiolite aiguë chez le nourrisson de moins de 12 mois. *Haute Autorité de Santé* https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2019-11/hascnpp__bronchiolite_argumentaire_2019_vd.pdf (2019).
119. Ramaekers, K. *et al.* Prevalence and seasonality of six respiratory viruses during five consecutive epidemic seasons in Belgium. *Journal of Clinical Virology* **94**, 72–78 (2017).
120. Rapports d'activité du CNR des Virus des infections respiratoires (dont la grippe). *Institut Pasteur* <https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/centres-nationaux-referance/cnr/virus-infections-respiratoires-dont-grippe/rapports-activite-du-cnr-virus-infections-respiratoires-dont-grippe> (2016).
121. Gaymard, A. Données internes Laboratoire de la Croix Rousse, Lyon.
122. Glezen, W. P., Taber, L. H., Frank, A. L. & Kasel, J. A. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am. J. Dis. Child.* **140**, 543–546 (1986).
123. Scheltema, N. M. *et al.* Global respiratory syncytial virus-associated mortality in young children (RSV GOLD): a retrospective case series. *The Lancet Global Health* **5**, e984–e991 (2017).
124. Fetouh, M., Malot, L. & Réseau Aquitain Bronchiolite et Asthme du Nourrisson. Bronchiolite aiguë du nourrisson. 53 (2018).
125. Shedden, W. I. & Emery, J. L. IMMUNOFLUORESCENT EVIDENCE OF RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS INFECTION IN CASES OF GIANT CELL BRONCHIOLITIS IN CHILDREN. *J Pathol Bacteriol* **89**, 343–347 (1965).
126. Neilson, K. A. & Yunis, E. J. Demonstration of Respiratory Syncytial Virus in an Autopsy Series. *Pediatric Pathology* **10**, 491–502 (1990).
127. Welliver, T. P., Reed, J. L. & Welliver, R. C. Respiratory Syncytial Virus and Influenza Virus Infections: Observations from Tissues of Fatal Infant Cases. *Pediatric Infectious Disease Journal* **27**, S92–S96 (2008).
128. Pettigrew, M. M. *et al.* Viral-Bacterial Interactions and Risk of Acute Otitis Media Complicating Upper Respiratory Tract Infection. *J Clin Microbiol* **49**, 3750–3755 (2011).
129. Thorburn, K. High incidence of pulmonary bacterial co-infection in children with severe respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis. *Thorax* **61**, 611–615 (2006).
130. Wu, X. *et al.* Prevalence and risk of viral infection in patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* **41**, 4743–4751 (2014).
131. Pérez-Yarza, E. G., Moreno, A., Lázaro, P., Mejías, A. & Ramilo, O. The Association Between Respiratory Syncytial Virus Infection and the Development of Childhood Asthma: A Systematic Review of the Literature. *Pediatric Infectious Disease Journal* **26**, 733–739 (2007).
132. Holtzman, M. J. Asthma as a chronic disease of the innate and adaptive immune systems responding to viruses and allergens. *J. Clin. Invest.* **122**, 2741–2748 (2012).
133. Sigurs, N., Bjarnason, R., Sigurbergsson, F., Kjellman, B. & Björkstén, B. Asthma and immunoglobulin E antibodies after respiratory syncytial virus bronchiolitis: a prospective cohort study with matched controls. *Pediatrics* **95**, 500–505 (1995).

134. Sigurs, N., Bjarnason, R., Sigurbergsson, F. & Kjellman, B. Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis in Infancy Is an Important Risk Factor for Asthma and Allergy at Age 7. *Am J Respir Crit Care Med* **161**, 1501–1507 (2000).
135. Sigurs, N. *et al.* Severe Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis in Infancy and Asthma and Allergy at Age 13. *Am J Respir Crit Care Med* **171**, 137–141 (2005).
136. Sigurs, N. *et al.* Asthma and allergy patterns over 18 years after severe RSV bronchiolitis in the first year of life. *Thorax* **65**, 1045–1052 (2010).
137. Haute Autorité de Santé. Prise en charge du 1er épisode de bronchiolite aiguë chez le nourrisson de moins de 12 mois. *Haute Autorité de Santé* https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2019-11/hascnpp_bronchiolite_texte_recommandations_2019.pdf (2019).
138. Ventre, K. & Randolph, A. Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract in infants and young children. in *Cochrane Database of Systematic Reviews* (ed. The Cochrane Collaboration) CD000181.pub3 (John Wiley & Sons, Ltd, 2007). doi:10.1002/14651858.CD000181.pub3.
139. Simões, E. A. F. *et al.* Past, Present and Future Approaches to the Prevention and Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection in Children. *Infect Dis Ther* **7**, 87–120 (2018).
140. DeVincenzo, J. P. *et al.* Oral GS-5806 Activity in a Respiratory Syncytial Virus Challenge Study. *N Engl J Med* **371**, 711–722 (2014).
141. Kim, Y.-I. *et al.* The antiviral effects of RSV fusion inhibitor, MDT-637, on clinical isolates, vs its achievable concentrations in the human respiratory tract and comparison to ribavirin. *Influenza Other Respi Viruses* **11**, 525–530 (2017).
142. DeVincenzo, J. P., McClure, M. W. & Fry, J. ALS-008176 for Respiratory Syncytial Virus Infection. *N Engl J Med* **374**, 1391–1392 (2016).
143. Korell, J., Green, B., DeVincenzo, J. & Huntjens, D. A human challenge model for respiratory syncytial virus kinetics, the pharmacological effect of a novel fusion inhibitor, and the modelling of symptoms scores. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **109**, S154–S160 (2017).
144. Modjarrad, K., Giersing, B., Kaslow, D. C., Smith, P. G. & Moorthy, V. S. WHO consultation on Respiratory Syncytial Virus Vaccine Development Report from a World Health Organization Meeting held on 23–24 March 2015. *Vaccine* **34**, 190–197 (2016).
145. Kim, H. W. *et al.* RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS DISEASE IN INFANTS DESPITE PRIOR ADMINISTRATION OF ANTIGENIC INACTIVATED VACCINE12. *American Journal of Epidemiology* **89**, 422–434 (1969).
146. Graham, B. S. Vaccine development for respiratory syncytial virus. *Current Opinion in Virology* **23**, 107–112 (2017).
147. Bertholom, C. Vaccinologie : les nouveaux concepts. *Option/Bio* **32**, 24–25 (2021).
148. Wang, Y. *et al.* mRNA vaccine: a potential therapeutic strategy. *Mol Cancer* **20**, 33 (2021).
149. Andabaka, T. *et al.* Monoclonal antibody for reducing the risk of respiratory syncytial virus infection in children. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (2013) doi:10.1002/14651858.CD006602.pub4.
150. Olivia Vong. Du nouveau dans la prévention des infections respiratoires par le virus respiratoire syncytial (RSV) - Société Française de Microbiologie. <https://www.sfm-microbiologie.org/2022/12/15/du-nouveau-dans-la-prevention-des-infections-respiratoires-par-le-virus-respiratoire-syncytial-rsv/> (2022).

151. Zhang, L., Peeples, M. E., Boucher, R. C., Collins, P. L. & Pickles, R. J. Respiratory Syncytial Virus Infection of Human Airway Epithelial Cells Is Polarized, Specific to Ciliated Cells, and without Obvious Cytopathology. *J Virol* **76**, 5654–5666 (2002).
152. Bergeron, H. C. & Tripp, R. A. Immunopathology of RSV: An Updated Review. *Viruses* **13**, 2478 (2021).
153. Openshaw, P. J. M., Chiu, C., Culley, F. J. & Johansson, C. Protective and Harmful Immunity to RSV Infection. *Annu. Rev. Immunol.* **35**, 501–532 (2017).
154. McNamara, P. S. & Smyth, R. L. The pathogenesis of respiratory syncytial virus disease in childhood. *British Medical Bulletin* **61**, 13–28 (2002).
155. Russell, C. D., Unger, S. A., Walton, M. & Schwarze, J. The Human Immune Response to Respiratory Syncytial Virus Infection. *Clinical Microbiology Reviews* **30**, 481–502 (2017).
156. Mella, C. *et al.* Innate Immune Dysfunction is Associated with Enhanced Disease Severity In Infants with Severe Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis. *The Journal of Infectious Diseases* **207**, 564–573 (2013).
157. García, C. *et al.* Decreased Innate Immune Cytokine Responses Correlate With Disease Severity in Children With Respiratory Syncytial Virus and Human Rhinovirus Bronchiolitis: *The Pediatric Infectious Disease Journal* **31**, 86–89 (2012).
158. Paulus, S. C. *et al.* Common human Toll-like receptor 4 polymorphisms—Role in susceptibility to respiratory syncytial virus infection and functional immunological relevance. *Clinical Immunology* **123**, 252–257 (2007).
159. Tulic, M. K. *et al.* TLR4 Polymorphisms Mediate Impaired Responses to Respiratory Syncytial Virus and Lipopolysaccharide. *J Immunol* **179**, 132–140 (2007).
160. Mejias, A. *et al.* Whole Blood Gene Expression Profiles to Assess Pathogenesis and Disease Severity in Infants with Respiratory Syncytial Virus Infection. *PLoS Med* **10**, e1001549 (2013).
161. Adkins, B., Leclerc, C. & Marshall-Clarke, S. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol* **4**, 553–564 (2004).
162. Legg, J. P., Hussain, I. R., Warner, J. A., Johnston, S. L. & Warner, J. O. Type 1 and Type 2 Cytokine Imbalance in Acute Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* **168**, 633–639 (2003).
163. Hasegawa, K. *et al.* Respiratory Syncytial Virus Genomic Load and Disease Severity Among Children Hospitalized With Bronchiolitis: Multicenter Cohort Studies in the United States and Finland. *The Journal of Infectious Diseases* **211**, 1550–1559 (2015).
164. Meissner, H. C. Viral Bronchiolitis in Children. *N Engl J Med* **374**, 62–72 (2016).
165. Taleb, S. A., Al Thani, A. A., Al Ansari, K. & Yassine, H. M. Human respiratory syncytial virus: pathogenesis, immune responses, and current vaccine approaches. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **37**, 1817–1827 (2018).
166. Agoti, C. N. *et al.* Genetic Relatedness of Infecting and Reinfected Respiratory Syncytial Virus Strains Identified in a Birth Cohort From Rural Kenya. *The Journal of Infectious Diseases* **206**, 1532–1541 (2012).
167. Ohuma, E. O. *et al.* The Natural History of Respiratory Syncytial Virus in a Birth Cohort: The Influence of Age and Previous Infection on Reinfection and Disease. *American Journal of Epidemiology* **176**, 794–802 (2012).
168. Hall, C. B. *et al.* Respiratory Syncytial Virus-Associated Hospitalizations Among Children Less Than 24 Months of Age. *PEDIATRICS* **132**, e341–e348 (2013).

169. Lloyd, P. C., May, L., Hoffman, D., Riegelman, R. & Simonsen, L. The Effect of Birth Month on the Risk of Respiratory Syncytial Virus Hospitalization in the First Year of Life in the United States. *Pediatric Infectious Disease Journal* **33**, e135–e140 (2014).
170. Reeves, R. M. *et al.* Epidemiology of laboratory-confirmed respiratory syncytial virus infection in young children in England, 2010–2014: the importance of birth month. *Epidemiol. Infect.* **144**, 2049–2056 (2016).
171. Stockman, L. J., Curns, A. T., Anderson, L. J. & Fischer-Langley, G. Respiratory Syncytial Virus-associated Hospitalizations Among Infants and Young Children in the United States, 1997–2006. *Pediatric Infectious Disease Journal* **31**, 5–9 (2012).
172. Chan, M. *et al.* The burden of respiratory syncytial virus (RSV) associated acute lower respiratory infections in children with Down syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Global Health* **7**, 020413 (2017).
173. Janssen, R. *et al.* Host Transcription Profiles upon Primary Respiratory Syncytial Virus Infection. *Journal of Virology* **81**, 5958–5967 (2007).
174. Alvarez, A. E. *et al.* Association between single nucleotide polymorphisms in TLR4 , TLR2 , TLR9 , VDR , NOS2 and CCL5 genes with acute viral bronchiolitis. *Gene* **645**, 7–17 (2018).
175. Friedman, J. N. *et al.* Bronchiolitis: Recommendations for diagnosis, monitoring and management of children one to 24 months of age. *Paediatrics & Child Health* **19**, 485–491 (2014).
176. Rodriguez, H., Hartert, T. V., Gebretsadik, T., Carroll, K. N. & Larkin, E. K. A simple respiratory severity score that may be used in evaluation of acute respiratory infection. *BMC Res Notes* **9**, 85 (2016).
177. Golan-Tripto, I. *et al.* Modified Tal Score: Validated score for prediction of bronchiolitis severity. *Pediatric Pulmonology* **53**, 796–801 (2018).
178. Haute Autorité de Santé. Prise en charge du 1er épisode de bronchiolite aiguë chez le nourrisson de moins de 12 mois_Argumentaire. (2019).
179. Lowell, D. I., Lister, G., Von Koss, H. & McCarthy, P. Wheezing in infants: the response to epinephrine. *Pediatrics* **79**, 939–945 (1987).
180. Tal, A. *et al.* Dexamethasone and salbutamol in the treatment of acute wheezing in infants. *Pediatrics* **71**, 13–18 (1983).
181. Wang, E. E. L., Milner, R. A., Navas, L. & Maj, H. Observer Agreement for Respiratory Signs and Oximetry in Infants Hospitalized with Lower Respiratory Infections. *Am Rev Respir Dis* **145**, 106–109 (1992).
182. Bentur, L., Shoseyov, D., Feigenbaum, D., Gorichovsky, Y. & Bibi, H. Dexamethasone inhalations in RSV bronchiolitis: a double-blind, placebo-controlled study. *Acta Paediatr* **94**, 866–871 (2005).
183. Groothuis, J. R. *et al.* Prophylactic Administration of Respiratory Syncytial Virus Immune Globulin to High-Risk Infants and Young Children. *N Engl J Med* **329**, 1524–1530 (1993).
184. Law, B. J., Carbonell-Estrany, X. & Simoes, E. a. F. An update on respiratory syncytial virus epidemiology: a developed country perspective. *Respir Med* **96 Suppl B**, S1-7 (2002).
185. Marlais, M., Evans, J. & Abrahamson, E. Clinical predictors of admission in infants with acute bronchiolitis. *Arch Dis Child* **96**, 648–652 (2011).
186. Rodriguez-Martinez, C. E., Sossa-Briceño, M. P. & Nino, G. Systematic review of instruments aimed at evaluating the severity of bronchiolitis. *Paediatric Respiratory Reviews* **25**, 43–57 (2018).
187. De Boeck, K., Van der Aa, N., Van Lierde, S., Corbeel, L. & Eeckels, R. Respiratory syncytial virus bronchiolitis: A double-blind dexamethasone efficacy study. *The Journal of Pediatrics* **131**, 919–921 (1997).

188. Beck, R. *et al.* Computerized acoustic assessment of treatment efficacy of nebulized epinephrine and albuterol in RSV bronchiolitis. *BMC Pediatr* **7**, 22 (2007).
189. Fernandes, R. M. *et al.* Validity of Bronchiolitis Outcome Measures. *Pediatrics* **135**, e1399 (2015).
190. Modjarrad, K., Giersing, B., Kaslow, D. C., Smith, P. G. & Moorthy, V. S. WHO consultation on Respiratory Syncytial Virus Vaccine Development Report from a World Health Organization Meeting held on 23–24 March 2015. *Vaccine* **34**, 190–197 (2016).
191. Caserta, M. T. *et al.* Development of a Global Respiratory Severity Score for Respiratory Syncytial Virus Infection in Infants. *J Infect Dis* **215**, 750–756 (2017).
192. Hull, J. *et al.* Variants of the Chemokine Receptor CCR5 Are Associated with Severe Bronchiolitis Caused by Respiratory Syncytial Virus. *J INFECT DIS* **188**, 904–907 (2003).
193. Amanatidou, V. *et al.* RANTES Promoter Gene Polymorphisms and Susceptibility to Severe Respiratory Syncytial Virus-Induced Bronchiolitis. *Pediatric Infectious Disease Journal* **27**, 38–42 (2008).
194. Tian, M. *et al.* Effect of variation in RANTES promoter on serum RANTES levels and risk of recurrent wheezing after RSV bronchiolitis in children from Han, Southern China. *Eur J Pediatr* **168**, 963–967 (2009).
195. Amanatidou, V., Sourvinos, G., Apostolakis, S., Tsilimigaki, A. & Spandidos, D. A. T280M Variation of the CX3C Receptor Gene Is Associated With Increased Risk for Severe Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis. *Pediatric Infectious Disease Journal* **25**, 410–414 (2006).
196. Choi, E. H., Lee, H. J., Yoo, T. & Chanock, S. J. A Common Haplotype of Interleukin-4 Gene *IL4* Is Associated with Severe Respiratory Syncytial Virus Disease in Korean Children. *J INFECT DIS* **186**, 1207–1211 (2002).
197. Hoebee, B. *et al.* Association of Severe Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis with Interleukin-4 and Interleukin-4 Receptor α Polymorphisms. *J INFECT DIS* **187**, 2–11 (2003).
198. Tapia, L. I. *et al.* Respiratory syncytial virus infection and recurrent wheezing in Chilean infants: A genetic background? *Infection, Genetics and Evolution* **16**, 54–61 (2013).
199. Ermers, M. J. J. *et al.* IL-13 genetic polymorphism identifies children with late wheezing after respiratory syncytial virus infection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **119**, 1086–1091 (2007).
200. Puthothu, B., Krueger, M., Forster, J. & Heinzmann, A. Association between Severe Respiratory Syncytial Virus Infection and *IL13/IL4* Haplotypes. *J INFECT DIS* **193**, 438–441 (2006).
201. Gentile, D. A. *et al.* Cytokine gene polymorphisms moderate illness severity in infants with respiratory syncytial virus infection. *Human Immunology* **64**, 338–344 (2003).
202. Goetghebuer, T. *et al.* Genetic predisposition to wheeze following respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Clin Exp Allergy* **34**, 801–803 (2004).
203. Heinzmann, A., Ahlert, I., Kurz, T., Berner, R. & Deichmann, K. A. Association study suggests opposite effects of polymorphisms within *IL8* on bronchial asthma and respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **114**, 671–676 (2004).
204. Hull, J. Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. *Thorax* **55**, 1023–1027 (2000).
205. Lu, A., Wang, L. & Zhang, X. Haplotype of *IL-8* -251T and 781C is associated with the Susceptibility to Respiratory Syncytial Virus. *Journal of Tropical Pediatrics* **56**, 242–246 (2010).

206. Puthothu, B., Krueger, M., Heinze, J., Forster, J. & Heinzmann, A. Impact of IL8 and IL8-receptor alpha polymorphisms on the genetics of bronchial asthma and severe RSV infections. *Clin Mol Allergy* **4**, 2 (2006).
207. Wilson, J. *et al.* Genetic Variation at the *IL10* Gene Locus Is Associated with Severity of Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis. *J INFECT DIS* **191**, 1705–1709 (2005).
208. Hoebee, B. *et al.* Influence of Promoter Variants of Interleukin-10, Interleukin-9, and Tumor Necrosis Factor- α Genes on Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis. *J INFECT DIS* **189**, 239–247 (2004).
209. Drysdale, S. B. *et al.* Genetic predisposition of RSV infection-related respiratory morbidity in preterm infants. *Eur J Pediatr* **173**, 905–912 (2014).
210. Alper, C. M., Winther, B., Owen Hendley, J. & Doyle, W. J. Cytokine polymorphisms predict the frequency of otitis media as a complication of rhinovirus and RSV infections in children. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **266**, 199–205 (2009).
211. Puthothu, B. *et al.* Interleukin (IL)-18 Polymorphism 133C/G Is Associated With Severe Respiratory Syncytial Virus Infection. *Pediatric Infectious Disease Journal* **26**, 1094–1098 (2007).
212. Pierangeli, A. *et al.* Evaluation of interferon lambda 4 nucleotide polymorphism in infants suffering from bronchiolitis. *Journal of Clinical Virology* **82**, S118 (2016).
213. Schuurhof, A. *et al.* Interleukin-9 polymorphism in infants with respiratory syncytial virus infection: An opposite effect in boys and girls: Gender Effect of IL-9 SNP in RSV. *Pediatr. Pulmonol.* **45**, 608–613 (2010).
214. Faber, T. E. *et al.* IL1RL1 Gene Variants and Nasopharyngeal IL1RL-a Levels Are Associated with Severe RSV Bronchiolitis: A Multicenter Cohort Study. *PLoS ONE* **7**, e34364 (2012).
215. Krueger, M., Puthothu, B., Heinze, J., Forster, J. & Heinzmann, A. Genetic polymorphisms of adhesion molecules in children with severe RSV-associated diseases. *Int J Immunogenet* **33**, 233–235 (2006).
216. Tal, G. *et al.* Association between Common Toll-Like Receptor 4 Mutations and Severe Respiratory Syncytial Virus Disease. *J INFECT DIS* **189**, 2057–2063 (2004).
217. Awomoyi, A. A. *et al.* Association of TLR4 Polymorphisms with Symptomatic Respiratory Syncytial Virus Infection in High-Risk Infants and Young Children. *J Immunol* **179**, 3171–3177 (2007).
218. Mandelberg, A. *et al.* Lipopolysaccharide hyporesponsiveness as a risk factor for intensive care unit hospitalization in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Clin Exp Immunol* **144**, 48–52 (2006).
219. Inoue, Y. *et al.* CD14 -550 C/T, Which Is Related to the Serum Level of Soluble CD14, Is Associated with the Development of Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis in the Japanese Population. *J INFECT DIS* **195**, 1618–1624 (2007).
220. Goutaki, M. *et al.* The Role of TLR4 and CD14 Polymorphisms in the Pathogenesis of Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis in Greek Infants. *Int J Immunopathol Pharmacol* **27**, 563–572 (2014).
221. Puthothu, B., Forster, J., Heinzmann, A. & Krueger, M. TLR-4 and CD14 Polymorphisms in Respiratory Syncytial Virus Associated Disease. *Disease Markers* **22**, 303–308 (2006).
222. Nuolivirta, K. *et al.* Toll-like Receptor 3 L412F Polymorphisms in Infants With Bronchiolitis and Postbronchiolitis Wheezing. *Pediatric Infectious Disease Journal* **31**, 920–923 (2012).
223. Törmänen, S. *et al.* TLR5 rs5744174 gene polymorphism is associated with the virus etiology of infant bronchiolitis but not with post-bronchiolitis asthma. *Health Sci Rep* **1**, e38 (2018).
224. Lauhkonen, E. *et al.* Gene Polymorphism of Toll-Like Receptors and Lung Function at Five to Seven Years of Age after Infant Bronchiolitis. *PLoS ONE* **11**, e0146526 (2016).

225. Törmänen, S. *et al.* Polymorphism in the gene encoding toll-like receptor 10 may be associated with asthma after bronchiolitis. *Sci Rep* **7**, 2956 (2017).
226. Mailaparambil, B., Krueger, M., Heinze, J., Forster, J. & Heinzmann, A. Polymorphisms of Toll Like Receptors in the Genetics of Severe RSV Associated Diseases. *Disease Markers* **25**, 59–65 (2008).
227. Nuolivirta, K. *et al.* Post-bronchiolitis wheezing is associated with toll-like receptor 9 rs187084 gene polymorphism. *Sci Rep* **6**, 31165 (2016).
228. Löfgren, J., Rämetsä, M., Renko, M., Marttila, R. & Hallman, M. Association between Surfactant Protein A Gene Locus and Severe Respiratory Syncytial Virus Infection in Infants. *J INFECT DIS* **185**, 283–289 (2002).
229. El Saleeby, C. M. *et al.* Surfactant Protein A2 Polymorphisms and Disease Severity in a Respiratory Syncytial Virus-Infected Population. *The Journal of Pediatrics* **156**, 409–414.e4 (2010).
230. Puthothu, B., Forster, J., Heinze, J., Heinzmann, A. & Krueger, M. Surfactant protein B polymorphisms are associated with severe respiratory syncytial virus infection, but not with asthma. *BMC Pulm Med* **7**, 6 (2007).
231. Puthothu, B., Krueger, M., Heinze, J., Forster, J. & Heinzmann, A. Haplotypes of surfactant protein C are associated with common paediatric lung diseases. *Pediatr Allergy Immunol* **17**, 572–577 (2006).
232. Ampuero, S., Luchsinger, V., Tapia, L., Palomino, M. A. & Larrañaga, C. E. SP-A1, SP-A2 and SP-D gene polymorphisms in severe acute respiratory syncytial infection in Chilean infants. *Infection, Genetics and Evolution* **11**, 1368–1377 (2011).
233. Lahti, M. *et al.* Surfactant protein D gene polymorphism associated with severe respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Res* **51**, 696–699 (2002).
234. Tahamtan, A. *et al.* Effects of cannabinoid receptor type 2 in respiratory syncytial virus infection in human subjects and mice. *Virulence* **9**, 217–230 (2018).
235. Salimi, V. *et al.* Opioid Receptors Control Viral Replication in the Airways*: *Critical Care Medicine* **41**, 205–214 (2013).
236. Janssen, R. *et al.* Genetic Susceptibility to Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis Is Predominantly Associated with Innate Immune Genes. *The Journal of Infectious Diseases* **196**, 826–834 (2007).
237. Kresfelder, T. L., Janssen, R., Bont, L. & Venter, M. Confirmation of an association between single nucleotide polymorphisms in the VDR gene with respiratory syncytial virus related disease in South African Children. *J. Med. Virol.* **83**, 1834–1840 (2011).
238. Roth, D. E., Jones, A. B., Prosser, C., Robinson, J. L. & Vohra, S. Vitamin D Receptor Polymorphisms and the Risk of Acute Lower Respiratory Tract Infection in Early Childhood. *J INFECT DIS* **197**, 676–680 (2008).
239. Hattori, S. *et al.* Relationship between RANTES polymorphisms and respiratory syncytial virus bronchiolitis in a Japanese infant population. *Jpn J Infect Dis* **64**, 242–245 (2011).
240. Ciencewicz, J. M. *et al.* A genetic model of differential susceptibility to human respiratory syncytial virus (RSV) infection. *The FASEB Journal* **28**, 1947–1956 (2014).
241. Schuurhof, A. *et al.* Proteins involved in extracellular matrix dynamics are associated with respiratory syncytial virus disease severity. *Eur Respir J* **39**, 1475–1481 (2012).
242. Overödder, H. & Navér, L. Clara cell protein 10 polymorphism is not associated with severe respiratory syncytial virus infection*: CC10 and RSV. *Acta Paediatrica* **101**, 34–37 (2012).

243. Randolph, A. G. *et al.* Vitamin D-binding protein haplotype is associated with hospitalization for RSV bronchiolitis. *Clin Exp Allergy* **44**, 231–237 (2014).
244. Rajagopala, S. V. *et al.* Metatranscriptomics to characterize respiratory virome, microbiome, and host response directly from clinical samples. *Cell Reports Methods* **1**, 100091 (2021).
245. Tabarani, C. M. *et al.* Novel Inflammatory Markers, Clinical Risk Factors and Virus Type Associated With Severe Respiratory Syncytial Virus Infection. *Pediatric Infectious Disease Journal* **32**, e437–e442 (2013).
246. Saravia, J. *et al.* Respiratory Syncytial Virus Disease Is Mediated by Age-Variable IL-33. *PLoS Pathog* **11**, e1005217 (2015).
247. Bennett, B. L. *et al.* Immunopathogenesis of Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis. *J INFECT DIS* **195**, 1532–1540 (2007).
248. Moreno-Solís, G. *et al.* Low serum 25-hydroxyvitamin D levels and bronchiolitis severity in Spanish infants. *Eur J Pediatr* **174**, 365–372 (2015).
249. Thwaites, R. S. *et al.* Reduced Nasal Viral Load and IFN Responses in Infants with Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis and Respiratory Failure. *Am J Respir Crit Care Med* **198**, 1074–1084 (2018).
250. Vieira, R. A., Diniz, E. M. de A. & Ceccon, M. E. J. R. Correlação entre mediadores inflamatórios na secreção nasofaríngea e no soro de crianças com infecção do trato respiratório inferior por vírus sincicial respiratório e a gravidade da doença. *J. bras. pneumol.* **36**, 59–66 (2010).
251. Bont, L. *et al.* Local Interferon- γ Levels during Respiratory Syncytial Virus Lower Respiratory Tract Infection Are Associated with Disease Severity. *J INFECT DIS* **184**, 355–358 (2001).
252. Semple, M. G. *et al.* Severe Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis in Infants Is Associated with Reduced Airway Interferon Gamma and Substance P. *PLoS ONE* **2**, e1038 (2007).
253. Assefa, D., Amin, N., Dozor, A. J. & Parton, L. A. Attenuated interleukin-8/leukocyte immunoresponse in preterm infants compared with term infants hospitalized with respiratory syncytial virus bronchiolitis: a pilot study. *Hum Immunol* **72**, 708–711 (2011).
254. Bermejo-Martin, J. F. *et al.* Predominance of Th2 cytokines, CXC chemokines and innate immunity mediators at the mucosal level during severe respiratory syncytial virus infection in children. *Eur Cytokine Netw* **18**, 162–167 (2007).
255. Christiaansen, A. F. *et al.* Altered Treg and cytokine responses in RSV-infected infants. *Pediatr Res* **80**, 702–709 (2016).
256. Díaz, P. V. *et al.* Aumento de interleuquinas proinflamatorias y de cortisol plasmático en bronquiolitis por virus respiratorio sincicial: relación con la gravedad de la infección. *Rev. méd. Chile* **141**, 574–581 (2013).
257. Welliver, T. P. *et al.* Severe Human Lower Respiratory Tract Illness Caused by Respiratory Syncytial Virus and Influenza Virus Is Characterized by the Absence of Pulmonary Cytotoxic Lymphocyte Responses. *J INFECT DIS* **195**, 1126–1136 (2007).
258. Giugno, K. M., Machado, D. C., Amantéa, S. L. & Menna Barreto, S. S. [Concentrations of interleukin-2 in the nasopharyngeal secretion of children with acute respiratory syncytial virus bronchiolitis]. *J Pediatr (Rio J)* **80**, 315–320 (2004).
259. Brand, H. K. *et al.* CD4⁺ T-cell counts and interleukin-8 and CCL-5 plasma concentrations discriminate disease severity in children with RSV infection. *Pediatr Res* **73**, 187–193 (2013).
260. Bem, R. A. *et al.* Potential Role of Soluble TRAIL in Epithelial Injury in Children with Severe RSV Infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* **42**, 697–705 (2010).

261. Smyth, R. L., Fletcher, J. N., Thomas, H. M. & Hart, C. A. Immunological responses to respiratory syncytial virus infection in infancy. *Archives of Disease in Childhood* **76**, 210–214 (1997).
262. Sung, R. Y. T., Hui, S. H. L., Wong, C. K., Lam, C. W. K. & Yin, J. A comparison of cytokine responses in respiratory syncytial virus and influenza A infections in infants. *European Journal of Pediatrics* **160**, 117–122 (2001).
263. Selvaggi, C. *et al.* Interferon lambda 1–3 expression in infants hospitalized for RSV or HRV associated bronchiolitis. *Journal of Infection* **68**, 467–477 (2014).
264. Nenna, R. *et al.* Viral Load in Infants Hospitalized for Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis Correlates with Recurrent Wheezing at Thirty-Six-Month Follow-Up. *Pediatric Infectious Disease Journal* **34**, 1131–1132 (2015).
265. Nakayama, T. *et al.* Detection of alpha-interferon in nasopharyngeal secretions and sera in children infected with respiratory syncytial virus: *The Pediatric Infectious Disease Journal* **12**, 925–928 (1993).
266. Choi, J., Callaway, Z., Kim, H.-B., Fujisawa, T. & Kim, C.-K. The role of TNF- α in eosinophilic inflammation associated with RSV bronchiolitis: Role of TNF- α in RSV bronchiolitis. *Pediatric Allergy and Immunology* **21**, 474–479 (2010).
267. Hornsleth, A., Loland, L. & Larsen, L. B. Cytokines and chemokines in respiratory secretion and severity of disease in infants with respiratory syncytial virus (RSV) infection. *Journal of Clinical Virology* **21**, 163–170 (2001).
268. Hornsleth, A. *et al.* Severity of respiratory syncytial virus disease related to type and genotype of virus and to cytokine values in nasopharyngeal secretions: *The Pediatric Infectious Disease Journal* **17**, 1114–1121 (1998).
269. Hilty, M. *et al.* Disordered Microbial Communities in Asthmatic Airways. *PLoS ONE* **5**, e8578 (2010).
270. Iorio, A. *et al.* Cross-correlation of virome–bacteriome–host–metabolome to study respiratory health. *Trends in Microbiology* S0966842X21001220 (2021) doi:10.1016/j.tim.2021.04.011.
271. Lederberg, J. 'Ome Sweet 'Omics-- A Genealogical Treasury of Words. *The Scientist Magazine*® <https://www.the-scientist.com/commentary/ome-sweet-omics---a-genealogical-treasury-of-words-54889> (2001).
272. Santacroce, L. *et al.* The Human Respiratory System and its Microbiome at a Glimpse. *Biology* **9**, 318 (2020).
273. HMP Consortium. NIH Human Microbiome Project - Home. <https://www.hmpdacc.org/> (2008).
274. European Commission. Final Report Summary - METAHIT (Metagenomics of the Human Intestinal Tract) | Report Summary | METAHIT | FP7 | CORDIS | European Commission. <https://cordis.europa.eu/project/id/201052/reporting/fr> (2008).
275. Erb-Downward, J. R. *et al.* Analysis of the Lung Microbiome in the “Healthy” Smoker and in COPD. *PLoS ONE* **6**, e16384 (2011).
276. Chiu, C. Y. & Miller, S. A. Clinical metagenomics. *Nature Reviews Genetics* **20**, 341–355 (2019).
277. Martin-Loeches, I. *et al.* The importance of airway and lung microbiome in the critically ill. *Crit Care* **24**, 537 (2020).
278. Pichon, M., Lina, B. & Josset, L. Caractérisation et impact du microbiote bactérien respiratoire sur les maladies virales. *Virologie* **22**, 161–172 (2018).
279. Schutz, S. Introduction à la métagénomique // bioinformatique génétique médecine. <https://dridk.me/metagenomique.html>.

280. Kim, M., Morrison, M. & Yu, Z. Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. *Journal of Microbiological Methods* **84**, 81–87 (2011).
281. Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. & Cole, J. R. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol* **73**, 5261–5267 (2007).
282. Rintala, A. *et al.* Gut Microbiota Analysis Results Are Highly Dependent on the 16S rRNA Gene Target Region, Whereas the Impact of DNA Extraction Is Minor. *J Biomol Tech* **28**, 19–30 (2017).
283. Fouhy, F., Clooney, A. G., Stanton, C., Claesson, M. J. & Cotter, P. D. 16S rRNA gene sequencing of mock microbial populations- impact of DNA extraction method, primer choice and sequencing platform. *BMC Microbiol* **16**, 123 (2016).
284. Langevin, S. *et al.* Early nasopharyngeal microbial signature associated with severe influenza in children: a retrospective pilot study. *Journal of General Virology* **98**, 2425–2437 (2017).
285. Klappenbach, J. A. rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Research* **29**, 181–184 (2001).
286. Cui, L., Morris, A. & Ghedin, E. The human mycobiome in health and disease. *Genome Med* **5**, 63 (2013).
287. Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J. & Goodman, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology* **5**, R245–R249 (1998).
288. Wang, D. 5 challenges in understanding the role of the virome in health and disease. *PLoS Pathog* **16**, e1008318 (2020).
289. Bal, A. *et al.* Quality control implementation for universal characterization of DNA and RNA viruses in clinical respiratory samples using single metagenomic next-generation sequencing workflow. *BMC Infect Dis* **18**, 537 (2018).
290. Durack, J. & Christophersen, C. T. Human Respiratory and Gut Microbiomes—Do They Really Contribute to Respiratory Health? *Front. Pediatr.* **8**, 528 (2020).
291. Man, W. H., de Steenhuijsen Piters, W. A. A. & Bogaert, D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat Rev Microbiol* **15**, 259–270 (2017).
292. Krishnamurthy, S. R., Janowski, A. B., Zhao, G., Barouch, D. & Wang, D. Hyperexpansion of RNA Bacteriophage Diversity. *PLoS Biol* **14**, e1002409 (2016).
293. Pendleton, K. M. *et al.* Rapid Pathogen Identification in Bacterial Pneumonia Using Real-Time Metagenomics. *Am J Respir Crit Care Med* **196**, 1610–1612 (2017).
294. Xiao, J., Fiscella, K. A. & Gill, S. R. Oral microbiome: possible harbinger for children’s health. *International Journal of Oral Science* **12**, (2020).
295. Dubourg, G., Edouard, S. & Raoult, D. Relationship between nasopharyngeal microbiota and patient’s susceptibility to viral infection. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **17**, 437–447 (2019).
296. Gschwind, R., Fournier, T., Butel, M.-J. & Wydau-Dematteis, S. Établissement du microbiote: Une colonisation in *utero* déterminante pour la santé future ? *Med Sci (Paris)* **34**, 331–337 (2018).
297. Aagaard, K. *et al.* The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Science Translational Medicine* **6**, 237ra65-237ra65 (2014).
298. DiGiulio, D. B. Diversity of microbes in amniotic fluid. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* **17**, 2–11 (2012).
299. Dickson, R. P., Erb-Downward, J. R., Martinez, F. J. & Huffnagle, G. B. The Microbiome and the Respiratory Tract. *Annu. Rev. Physiol.* **78**, 481–504 (2016).

300. Wang, H. *et al.* Comprehensive human amniotic fluid metagenomics supports the sterile womb hypothesis. *Sci Rep* **12**, 6875 (2022).
301. Blaser, M. J. *et al.* Lessons learned from the prenatal microbiome controversy. *Microbiome* **9**, 8 (2021).
302. Madan, J. C. *et al.* Serial Analysis of the Gut and Respiratory Microbiome in Cystic Fibrosis in Infancy: Interaction between Intestinal and Respiratory Tracts and Impact of Nutritional Exposures. *mBio* **3**, (2012).
303. Hoen, A. G. *et al.* Associations between Gut Microbial Colonization in Early Life and Respiratory Outcomes in Cystic Fibrosis. *The Journal of Pediatrics* **167**, 138-147.e3 (2015).
304. Dickson, R. P. & Huffnagle, G. B. The Lung Microbiome: New Principles for Respiratory Bacteriology in Health and Disease. *PLoS Pathog* **11**, e1004923 (2015).
305. Delhaes, L. *et al.* The Airway Microbiota in Cystic Fibrosis: A Complex Fungal and Bacterial Community—Implications for Therapeutic Management. *PLoS ONE* **7**, e36313 (2012).
306. Huang, Y. J. & Boushey, H. A. The Sputum Microbiome in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbations. *Ann Am Thorac Soc* **12 Suppl 2**, S176-180 (2015).
307. Einarsson, G. G. *et al.* Community dynamics and the lower airway microbiota in stable chronic obstructive pulmonary disease, smokers and healthy non-smokers. *Thorax* **71**, 795–803 (2016).
308. Wang, Z. *et al.* Lung microbiome dynamics in COPD exacerbations. *Eur Respir J* **47**, 1082–1092 (2016).
309. Kumpitsch, C., Koskinen, K., Schöpf, V. & Moissl-Eichinger, C. The microbiome of the upper respiratory tract in health and disease. *BMC Biology* **17**, (2019).
310. Teo, S. M. *et al.* The Infant Nasopharyngeal Microbiome Impacts Severity of Lower Respiratory Infection and Risk of Asthma Development. *Cell Host & Microbe* **17**, 704–715 (2015).
311. Dimitri-Pinheiro, S., Soares, R. & Barata, P. The Microbiome of the Nose—Friend or Foe? *Allergy & Rhinology* **11**, 215265672091160 (2020).
312. Lysenko, E. S. *et al.* Nod1 Signaling Overcomes Resistance of *S. pneumoniae* to Opsonophagocytic Killing. *PLoS Pathog* **3**, e118 (2007).
313. Mejias, A. & Ramilo, O. Respiratory syncytial virus treatment and the respiratory microbiome. *The Lancet Respiratory Medicine* **8**, 941–943 (2020).
314. Teo, S. M. *et al.* Airway Microbiota Dynamics Uncover a Critical Window for Interplay of Pathogenic Bacteria and Allergy in Childhood Respiratory Disease. *Cell Host & Microbe* **24**, 341-352.e5 (2018).
315. Biesbroek, G. *et al.* Early Respiratory Microbiota Composition Determines Bacterial Succession Patterns and Respiratory Health in Children. *Am J Respir Crit Care Med* **190**, 1283–1292 (2014).
316. Rosas-Salazar, C. *et al.* Nasopharyngeal Microbiome in Respiratory Syncytial Virus Resembles Profile Associated with Increased Childhood Asthma Risk. *Am J Respir Crit Care Med* **193**, 1180–1183 (2016).
317. Wen, Z. *et al.* Distinct Nasopharyngeal and Oropharyngeal Microbiota of Children with Influenza A Virus Compared with Healthy Children. *BioMed Research International* **2018**, 1–9 (2018).
318. Man, W. H. *et al.* Bacterial and viral respiratory tract microbiota and host characteristics in children with lower respiratory tract infections: a matched case-control study. *The Lancet Respiratory Medicine* **7**, 417–426 (2019).
319. Toivonen, L. *et al.* Early nasal microbiota and acute respiratory infections during the first years of life. *Thorax* **74**, 592–599 (2019).

320. Suárez-Arrabal, M. C. *et al.* Nasopharyngeal bacterial burden and antibiotics: Influence on inflammatory markers and disease severity in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Journal of Infection* **71**, 458–469 (2015).
321. de Steenhuijsen Piters, W. A. A. *et al.* Nasopharyngeal Microbiota, Host Transcriptome, and Disease Severity in Children with Respiratory Syncytial Virus Infection. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **194**, 1104–1115 (2016).
322. Chonmaitree, T. *et al.* Nasopharyngeal microbiota in infants and changes during viral upper respiratory tract infection and acute otitis media. *PLoS ONE* **12**, e0180630 (2017).
323. Vissing, N. H., Chawes, B. L. K. & Bisgaard, H. Increased Risk of Pneumonia and Bronchiolitis after Bacterial Colonization of the Airways as Neonates. *Am J Respir Crit Care Med* **188**, 1246–1252 (2013).
324. Mansbach, J. M. *et al.* Respiratory syncytial virus and rhinovirus severe bronchiolitis are associated with distinct nasopharyngeal microbiota. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **137**, 1909-1913.e4 (2016).
325. Kloefer, K. M. *et al.* Detection of pathogenic bacteria during rhinovirus infection is associated with increased respiratory symptoms and asthma exacerbations. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **133**, 1301-1307.e3 (2014).
326. Jiang, W. *et al.* Impact of bacteria in nasal aspirates on disease severity of bronchiolitis. *Infectious Diseases* **48**, 82–86 (2016).
327. Mansbach, J. M. *et al.* Haemophilus-Dominant Nasopharyngeal Microbiota Is Associated With Delayed Clearance of Respiratory Syncytial Virus in Infants Hospitalized for Bronchiolitis. *The Journal of Infectious Diseases* **219**, 1804–1808 (2019).
328. Luna, P. N. *et al.* The association between anterior nares and nasopharyngeal microbiota in infants hospitalized for bronchiolitis. *Microbiome* **6**, 2 (2018).
329. Hasegawa, K. *et al.* Association of nasopharyngeal microbiota profiles with bronchiolitis severity in infants hospitalised for bronchiolitis. *European Respiratory Journal* **48**, 1329–1339 (2016).
330. Sonawane, A. R. *et al.* Microbiome-Transcriptome Interactions Related to Severity of Respiratory Syncytial Virus Infection. *Scientific Reports* **9**, (2019).
331. Ederveen, T. H. A. *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* **6**, (2018).
332. Brealey, J. C. *et al.* *Streptococcus pneumoniae* colonization of the nasopharynx is associated with increased severity during respiratory syncytial virus infection in young children: S. pneumoniae detection in RSV infection. *Respirology* **23**, 220–227 (2018).
333. Toivonen, L. *et al.* Association between rhinovirus species and nasopharyngeal microbiota in infants with severe bronchiolitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **143**, 1925-1928.e7 (2019).
334. Diaz-Diaz, A. *et al.* Viral Bacterial Interactions in Children: Impact on Clinical Outcomes. *The Pediatric Infectious Disease Journal* **38**, S14–S19 (2019).
335. Pulvirenti, G. *et al.* Lower Airway Microbiota. *Front. Pediatr.* **7**, 393 (2019).
336. Wang, F. *et al.* A meta-analysis reveals the effectiveness of probiotics and prebiotics against respiratory viral infection. *Bioscience Reports* BSR20203638 (2021) doi:10.1042/BSR20203638.

337. Williams, A. E. *et al.* Innate Imprinting by the Modified Heat-Labile Toxin of *Escherichia coli* (LTk63) Provides Generic Protection against Lung Infectious Disease. *J Immunol* **173**, 7435–7443 (2004).
338. Du, T., Lei, A., Zhang, N. & Zhu, C. The Beneficial Role of Probiotic *Lactobacillus* in Respiratory Diseases. *Front. Immunol.* **13**, 908010 (2022).
339. Tomosada, Y. *et al.* Nasally administered *Lactobacillus rhamnosus* strains differentially modulate respiratory antiviral immune responses and induce protection against respiratory syncytial virus infection. *BMC Immunol* **14**, 40 (2013).
340. Yang, Y., Jing, Y., Yang, J. & Yang, Q. Effects of intranasal administration with *Bacillus subtilis* on immune cells in the nasal mucosa and tonsils of piglets. *Exp Ther Med* **15**, 5189–5198 (2018).
341. Harper, A. *et al.* Viral Infections, the Microbiome, and Probiotics. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**, 596166 (2021).
342. De Grandi, R. *et al.* Putative Microbial Population Shifts Attributable to Nasal Administration of *Streptococcus salivarius* 24SMBc and *Streptococcus oralis* 89a. *Probiotics & Antimicro. Prot.* **11**, 1219–1226 (2019).
343. Breiteneder, H. *et al.* Biomarkers for diagnosis and prediction of therapy responses in allergic diseases and asthma. *Allergy* (2020) doi:10.1111/all.14582.
344. Verkaik, N. J. *et al.* *Streptococcus pneumoniae* exposure is associated with human metapneumovirus seroconversion and increased susceptibility to in vitro HMPV infection. *Clinical Microbiology and Infection* **17**, 1840–1844 (2011).
345. Nishimoto, A. *et al.* Transkingdom interactions important for the pathogenesis of human viruses. *The Journal of Infectious Diseases* jiaa735 (2020) doi:10.1093/infdis/jiaa735.
346. Stricker, S., Hain, T., Chao, C.-M. & Rudloff, S. Respiratory and Intestinal Microbiota in Pediatric Lung Diseases—Current Evidence of the Gut–Lung Axis. *IJMS* **23**, 6791 (2022).
347. Zama, D. *et al.* The Relationship between Gut Microbiota and Respiratory Tract Infections in Childhood: A Narrative Review. *Nutrients* **14**, 2992 (2022).
348. Groves, H. T., Higham, S. L., Moffatt, M. F., Cox, M. J. & Tregoning, J. S. Respiratory Viral Infection Alters the Gut Microbiota by Inducing Inappetence. *mBio* **11**, (2020).
349. Antunes, K. H. *et al.* Microbiota-derived acetate protects against respiratory syncytial virus infection through a GPR43-type 1 interferon response. *Nature Communications* **10**, (2019).
350. Steed, A. L. *et al.* The microbial metabolite desaminotyrosine protects from influenza through type I interferon. *Science* **357**, 498–502 (2017).
351. Gottschick, C. *et al.* Cohort Profile: The LoewenKIDS Study – life-course perspective on infections, the microbiome and the development of the immune system in early childhood. *International Journal of Epidemiology* **48**, 1042–1043h (2019).
352. Mindt, B. C. & DiGiandomenico, A. Microbiome Modulation as a Novel Strategy to Treat and Prevent Respiratory Infections. *Antibiotics* **11**, 474 (2022).
353. Belkacem, N. *et al.* *Lactobacillus paracasei* feeding improves immune control of influenza infection in mice. *PLoS ONE* **12**, e0184976 (2017).
354. Ji, J. *et al.* Probiotics protect against RSV infection by modulating the microbiota-alveolar-macrophage axis. *Acta Pharmacol Sin* (2021) doi:10.1038/s41401-020-00573-5.
355. Liu, S., Hu, P., Du, X., Zhou, T. & Pei, X. *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation for preventing respiratory infections in children: A Meta-analysis of Randomized, Placebo-controlled Trials. *Indian Pediatr* **50**, 377–381 (2013).

356. Hojsak, I. *et al.* *Lactobacillus* GG in the Prevention of Nosocomial Gastrointestinal and Respiratory Tract Infections. *Pediatrics* **125**, e1171–e1177 (2010).
357. Hojsak, I. *et al.* *Lactobacillus* GG in the prevention of gastrointestinal and respiratory tract infections in children who attend day care centers: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clinical Nutrition* **29**, 312–316 (2010).
358. Weiss, B. *et al.* Probiotic supplementation affects pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis: A pilot study: Probitics and Pulmonary Exacerbations in CF Patients. *Pediatr. Pulmonol.* **45**, 536–540 (2010).
359. Bruzzese, E. *et al.* Effect of *Lactobacillus* GG supplementation on pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis: A pilot study. *Clinical Nutrition* **26**, 322–328 (2007).
360. Huang, C.-F., Chie, W.-C. & Wang, I.-J. Efficacy of *Lactobacillus* Administration in School-Age Children with Asthma: A Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Nutrients* **10**, 1678 (2018).
361. King, S., Glanville, J., Sanders, M. E., Fitzgerald, A. & Varley, D. Effectiveness of probiotics on the duration of illness in healthy children and adults who develop common acute respiratory infectious conditions: a systematic review and meta-analysis. *Br J Nutr* **112**, 41–54 (2014).
362. Wang, Y. *et al.* Probiotics for prevention and treatment of respiratory tract infections in children: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine (Baltimore)* **95**, e4509 (2016).
363. Wylie, K. M., Weinstock, G. M. & Storch, G. A. Emerging view of the human virome. *Translational Research* **160**, 283–290 (2012).
364. Turner, D. *et al.* Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee. *Arch Virol* **168**, 74 (2023).
365. Walker, P. J. *et al.* Recent changes to virus taxonomy ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2022). *Arch Virol* **167**, 2429–2440 (2022).
366. Lim, E. S. *et al.* Early life dynamics of the human gut virome and bacterial microbiome in infants. *Nat Med* **21**, 1228–1234 (2015).
367. Reyes, A. *et al.* Gut DNA viromes of Malawian twins discordant for severe acute malnutrition. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, 11941–11946 (2015).
368. Bogaert, D. *et al.* Variability and Diversity of Nasopharyngeal Microbiota in Children: A Metagenomic Analysis. *PLoS ONE* **6**, e17035 (2011).
369. Martínez-Roig, A. *et al.* Viral Coinfection in Childhood Respiratory Tract Infections. *Archivos de Bronconeumología (English Edition)* **51**, 5–9 (2015).
370. Calaor-Morin, J. *et al.* Genotyping of respiratory syncytial virus among influenza-like illness and severe acute respiratory infection cases of children in the Philippines from 2006 to 2016. *Influenza Resp Viruses* **16**, 942–951 (2022).
371. de-Paris, F. *et al.* Evaluation of respiratory syncytial virus group A and B genotypes among nosocomial and community-acquired pediatric infections in southern Brazil. *Virology* **11**, 36 (2014).
372. Wang, Y. *et al.* Metagenomic analysis of viral genetic diversity in respiratory samples from children with severe acute respiratory infection in China. *Clinical Microbiology and Infection* **22**, 458.e1–458.e9 (2016).
373. Wylie, K. M., Mihindukulasuriya, K. A., Sodergren, E., Weinstock, G. M. & Storch, G. A. Sequence Analysis of the Human Virome in Febrile and Afebrile Children. *PLoS ONE* **7**, e27735 (2012).
374. Rascovan, N., Duraisamy, R. & Desnues, C. Metagenomics and the Human Virome in Asymptomatic Individuals. *Annual Review of Microbiology* **70**, 125–141 (2016).

375. Willner, D. *et al.* Case Studies of the Spatial Heterogeneity of DNA Viruses in the Cystic Fibrosis Lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* **46**, 127–131 (2012).
376. Dodi, G., Attanasi, M., Di Filippo, P., Di Pillo, S. & Chiarelli, F. Virome in the Lungs: The Role of Anelloviruses in Childhood Respiratory Diseases. *Microorganisms* **9**, 1357 (2021).
377. Barton, E. S. *et al.* Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature* **447**, 326–329 (2007).
378. Xiang, J. *et al.* Effect of Coinfection with GB Virus C on Survival among Patients with HIV Infection. *N Engl J Med* **345**, 707–714 (2001).
379. Tillmann, H. L. *et al.* Infection with GB Virus C and Reduced Mortality among HIV-Infected Patients. *N Engl J Med* **345**, 715–724 (2001).
380. Furman, D. *et al.* Cytomegalovirus infection enhances the immune response to influenza. *Sci. Transl. Med.* **7**, (2015).
381. Nilsson, C. *et al.* Does early EBV infection protect against IgE sensitization? *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **116**, 438–444 (2005).
382. Schaub, B., Lauener, R. & von Mutius, E. The many faces of the hygiene hypothesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **117**, 969–977 (2006).
383. Prati, B., Marangoni, B. & Boccardo, E. Human papillomavirus and genome instability: from productive infection to cancer. *Clinics* **73**, e539s (2018).
384. Münz, C. Latency and lytic replication in Epstein–Barr virus-associated oncogenesis. *Nat Rev Microbiol* **17**, 691–700 (2019).
385. Bouza, E. *et al.* Overview of virus and cancer relationships. Position paper. *Rev Esp Quimioter* **34**, 525–555 (2021).
386. Abeles, S. R. & Pride, D. T. Molecular Bases and Role of Viruses in the Human Microbiome. *Journal of Molecular Biology* **426**, 3892–3906 (2014).
387. Barr, J. J. *et al.* Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 10771–10776 (2013).
388. Chin, W. H. *et al.* Bacteriophage adaptation to a mammalian mucosa reveals a trans-domain evolutionary axis. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.05.11.443681> (2021) doi:10.1101/2021.05.11.443681.
389. Young, J. C. *et al.* Viral Metagenomics Reveal Blooms of Anelloviruses in the Respiratory Tract of Lung Transplant Recipients: Lung Transplant Allograft Virome. *American Journal of Transplantation* **15**, 200–209 (2015).
390. Maggi, F. *et al.* TT Virus in the Nasal Secretions of Children with Acute Respiratory Diseases: Relations to Viremia and Disease Severity. *JVI* **77**, 2418–2425 (2003).
391. Maggi, F. *et al.* TT Virus Loads and Lymphocyte Subpopulations in Children with Acute Respiratory Diseases. *J Virol* **77**, 9081–9083 (2003).
392. Li, Y. *et al.* Altered respiratory virome and serum cytokine profile associated with recurrent respiratory tract infections in children. *Nat Commun* **10**, 2288 (2019).
393. Krishnamoorthy, N. *et al.* Early infection with respiratory syncytial virus impairs regulatory T cell function and increases susceptibility to allergic asthma. *Nat Med* **18**, 1525–1530 (2012).
394. Furuse, Y. *et al.* Association Between Preceding Viral Respiratory Infection and Subsequent Respiratory Illnesses Among Children: A Prospective Cohort Study in the Philippines. *The Journal of Infectious Diseases* **219**, 197–205 (2019).
395. Tiew, P. Y. *et al.* The Mycobioome in Health and Disease: Emerging Concepts, Methodologies and Challenges. *Mycopathologia* (2020) doi:10.1007/s11046-019-00413-z.

396. Tipton, L., Ghedin, E. & Morris, A. The lung mycobiome in the next-generation sequencing era. *Virulence* **8**, 334–341 (2017).
397. Mitchell, A. & Glanville, A. The Human Respiratory Microbiome: Implications and Impact. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* **39**, 199–212 (2018).
398. Willger, S. D. *et al.* Characterization and quantification of the fungal microbiome in serial samples from individuals with cystic fibrosis. *Microbiome* **2**, 40 (2014).
399. Steenwyk, J. L. *et al.* Genomic and phenotypic analysis of COVID-19-associated pulmonary aspergillosis isolates of *Aspergillus fumigatus*. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.11.06.371971> (2020) doi:10.1101/2020.11.06.371971.
400. Angebault, C. *et al.* Grippe sévère, un terrain favorable pour les infections aspergillaires ? *Journal de Mycologie Médicale* **27**, e10–e11 (2017).
401. Sellart-Altisent, M., Torres-Rodríguez, J. M., Gómez de Ana, S. & Alvarado-Ramírez, E. Microbiota fúngica nasal en sujetos alérgicos y sanos. *Revista Iberoamericana de Micología* **24**, 125–130 (2007).
402. Lira-Lucio, J. A. *et al.* Lung Microbiome Participation in Local Immune Response Regulation in Respiratory Diseases. *Microorganisms* **8**, 1059 (2020).
403. Marquant, Q. *et al.* The microbiota plays a critical role in the reactivity of lung immune components to innate ligands. *FASEB j.* **35**, (2021).
404. Pfeiffer, J. K. & Virgin, H. W. Viral immunity. Transkingdom control of viral infection and immunity in the mammalian intestine. *Science* **351**, (2016).
405. Taubenberger, J. K., Reid, A. H. & Fanning, T. G. The 1918 Influenza Virus: A Killer Comes into View. *Virology* **274**, 241–245 (2000).
406. Pichon, M., Lina, B. & Josset, L. Impact of the Respiratory Microbiome on Host Responses to Respiratory Viral Infection. *Vaccines* **5**, 40 (2017).
407. Weinberger, D. M., Klugman, K. P., Steiner, C. A., Simonsen, L. & Viboud, C. Association between Respiratory Syncytial Virus Activity and Pneumococcal Disease in Infants: A Time Series Analysis of US Hospitalization Data. *PLoS Med* **12**, e1001776 (2015).
408. Sajjan, U. S. *et al.* H. influenzae potentiates airway epithelial cell responses to rhinovirus by increasing ICAM-1 and TLR3 expression. *FASEB j.* **20**, 2121–2123 (2006).
409. Wilks, J. & Golovkina, T. Influence of Microbiota on Viral Infections. *PLoS Pathog* **8**, e1002681 (2012).
410. Drajac, C. Caractérisation et modulation de la réponse immunitaire innée au cours de l'infection par le Virus Respiratoire Syncytial en période néonatale. (Université Paris-Saclay (ComUE), 2018).
411. Wang, J. *et al.* Bacterial colonization dampens influenza-mediated acute lung injury via induction of M2 alveolar macrophages. *Nat Commun* **4**, 2106 (2013).
412. Abt, M. C. *et al.* Commensal Bacteria Calibrate the Activation Threshold of Innate Antiviral Immunity. *Immunity* **37**, 158–170 (2012).
413. Wu, S. *et al.* Microbiota Regulates the TLR7 Signaling Pathway Against Respiratory Tract Influenza A Virus Infection. *Curr Microbiol* **67**, 414–422 (2013).
414. Garcia-Vidal, C. *et al.* Environmental variables associated with an increased risk of invasive aspergillosis. *Clinical Microbiology and Infection* **20**, O939–O945 (2014).
415. Górski, A. *et al.* Perspectives of Phage–Eukaryotic Cell Interactions to Control Epstein–Barr Virus Infections. *Front. Microbiol.* **9**, 630 (2018).

416. Organisation mondiale de la Santé. Prise en charge clinique de l'infection respiratoire aiguë sévère lorsqu'une infection par le nouveau coronavirus (2019-nCoV) est soupçonnée. (2020).
417. Graf, E. H. *et al.* Unbiased Detection of Respiratory Viruses by Use of RNA Sequencing-Based Metagenomics: a Systematic Comparison to a Commercial PCR Panel. *Journal of Clinical Microbiology* **54**, 1000–1007 (2016).
418. Xu, L. *et al.* Characterization of the nasopharyngeal viral microbiome from children with community-acquired pneumonia but negative for Luminex xTAG respiratory viral panel assay detection. *Journal of Medical Virology* **89**, 2098–2107 (2017).
419. Yang, Y. *et al.* Targeted Sequencing of Respiratory Viruses in Clinical Specimens for Pathogen Identification and Genome-Wide Analysis. in *The Human Virome* (eds. Moya, A. & Pérez Brocal, V.) vol. 1838 125–140 (Springer New York, 2018).
420. Cummings, M. J. *et al.* Precision Surveillance for Viral Respiratory Pathogens: Virome Capture Sequencing for the Detection and Genomic Characterization of Severe Acute Respiratory Infection in Uganda. *Clinical Infectious Diseases* **68**, 1118–1125 (2019).
421. Chen, L. *et al.* RNA based mNGS approach identifies a novel human coronavirus from two individual pneumonia cases in 2019 Wuhan outbreak. *Emerging Microbes & Infections* **9**, 313–319 (2020).
422. Deng, L. *et al.* A Protocol for Extraction of Infective Viromes Suitable for Metagenomics Sequencing from Low Volume Fecal Samples. *Viruses* **11**, 667 (2019).
423. Takeuchi, S. *et al.* Metagenomic analysis using next-generation sequencing of pathogens in bronchoalveolar lavage fluid from pediatric patients with respiratory failure. *Scientific Reports* **9**, (2019).
424. Simner, P. J., Miller, S. & Carroll, K. C. Understanding the Promises and Hurdles of Metagenomic Next-Generation Sequencing as a Diagnostic Tool for Infectious Diseases. *Clinical Infectious Diseases* **66**, 778–788 (2018).
425. Lewandowska, D. W. *et al.* Optimization and validation of sample preparation for metagenomic sequencing of viruses in clinical samples. *Microbiome* **5**, (2017).
426. Knepp, J. H., Geahr, M. A., Forman, M. S. & Valsamakis, A. Comparison of Automated and Manual Nucleic Acid Extraction Methods for Detection of Enterovirus RNA. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 3532–3536 (2003).
427. Verheyen, J. *et al.* Extraction of viral nucleic acids: Comparison of five automated nucleic acid extraction platforms. *Journal of Clinical Virology* **54**, 255–259 (2012).
428. Lewandowski, K. *et al.* The Effect of Nucleic Acid Extraction Platforms and Sample Storage on the Integrity of Viral RNA for Use in Whole Genome Sequencing. *The Journal of Molecular Diagnostics* **19**, 303–312 (2017).
429. Zhang, D. *et al.* Metagenomic analysis of viral nucleic acid extraction methods in respiratory clinical samples. *BMC Genomics* **19**, (2018).
430. Angebault, C., Payen, M., Woerther, P.-L., Rodriguez, C. & Botterel, F. Combined bacterial and fungal targeted amplicon sequencing of respiratory samples: Does the DNA extraction method matter? *PLoS ONE* **15**, e0232215 (2020).
431. Thoendel, M. *et al.* Impact of Contaminating DNA in Whole-Genome Amplification Kits Used for Metagenomic Shotgun Sequencing for Infection Diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* **55**, 1789–1801 (2017).
432. Drengenes, C. *et al.* Laboratory contamination in airway microbiome studies. *BMC Microbiology* **19**, (2019).

433. Stinson, L. F., Keelan, J. A. & Payne, M. S. Identification and removal of contaminating microbial DNA from PCR reagents: impact on low-biomass microbiome analyses. *Letters in Applied Microbiology* **68**, 2–8 (2019).
434. Davis, N. M., Proctor, D. M., Holmes, S. P., Relman, D. A. & Callahan, B. J. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome* **6**, 226 (2018).
435. Everitt, B. *Cluster Analysis*. (1974).
436. Murtagh, F. & Legendre, P. Ward's Hierarchical Agglomerative Clustering Method: Which Algorithms Implement Ward's Criterion? *J Classif* **31**, 274–295 (2014).
437. Stockman, L. J., Curns, A. T., Anderson, L. J. & Fischer-Langley, G. Respiratory Syncytial Virus-associated Hospitalizations Among Infants and Young Children in the United States, 1997–2006: *The Pediatric Infectious Disease Journal* **31**, 5–9 (2012).
438. Pifferi, M. *et al.* Associations between Nasal Torquetenovirus Load and Spirometric Indices in Children with Asthma. *J INFECT DIS* **192**, 1141–1148 (2005).
439. Hoefnagels, I. *et al.* The Role of the Respiratory Microbiome and Viral Presence in Lower Respiratory Tract Infection Severity in the First Five Years of Life. *Microorganisms* **9**, 1446 (2021).
440. Brand, H. K. *et al.* Infection with multiple viruses is not associated with increased disease severity in children with bronchiolitis. *Pediatr. Pulmonol.* **47**, 393–400 (2012).
441. Althouse, B. M. *et al.* Differences in clinical severity of respiratory viral infections in hospitalized children. *Sci Rep* **11**, 5163 (2021).
442. Martin, E. T., Kuypers, J., Wald, A. & Englund, J. A. Multiple versus single virus respiratory infections: viral load and clinical disease severity in hospitalized children: Viral coinfection in children. *Influenza and Other Respiratory Viruses* **6**, 71–77 (2012).
443. Peng, D. *et al.* Multipathogen infections in hospitalized children with acute respiratory infections. *Virology* **6**, 155 (2009).
444. Canducci, F. *et al.* Two-year prospective study of single infections and co-infections by respiratory syncytial virus and viruses identified recently in infants with acute respiratory disease. *J. Med. Virol.* **80**, 716–723 (2008).
445. Nascimento, M. S. *et al.* High Rate of Viral Identification and Coinfections in Infants with Acute Bronchiolitis. *Clinics* **65**, 1133–1137 (2010).
446. Paranhos-Baccalà, G. *et al.* Mixed Respiratory Virus Infections. *Journal of Clinical Virology* **43**, 407–410 (2008).
447. Drori, Y. *et al.* Influenza A Virus Inhibits RSV Infection via a Two-Wave Expression of IFIT Proteins. *Viruses* **12**, 1171 (2020).
448. García García, M. L. *et al.* [Viral infection of the lower respiratory tract in hospitalized infants: etiology, clinical features and risk factors]. *An Esp Pediatr* **55**, 101–107 (2001).
449. Semple, M. G. *et al.* Dual Infection of Infants by Human Metapneumovirus and Human Respiratory Syncytial Virus Is Strongly Associated with Severe Bronchiolitis. *J INFECT DIS* **191**, 382–386 (2005).
450. Aberle, J. H. *et al.* Single Versus Dual Respiratory Virus Infections in Hospitalized Infants: Impact on Clinical Course of Disease and Interferon- γ Response. *Pediatric Infectious Disease Journal* **24**, 605–610 (2005).
451. Flores C, J. C. *et al.* [Human bocavirus in Chile: clinical characteristics and epidemiological profile in children with acute respiratory tract infections]. *Rev Chilena Infectol* **28**, 504–511 (2011).

452. Greensill, J. *et al.* Human Metapneumovirus in Severe Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 372–375 (2003).
453. Richard, N. *et al.* The Impact of Dual Viral Infection in Infants Admitted to a Pediatric Intensive Care Unit Associated with Severe Bronchiolitis. *Pediatric Infectious Disease Journal* **27**, 213–217 (2008).
454. Fuller, D. G., Davie, G., Lamb, D., Carlin, J. B. & Curtis, N. Analysis of Respiratory Viral Coinfection and Cytomegalovirus Coisolation in Pediatric Inpatients. *Pediatric Infectious Disease Journal* **24**, 195–200 (2005).
455. Roux, S. *et al.* Towards quantitative viromics for both double-stranded and single-stranded DNA viruses. *PeerJ* **4**, e2777 (2016).
456. Górski, A. *et al.* Phage as a Modulator of Immune Responses. in *Advances in Virus Research* vol. 83 41–71 (Elsevier, 2012).
457. Blatter, J. A. *et al.* Anellovirus loads are associated with outcomes in pediatric lung transplantation. *Pediatr Transplantation* **22**, e13069 (2018).
458. Ninomiya, M., Takahashi, M., Nishizawa, T., Shimosegawa, T. & Okamoto, H. Development of PCR Assays with Nested Primers Specific for Differential Detection of Three Human Anelloviruses and Early Acquisition of Dual or Triple Infection during Infancy. *J Clin Microbiol* **46**, 507–514 (2008).
459. Kaczorowska, J. *et al.* Early-Life Colonization by Anelloviruses in Infants. *Viruses* **14**, 865 (2022).
460. Arze, C. A. *et al.* Global genome analysis reveals a vast and dynamic anellovirus landscape within the human virome. *Cell Host & Microbe* **29**, 1305–1315.e6 (2021).
461. Van Leuven, J. T. *et al.* Rhinovirus Reduces the Severity of Subsequent Respiratory Viral Infections by Interferon-Dependent and -Independent Mechanisms. *mSphere* **6**, (2021).
462. Dee, K. *et al.* Human Rhinovirus Infection Blocks Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Replication Within the Respiratory Epithelium: Implications for COVID-19 Epidemiology. *The Journal of Infectious Diseases* **224**, 31–38 (2021).
463. Greer, R. M. *et al.* Do rhinoviruses reduce the probability of viral co-detection during acute respiratory tract infections? *Journal of Clinical Virology* **45**, 10–15 (2009).
464. Casalegno, J. S. *et al.* Rhinoviruses delayed the circulation of the pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus in France. *Clinical Microbiology and Infection* **16**, 326–329 (2010).
465. Achten, N. B. *et al.* Interference Between Respiratory Syncytial Virus and Human Rhinovirus Infection in Infancy. *The Journal of Infectious Diseases* **215**, 1102–1106 (2017).
466. Varsani, A. & Krupovic, M. Family Genomoviridae: 2021 taxonomy update. *Arch Virol* **166**, 2911–2926 (2021).
467. Uch, R. *et al.* Divergent Gemycircularvirus in HIV-Positive Blood, France. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 2096–2098 (2015).
468. Wang, J. *et al.* Gemykibivirus Genome in Lower Respiratory Tract of Elderly Woman With Unexplained Acute Respiratory Distress Syndrome. *Clinical Infectious Diseases* **69**, 861–864 (2019).
469. Abbas, A. A. *et al.* Redondoviridae, a Family of Small, Circular DNA Viruses of the Human Oro-Respiratory Tract Associated with Periodontitis and Critical Illness. *Cell Host & Microbe* **25**, 719–729.e4 (2019).
470. Abbas, A., Taylor, L. J., Collman, R. G., Bushman, F. D., & ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Redondoviridae. *Journal of General Virology* **102**, (2021).
471. Tu, N. *et al.* Redondoviridae: High Prevalence and Possibly Chronic Shedding in Human Respiratory Tract, But No Zoonotic Transmission. *Viruses* **13**, 533 (2021).

472. Lázaro-Perona, F. *et al.* Metagenomic Detection of Two Vientoviruses in a Human Sputum Sample. *Viruses* **12**, 327 (2020).
473. Cui, L. *et al.* Identification and genetic characterization of a novel circular single-stranded DNA virus in a human upper respiratory tract sample. *Arch Virol* **162**, 3305–3312 (2017).
474. Keeler, E. L. *et al.* Widespread, human-associated redondoviruses infect the commensal protozoan *Entamoeba gingivalis*. *Cell Host & Microbe* **31**, 58–68.e5 (2023).
475. Makoa-Meng, M. *et al.* Correlation of Redondovirus and *Entamoeba gingivalis* Detections in the Human Oral Cavity Suggests That This Amoeba Is Possibly the Redondovirus Host. *IJMS* **24**, 6303 (2023).
476. Prades, Y. *et al.* Cyclovirus detection in Chilean adults with and without community-acquired pneumonia. *J Med Virol* **93**, 4786–4793 (2021).
477. Bouzas, M. L. *et al.* Respiratory syncytial virus a and b display different temporal patterns in a 4-year prospective cross-sectional study among children with acute respiratory infection in a tropical city. *Medicine (Baltimore)* **95**, e5142 (2016).
478. Gamiño-Arroyo, A. E. *et al.* Epidemiology and clinical characteristics of respiratory syncytial virus infections among children and adults in Mexico. *Influenza Other Respi Viruses* **11**, 48–56 (2017).
479. Rios Guzman, E. & Hultquist, J. F. Clinical and biological consequences of respiratory syncytial virus genetic diversity. *Therapeutic Advances in Infection* **9**, 204993612211280 (2022).
480. Midulla, F. *et al.* Novel Variants of Respiratory Syncytial Virus A ON1 Associated With Increased Clinical Severity of Bronchiolitis. *The Journal of Infectious Diseases* **222**, 102–110 (2020).
481. Rodriguez-Fernandez, R. *et al.* Respiratory Syncytial Virus Genotypes, Host Immune Profiles, and Disease Severity in Young Children Hospitalized With Bronchiolitis. *The Journal of Infectious Diseases* **217**, 24–34 (2018).
482. Valley-Omar, Z. *et al.* Human respiratory syncytial virus diversity and epidemiology among patients hospitalized with severe respiratory illness in South Africa, 2012–2015. *Influenza Resp Viruses* **16**, 222–235 (2022).
483. Laham, F. R. *et al.* Clinical Profiles of Respiratory Syncytial Virus Subtypes A AND B Among Children Hospitalized with Bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J* **36**, 808–810 (2017).
484. Papadopoulos, N. G. *et al.* Does respiratory syncytial virus subtype influences the severity of acute bronchiolitis in hospitalized infants? *Respiratory Medicine* **98**, 879–882 (2004).
485. Marsh, R. L. *et al.* The microbiota in bronchoalveolar lavage from young children with chronic lung disease includes taxa present in both the oropharynx and nasopharynx. *Microbiome* **4**, 37 (2016).
486. Krishnamurthy, S. R. & Wang, D. Origins and challenges of viral dark matter. *Virus Res* **239**, 136–142 (2017).
487. Dutilh, B. E. *et al.* A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. *Nat Commun* **5**, 4498 (2014).
488. Freer, G. *et al.* The Virome and Its Major Component, Anellovirus, a Convoluting System Molding Human Immune Defenses and Possibly Affecting the Development of Asthma and Respiratory Diseases in Childhood. *Frontiers in Microbiology* **9**, (2018).
489. Romero-Espinoza, J. A. *et al.* Virome and bacteriome characterization of children with pneumonia and asthma in Mexico City during winter seasons 2014 and 2015. *PLOS ONE* **13**, e0192878 (2018).

490. Prasetyo, A. A. *et al.* Respiratory Viruses and Torque Teno Virus in Adults with Acute Respiratory Infections. *Intervirology* **58**, 57–68 (2015).
491. Del Rosal, T. *et al.* Torque Teno Virus in Nasopharyngeal Aspirate of Children With Viral Respiratory Infections. *Pediatric Infectious Disease Journal* **42**, 184–188 (2023).
492. Parras-Moltó, M., Rodríguez-Galet, A., Suárez-Rodríguez, P. & López-Bueno, A. Evaluation of bias induced by viral enrichment and random amplification protocols in metagenomic surveys of saliva DNA viruses. *Microbiome* **6**, 119 (2018).
493. De Vries, J. J. C. *et al.* Benchmark of thirteen bioinformatic pipelines for metagenomic virus diagnostics using datasets from clinical samples. *Journal of Clinical Virology* **141**, 104908 (2021).
494. Sui, H. *et al.* Impact of DNA Extraction Method on Variation in Human and Built Environment Microbial Community and Functional Profiles Assessed by Shotgun Metagenomics Sequencing. *Front. Microbiol.* **11**, 953 (2020).
495. Yolken, R. H. *et al.* Chlorovirus ATCV-1 is part of the human oropharyngeal virome and is associated with changes in cognitive functions in humans and mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 16106–16111 (2014).
496. Kjartansdóttir, K. R. *et al.* Traces of ATCV-1 associated with laboratory component contamination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, E925–E926 (2015).
497. Ottmann, M. Ces virus qui nous habitent et qui nous visitent : le virome humain. *Med Sci (Paris)* **38**, 1028–1038 (2022).
498. Megremis, S. *et al.* Respiratory eukaryotic virome expansion and bacteriophage deficiency characterize childhood asthma. *Sci Rep* **13**, 8319 (2023).
499. Rosal, T. D. *et al.* Torque Teno Virus in Nasopharyngeal Aspirate of Children With Respiratory Infections. <https://www.researchsquare.com/article/rs-1197264/v1> (2022) doi:10.21203/rs.3.rs-1197264/v1.
500. Galmès, J. *et al.* Potential implication of new torque teno mini viruses in parapneumonic empyema in children. *Eur Respir J* **42**, 470–479 (2013).
501. Eibach, D. *et al.* Viral metagenomics revealed novel betatorquevirus species in pediatric inpatients with encephalitis/meningoencephalitis from Ghana. *Scientific Reports* **9**, (2019).
502. Zhang, Y. *et al.* A novel species of torque teno mini virus (TTMV) in gingival tissue from chronic periodontitis patients. *Sci Rep* **6**, 26739 (2016).
503. Rovira Rubió, J. *et al.* Respiratory virome profiles reflect antiviral immune responses. *Allergy* all.15634 (2023) doi:10.1111/all.15634.
504. McCauley, K. *et al.* Distinct nasal airway bacterial microbiotas differentially relate to exacerbation in pediatric patients with asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **144**, 1187–1197 (2019).
505. Hasegawa, K. *et al.* Nasal Airway Microbiota Profile and Severe Bronchiolitis in Infants: A Case-control Study. *Pediatric Infectious Disease Journal* **36**, 1044–1051 (2017).
506. Robinson, M. D. & Oshlack, A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol* **11**, R25 (2010).
507. Mandal, S. *et al.* Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microbial Ecology in Health & Disease* **26**, (2015).
508. Flynn, M. & Dooley, J. The microbiome of the nasopharynx. *Journal of Medical Microbiology* **70**, (2021).
509. Pichon, M., Lina, B. & Josset, L. Caractérisation et impact du microbiote bactérien respiratoire sur les maladies virales. *Virologie* **22**, 161–172 (2018).

510. Mick, E. *et al.* Integrated host/microbe metagenomics enables accurate lower respiratory tract infection diagnosis in critically ill children. *Journal of Clinical Investigation* **133**, e165904 (2023).
511. Alsayed, A. R. *et al.* Molecular Accounting and Profiling of Human Respiratory Microbial Communities: Toward Precision Medicine by Targeting the Respiratory Microbiome for Disease Diagnosis and Treatment. *IJMS* **24**, 4086 (2023).
512. Zhang, J. *et al.* Differential Oral Microbial Input Determines Two Microbiota Pneumo-Types Associated with Health Status. *Advanced Science* 2203115 (2022) doi:10.1002/adv.202203115.
513. Stewart, C. J. *et al.* Associations of Nasopharyngeal Metabolome and Microbiome with Severity among Infants with Bronchiolitis. A Multiomic Analysis. *Am J Respir Crit Care Med* **196**, 882–891 (2017).
514. Oliva, J. & Terrier, O. Viral and Bacterial Co-Infections in the Lungs: Dangerous Liaisons. *Viruses* **13**, 1725 (2021).
515. Lion, C., Escande, F. & Burdin, J. C. Capnocytophaga canimorsus infections in human: Review of the literature and cases report. *Eur J Epidemiol* **12**, 521–533 (1996).
516. Alba, C. *et al.* Nasal and Fecal Microbiota and Immunoprofiling of Infants With and Without RSV Bronchiolitis. *Front. Microbiol.* **12**, 667832 (2021).
517. Long, X. *et al.* [Impact of Streptococcus pneumoniae colonization in upper airway on the clinical manifestations of children with respiratory syncytial virus infection]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* **60**, 694–699 (2022).
518. Feng, Q. *et al.* Metatranscriptome Reveals Specific Immune and Microbial Signatures of Respiratory Syncytial Virus Infection in Children. *Microbiol Spectr* **11**, e04107-22 (2023).
519. McCauley, K. E. *et al.* Moraxella-dominated pediatric nasopharyngeal microbiota associate with upper respiratory infection and sinusitis. *PLoS ONE* **16**, e0261179 (2021).
520. Yagi, K., Asai, N., Huffnagle, G. B., Lukacs, N. W. & Fonseca, W. Early-Life Lung and Gut Microbiota Development and Respiratory Syncytial Virus Infection. *Front. Immunol.* **13**, 877771 (2022).
521. McNamara, P. S. Bronchoalveolar lavage cellularity in infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Archives of Disease in Childhood* **88**, 922–926 (2003).
522. Stephanie. Benjamini-Hochberg Procedure. *Statistics How To* <https://www.statisticshowto.com/benjamini-hochberg-procedure/> (2015).
523. Anders, S. & Huber, W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* **11**, R106 (2010).
524. Fu, Y. *et al.* Protein profiling of nasopharyngeal aspirates of hospitalized and outpatients revealed cytokines associated with severe influenza A(H1N1)pdm09 virus infections: A pilot study. *Cytokine* **86**, 10–14 (2016).
525. Kaur, R. *et al.* Heterogeneous Ribonucleoprotein A1 (hnRNPA1) Interacts with the Nucleoprotein of the Influenza A Virus and Impedes Virus Replication. *Viruses* **14**, 199 (2022).
526. McCall, M. N. *et al.* A systems genomics approach uncovers molecular associates of RSV severity. *PLoS Comput Biol* **17**, e1009617 (2021).
527. Dapat, C. *et al.* Gene signature of children with severe respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Res* **89**, 1664–1672 (2021).
528. Flerlage, T. *et al.* Single cell transcriptomics identifies distinct profiles in pediatric acute respiratory distress syndrome. *Nat Commun* **14**, 3870 (2023).
529. Brand, H. K. *et al.* CD4+ T-cell counts and interleukin-8 and CCL-5 plasma concentrations discriminate disease severity in children with RSV infection. *Pediatr Res* **73**, 187–193 (2013).

530. Olin, A. *et al.* Stereotypic Immune System Development in Newborn Children. *Cell* **174**, 1277-1292.e14 (2018).
531. Sadeghi, K. *et al.* Immaturity of Infection Control in Preterm and Term Newborns Is Associated with Impaired Toll-Like Receptor Signaling. *J INFECT DIS* **195**, 296–302 (2007).
532. Mankovich, N., Kehoe, E., Peterson, A. & Kirby, M. Pathway expression analysis. *Sci Rep* **12**, 21839 (2022).
533. Henrickson, S. E. *et al.* Genomic Circuitry Underlying Immunological Response to Pediatric Acute Respiratory Infection. *Cell Reports* **22**, 411–426 (2018).
534. Feng, Q. *et al.* Meta-Analysis of Whole Blood Transcriptome Datasets Characterizes the Immune Response of Respiratory Syncytial Virus Infection in Children. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **12**, 878430 (2022).
535. Barral-Arca, R. *et al.* A Meta-Analysis of Multiple Whole Blood Gene Expression Data Unveils a Diagnostic Host-Response Transcript Signature for Respiratory Syncytial Virus. *IJMS* **21**, 1831 (2020).
536. Yu, J. *et al.* Host Gene Expression in Nose and Blood for the Diagnosis of Viral Respiratory Infection. *The Journal of Infectious Diseases* **219**, 1151–1161 (2019).
537. Porto, B. N. & Moraes, T. J. The triad: respiratory microbiome – virus – immune response in the pathophysiology of pulmonary viral infections. *Expert Review of Respiratory Medicine* 1–13 (2021) doi:10.1080/17476348.2021.1893168.
538. Galmès, J. Isolement et caractérisation de nouvelles espèces de Torque Teno Mini Virus (TTMV): implication potentielle dans la pathogenèse de la pneumonie. (2014).
539. Liou, S. *et al.* Anellovirus Structure Reveals a Mechanism for Immune Evasion. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2022.07.01.498313> (2022) doi:10.1101/2022.07.01.498313.
540. Fulci, V., Stronati, L., Cucchiara, S., Laudadio, I. & Carissimi, C. Emerging Roles of Gut Virome in Pediatric Diseases. *IJMS* **22**, 4127 (2021).
541. Gregory, A. C. *et al.* MetaPop: a pipeline for macro- and microdiversity analyses and visualization of microbial and viral metagenome-derived populations. *Microbiome* **10**, 49 (2022).
542. Buffet-Bataillon, S. *et al.* Efficient and Quality-Optimized Metagenomic Pipeline Designed for Taxonomic Classification in Routine Microbiological Clinical Tests. *Microorganisms* **10**, 711 (2022).
543. Zhou, Z., Martin, C., Kosmopoulos, J. C. & Anantharaman, K. ViWrap: A modular pipeline to identify, bin, classify, and predict viral-host relationships for viruses from metagenomes. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2023.01.30.526317> (2023) doi:10.1101/2023.01.30.526317.
544. Ru, J., Khan Mirzaei, M., Xue, J., Peng, X. & Deng, L. ViroProfiler: a containerized bioinformatics pipeline for viral metagenomic data analysis. *Gut Microbes* **15**, 2192522 (2023).
545. Olivieri, D. & Scoditti, E. Impact of environmental factors on lung defences. *European Respiratory Review* **14**, 51–56 (2005).
546. Yi, X., Cai, H., Gao, J. & Wang, Z. Environmental exposure, airway microbiome and respiratory health: You are what you breathe. *Clinical & Translational Med* **13**, e1394 (2023).
547. Liu, J. *et al.* Association between the nasopharyngeal microbiome and metabolome in patients with COVID-19. *Synthetic and Systems Biotechnology* **6**, 135–143 (2021).
548. Merenstein, C. *et al.* Signatures of COVID-19 severity and immune response in the respiratory tract microbiome. <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.04.02.21254514> (2021) doi:10.1101/2021.04.02.21254514.

549. Mostafa, H. H. *et al.* Metagenomic Next-Generation Sequencing of Nasopharyngeal Specimens Collected from Confirmed and Suspect COVID-19 Patients. *mBio* **11**, (2020).
550. Fujiogi, M. *et al.* Integrated relationship of nasopharyngeal airway host response and microbiome associates with bronchiolitis severity. *Nat Commun* **13**, 4970 (2022).