



**Étude des biomarqueurs bactériens du microbiome respiratoire
pendant une infection au SARS-CoV-2**

Par William Bourumeau

**Mémoire présenté à l'Université du Québec à Chicoutimi en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.) en sciences cliniques et biomédicales**

Québec, Canada

©William Bourumeau, 2023

RÉSUMÉ

La COVID-19 est la maladie causée par l'infection au virus du SARS-CoV-2, auquel le monde a été confronté dès le début de l'année 2020. Se transmettant par microgouttelettes. Il atteint les voies respiratoires et provoque des dégâts systémiques. Le spectre de la symptomatologie de la COVID-19 est très large, allant de la forme asymptomatique jusqu'à l'hospitalisation nécessitant une assistance respiratoire, pouvant même entraîner la mort. Dans ce contexte, le monde de la recherche a concentré ses efforts afin de trouver des solutions pour endiguer la propagation du virus, mais également pour connaître les fondements biologiques permettant de cibler les personnes à risque de développer la forme sévère, une nécessité pour réduire la pression sur le système de santé face à de nouvelles vagues. Le système respiratoire abrite un microbiome intimement lié à la santé de l'hôte, et qui peut également influencer l'établissement, et l'évolution d'une maladie. Des études ont montré que le microbiome peut moduler le système immunitaire et protéger l'hôte en maintenant un environnement robuste et résistant à l'inflammation et aux pathogènes. Le projet de ce mémoire avait pour objectif de comparer la diversité microbienne du microbiome respiratoire des personnes atteintes de la COVID-19 (n=182) à celle des personnes non atteintes (n=75), à partir du gargarisme obtenu à la suite du test de dépistage de la COVID-19. À travers ce projet, il a également été possible de rendre compte des différences de diversité microbienne chez les personnes infectées par SARS-CoV-2 au niveau de la cavité buccale et oropharyngée. Les analyses comparatives ont démontré une différence significative entre les communautés bactériennes chez les personnes infectées par le virus comparativement aux personnes non infectées. Des biomarqueurs bactériens ont été ciblés pour le microbiome des personnes atteintes et non-atteintes. De même, une plus grande diversité taxonomique bactérienne a été observée chez les personnes testées positives à la COVID-19. Cette étude suggère une dysbiose du tractus respiratoire chez ces personnes. Dans ce contexte, des pathogènes opportunistes pourraient causer des infections secondaires et aggraver la maladie. Enfin, l'identification de biomarqueurs pourrait servir d'outil prédictif et améliorerait la prise en charge des personnes vulnérables par exemple par le développement de protocoles de prévention ciblés ou par l'application de traitements préventifs et de thérapies personnalisées.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	v
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vii
REMERCIEMENTS.....	x
AVANT-PROPOS.....	xi
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 - LE MICROBIOME.....	3
1.1 Le microbiome et son évolution au cours de la vie humaine	3
1.2 Historique de la recherche sur le microbiome	5
1.3 Microbiome et hôte	8
1.4 Le microbiome humain	9
1.5 Le microbiome du tractus respiratoire	10
1.5.1 Cavité buccale.....	11
1.5.2 Cavité nasale	12
1.5.3 Nasopharynx.....	14
1.5.4 Oropharynx	14
1.5.5 La trachée	15
1.5.6 Les poumons.....	16
CHAPITRE 2 - LE MICROBIOME DU TRACTUS RESPIRATOIRE.....	19
2.1 Formation du microbiome du tractus respiratoire	19
2.2 Perturbation du microbiome respiratoire.....	21
2.3 Pathogénèse bactérienne facilitée par l'infection virale	22
CHAPITRE 3 - LA PANDÉMIE DU SARS-CoV-2	26
3.1 Les coronavirus	26
3.2 Le SARS-CoV-1.....	27
3.3 Le MERS-CoV	28
3.4 Pandémie du SARS-CoV-2	29
3.4.1 Origine théorique.....	29
3.4.2 Stratégie de réplication virale.....	30
3.4.3 Transcription et synthèse polyprotéine et protéolyse.....	31
3.4.4 Transcription et réplication	31
3.4.5 Empaquetage et expulsion.....	32

3.5 La COVID-19	33
3.5.1 Tempête cytokinique	33
3.5.2 Organes touchés par la COVID-19	36
4.1 Modification de la composition bactérienne du microbiote nasopharyngé	40
4.2 Liens entre la COVID-19 et les comorbidités	46
4.3 Identification de biomarqueurs prédictifs	48
CHAPITRE 5 - BACTERIAL BIOMARKERS OF THE OROPHARYNGEAL AND ORAL CAVITY DURING SARS-COV-2 INFECTION	52
5.1 Avant-propos	53
5.2 Résumé	54
5.3 Abstract	54
5.4 Introduction	57
5.5 Materials and methods	59
5.5 Results	64
5.7 Discussion	71
5.8 Conclusions	76
5.9 References	77
DISCUSSION	86
CONCLUSION	90
BIBLIOGRAPHIE	91
CERTIFICATION ÉTHIQUE	112
ANNEXE 1	113
Supplementary Information File	113
Supplementary Figures	113
Supplementary Tables	116

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Modifications du microbiote nasopharyngé chez les personnes atteintes de la COVID-19	43
Tableau 2. Modifications du microbiote nasopharyngé et les comorbidités aggravant la pathogenèse de la COVID-19	47
Tableau 3. Modifications du microbiote nasopharyngé et les biomarqueurs associés à la sévérité de la COVID-19	50
Table 4. Age and sex of individuals	61
Table 5. Data measured after extraction of gargal DNA, measured at Qubit™ using the Invitrogen™ Qubit™ 1X dsDNA Broad Range (BR) protocol (ThermoFischer Scientific.)	116
Table 6. Sequencing results and number of remaining sequences with each step of data processing from the DADA2 pipeline.....	124

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Schéma du cycle viral de la réplication du SARS-CoV-2.....	33
Figure 2. Schéma de dérégulation du système kallikréine-kinine et du système rénine angiotensine aldostérone liée à l'infection au SARS-CoV-2 et de la tempête cytokinique	36
Figure 3. Relative abundance of phyla in samples of the positive test (PT) and negative test (NT) groups	65
Figure 4. Taxonomic richness and bacterial community composition in samples of the positive test (PT) and negative test (NT) groups.....	66
Figure 5. Linear discriminant analysis (LDA) score and cladogram of lefse biomarkers	68
Figure 6. Heatmap of the most abundant genera.	70
Figure 7. Differentially abundant genera between PT and NT	71
Figure 8. Multiple rarefaction curves	113
Figure 9. Barplot of relative abundance of phyla in samples of the positive test and negative test groups by sex or age category	114
Figure 10. Heatmap of the most abundant phyla	115

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACE1 : *angiotensin-converting enzyme 1*

ACE2 : *angiotensin-converting enzyme 2*

ADN : acide désoxyribonucléique

AGCC : acide gras à chaîne courte

Ang [1-7] : angiotensine [1-7]

Ang [1-9] : angiotensine [1-9]

Ang I : angiotensine 1

Ang II : angiotensine 2

ARN : acides ribonucléiques

ARNg : acides ribonucléiques génomique

ARNr : acide ribonucléique ribosomal

ARNsg : acides ribonucléiques sous génomique

ASVs : *amplicon sequence variants*

AT1R : *Angiotensin type 1 receptor*

AT2R : *Angiotensin type 2 receptor*

BK-1R : *bradykinin 1 receptor*

BK-2R : *bradykinin 2 receptor*

BK : *bradykinin*

BPCO : bronchopneumopathie chronique obstructive

BQC19 : biobanque québécoise de la covid-19

BR : *broad range*

C. pseudodiphtheriticum : *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*

CIUSSS : centre intégré universitaire de santé et de services sociaux

CL2 : *Containment Level 2*

COPD : *Chronic obstructive pulmonary disease*

COVID-19 : *coronavirus disease 2019*

Des-Ang9-BK : bradykinine des-Arg9

E : glycoprotéine d'enveloppe

EGF : *epidermal growth factor*

EGFR : *epidermal growth factor receptor*

ERGIC : compartiment intermédiaire endoplasmique-réticulum-Golgi

Gp130 : Glycoprotéine 130

H. influenzae : *Haemophilus. Influenzae*

IFN : Interféron de type I

IL-6 Amp : amplificateur IL-6

IL-6: interleukine 6

IRNS : Institut national de la recherche scientifique

K : Kallikrein

K. aerogenes : *Klebsiella aerogenes*

K. pneumoniae : *Klebsiella pneumoniae*

LDA : *linear discriminant analysis*

LEfSe : *linear discriminant analysis effect size*

LPS : lipopolysaccharides

M : protéine membranaire

M. catarrhalis : *moraxella catarrhalis*

MHV : Hépatite murine

N : protéine de la capsid

NF- κ B : *nuclear factor-kappa B*

NK : *natural killer*

NMDS : *non-metric multidimensional scaling*

NT : *negative test*

OCO : *oral cavity and oropharynx*

OMS : *organisation mondiale de la santé*

pb : *paire de base*

PCR : *polymerase chain reaction*

pp1a : *polyprotéine 1a*

pp1ab : *polyprotéine 1ab*

PT : *positive test*

RCT : *replicase transcriptase complexe*

RdRp : *ARN polymérase ARN-dépendante*

RHN : *respiratory health network*

RSC : *rhinosinusite chronique*

S : *protéine spike*

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

S. parasanguinis : *Streptococcus parasanguinis*

S. pneumoniae : *Streptococcus pneumoniae*

SARS-CoV-2 : *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*

sIL-6R α : *soluble interleukin 6 receptor alpha*

SLSJ : *saguenay–lac-st-jean*

Ssp : *several species*

STAT3 : *signal transducer and activator of transcription 3*

TMPRSS2 : *transmembrane protease serine 2*

TNF- α : *tumor necrosis factors alpha*

TNFR : *tumor necrosis factors receptor*

UMR : *unités mixtes de recherche*

UQAC : *université du québec à chicoutimi*

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier ma Directrice Catherine Laprise pour m'avoir initié à la recherche et m'avoir fait confiance sur un projet d'envergure ainsi que pour sa patience, son temps et son soutien sans faille tout au long de mon parcours. Son abnégation pour la recherche a été une source d'inspiration et m'a poussé toujours plus loin dans mes recherches pour mener à bon terme ce projet. J'aimerais également remercier ma Co-directrice Catherine Girard pour sa confiance, sa patience, son engouement et son soutien. Sa passion pour l'exploration scientifique, son expertise et ses encouragements à chaque nouvelle étape de ce projet, ont été un appui indéfectible.

Je tiens à remercier Anne-Marie Madore, professionnelle de recherche du Pre Catherine Laprise. Ses connaissances en recherche et son expérience ont été une grande aide dans les moments plus difficiles et en particulier lors de la rédaction scientifique. Son aide dans l'optimisations des protocoles et son expertise dans les rédactions scientifiques m'ont permis d'apprendre et de comprendre l'exigence nécessaire à la recherche scientifique. Merci à Amadou Barry, professeur au sein de l'équipe de l'UMR en santé durable INRS-UQAC avec qui j'ai partagé un bureau durant ma maîtrise et qui m'a beaucoup apporté lors de mes analyses bio-informatiques. Il a toujours eu de bon conseil dans la priorisation de mes recherches et a su être, jusqu'au bout, un soutien inépuisable.

Un merci à Anne-Marie Boucher-Lafleur, technicienne de laboratoire de la Pre Catherine Laprise pour la mise en place du projet et l'élaboration d'une partie des protocoles. Merci à Julies Boulbes pour son aide lors des différentes étapes du projet, que ce soit sur la partie manipulation en laboratoire, que sur la partie bio-informatique. Merci à Simon Girard pour le bureau qu'il m'a accordé dans ses locaux, auprès de Joanie Bouchard qui a su être une alliée durant cette période particulière de la COVID-19. Enfin, merci à tous les membres des laboratoires du Gepromic, du Patrimoine Microbien et du Genopop pour leur amitié, leur soutien et leur partage tout au long de cette maîtrise.

Aussi, j'aimerais remercier mes proches, mes amis qui m'ont accompagné et encouragé tout au long de mon épopée outre-Atlantique dans cette belle province qu'est le Québec.

AVANT-PROPOS

Ce mémoire de maîtrise décrit les recherches auxquelles j'ai contribué au cours de mes années à la maîtrise, traitant de la microbiologie et plus précisément du microbiome bactérien pharyngé dans le cadre d'une infection au SARS-CoV-2 liée à la pandémie de la COVID-19. Il est divisé en cinq chapitres, les quatre premiers présentent une revue de littérature sur le microbiome du tractus respiratoire.

Le chapitre 1 présente le concept de microbiome, de son écologie et de sa composition dans le tractus respiratoire. Le second chapitre traite des variables participant à son développement et ses effets sur l'hôte lors d'infection bactérienne ou virale. Le troisième chapitre présente les généralités des coronavirus, les précédentes épidémies et en particulier celles du SARS-CoV-2 et la maladie qu'il provoque. Enfin, le quatrième chapitre fait état actuel des connaissances en matière de recherches scientifiques et analyses portées sur le microbiote nasopharyngé en lien avec la COVID-19. Le cinquième chapitre est quant à lui, un article scientifique présentant les résultats de mes recherches, d'une étude sur le microbiome bactérien de la cavité buccale et oropharyngée chez des individus atteints par le SARS-CoV-2 et des témoins non atteints, dans une cohorte provenant du Saguenay–Lac-Saint-Jean (SLSJ). Cet article, intitulé *Bacterial biomarkers of the oropharyngeal and oral cavity during SARS-CoV-2 infection* a été soumis à la revue *Microorganisms Journal* le 26 septembre 2023 et publié le 4 novembre 2023. Pour terminer, une conclusion de ces recherches y est présentée.

Ce mémoire comporte également une annexe (Annexe 1) qui présente le matériel supplémentaire de l'article présenté au chapitre cinq.

INTRODUCTION

Au début de l'année 2020, le monde a été confronté à une pandémie sans précédent causée par le SARS-CoV-2, un nouveau coronavirus, qui a donné lieu à la maladie connue sous le nom de COVID-19. C'est l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) qui a choisi cet acronyme. Il est composé de CO pour corona correspondant à la famille du virus (VI) suivi de « D » pour maladie en anglais (*disease*) et le 19 indique l'année d'apparition des premiers cas en 2019. Cette pandémie a eu un impact profond sur la population mondiale, touchant plus de 641 millions de personnes en un peu moins de deux ans (World Health Organization, 2022). Depuis, la communauté scientifique poursuit ses efforts pour mieux comprendre le virus et son impact sur la santé, afin d'élaborer des stratégies efficaces de prévention et d'intervention essentiellement, pour réduire le nombre de décès causés par l'infection, mais également la sévérité de l'atteinte par une meilleure prise en charge.

Le virus du SARS-CoV-2 se transmet principalement par voies aériennes, mais davantage aéroportée ayant comme source d'entrée le système respiratoire. Le système respiratoire est l'un des principaux points de contact entre le corps humain et l'environnement, et contient un microbiome complexe et diversifié (Arbex et al., 2012; Weibel, 2017). Cette flore commensale joue un rôle essentiel dans la défense contre les bactéries pathogènes, dans le façonnement de l'architecture des voies respiratoires, ainsi que dans la stimulation du système immunitaire par l'immunité adaptative (Brown et al., 2017; Gollwitzer et al., 2014; Invernizzi et al., 2020). Le système respiratoire comprend les voies aériennes supérieures, qui incluent le nez, la bouche et le pharynx, et les voies aériennes inférieures, qui comprennent le larynx, la trachée, les bronches, les poumons (Empey, 1978; Patwa et al., 2015). L'oropharynx, qui fait partie du pharynx est également relié au système digestif qui est une région unique et importante de l'appareil respiratoire. Il est exposé à un large éventail de bactéries de l'environnement, servant de point de passage vers les autres régions anatomiques qu'il connecte (notamment les poumons) et servant de niche pour des bactéries potentiellement pathogènes (Marik, 2001). L'oropharynx est la région la plus taxonomiquement diversifiée des voies respiratoires, et cette richesse diminue plus loin

dans les voies respiratoires (Patwa et al., 2015). Chez l'adulte, le microbiote oropharyngé se compose principalement de Firmicutes, de Pseudomonadota et de Bacteroidota (Bach et al., 2021; Zanetta et al., 2021), avec aussi une minorité de pathogènes opportunistes communs tels que *Streptococcus*, *Haemophilus* et *Neisseria* et de bactéries commensales comme *Veillonella*, *Prevotella*, *Leptotrichia* et *Fusobacterium* (Facklam, 2002; Man et al., 2017; Whelan et al., 2014). La présence de *Streptococcus*, avec ses différentes espèces telles que *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* et *S. agalactiae*, fait de l'oropharynx un environnement favorable au développement d'angines *Streptococcus* (Steenhuijsen et al., 2015; Tan et al., 2014).

Le microbiome peut influencer l'évolution et l'établissement des maladies respiratoires en agissant soit comme facteur de risque, en créant un environnement pro-inflammatoire, soit en jouant un rôle protecteur en maintenant un environnement immun favorable et résistant à l'inflammation (Hewitt et al., 2017; Wypych et al., 2019). Les infections virales respiratoires peuvent perturber la diversité du microbiome et favorisent ainsi l'apparition de co-infections chez l'hôte (Bo-Shun et al., 2020; Lansbury et al., 2020; Pacheco et al., 2021). Durant une infection respiratoire aiguë, les interactions entre le microbiome et le système immunitaire sont des variables importantes de la réponse inflammatoire. À ces facteurs s'ajoutent l'âge, la génétique les habitudes de vie de l'hôte, qui influencent également cette réponse (Pichon et al., 2017). Certaines souches de probiotiques peuvent avoir un effet bénéfique contre les infections virales en favorisant une meilleure réponse immunitaire, ce qui en fait une option préventive ou thérapeutique prometteuse (Pichon et al., 2017; Wypych et al., 2019). C'est ainsi que l'identification de biomarqueurs ou d'une signature microbienne pourrait aider à prédire la détérioration de la santé et susciter des interventions précoces (Budden et al., 2019; Steenhuijsen et al., 2015). Dans ce contexte, les objectifs de la présente étude étaient donc :

- I. Comparer la diversité microbienne du microbiote de la cavité buccale et oropharyngée des personnes atteintes de la COVID-19 comparativement, à celle des personnes non atteintes à partir du gargarisme obtenu à la suite du test de dépistage de la COVID-19 ;
- II. Mesurer l'impact du SARS-CoV-2 sur la diversité microbienne buccale et oropharyngée.

CHAPITRE 1 - LE MICROBIOME

1.1 Le microbiome et son évolution au cours de la vie humaine

Le microbiome humain est l'ensemble des niches de micro-organismes qui peuple notre corps. Il comprend des bactéries, des archées, des virus, des champignons, des protozoaires et autres eucaryotes unicellulaires. Le corps est ainsi colonisé par des millions de ces micro-organismes qui forment une communauté diversifiée et dynamique qui évolue tout au long de la vie (Lynch al., 2016). La plus grande population microbienne chez l'homme se trouve dans le tractus gastro-intestinal, plus spécifiquement dans le colon. Il est l'organe le plus densément peuplé avec un contenu microbien estimé à environ 10^{14} cellules (Hooper et al., 2001).

Il y a encore trois décennies, on connaissait très peu de choses sur les micro-organismes qui occupent les différentes parties du corps humain, sur la façon dont ils évoluent, sur les relations complexes entre les membres de cette communauté et l'hôte. Les améliorations technologiques dans la collecte et l'analyse de données génomiques ont mené à une révolution dans notre compréhension du microbiome humain. Ainsi, il a été possible de mettre en relation le microbiome avec des maladies humaines, la régulation métabolique et plus largement l'équilibre des systèmes humains (Davenport et al., 2017).

Le microbiome peut être considéré comme un organe. En effet, bien que sa structure ne soit pas fixe, elle est spécialisée et se présente avec des fonctions spécifiques dans le corps. Son organisation lui confère de nombreux rôles, tels que la transformation, l'apport de nutriments, la synthétisation de vitamines et autres composés bioactifs. De plus, il participe au développement de l'immunité de l'hôte (Honda et al., 2016; LeBlanc et al., 2013; Sonnenburg et al., 2016). Plusieurs facteurs peuvent perturber cet équilibre, de façon transitoire ou durable, tels que la pollution, le stress, les infections ou la consommation d'antibiotique. Si cette perturbation persiste, on dit alors que le microbiome est en état de dysbiose (Brüssow, 2020). Cette dysbiose peut mener à de nombreuses problématiques de santé incluant des troubles digestifs ou immunitaires, ou permettre des infections par des micro-organismes opportunistes (Brüssow, 2020; Chow et al., 2010).

Le microbiome change tout au long de la vie en fonction de l'exposition environnementale, de ce que l'on mange et des habitudes de vie. En effet, une personne ne côtoie pas les mêmes environnements tout au long de sa vie. Dès la naissance, le mode d'accouchement (par les voies naturelles versus césarienne) a un impact sur le développement du microbiote intestinal et respiratoire du nouveau-né (Man et al., 2017). Puis, que ce soit par l'allaitement au contact direct avec la peau de la mère ou encore avec la diversification de son alimentation dans les premières années de la vie, le microbiote cutané et gastro-intestinal sera conséquemment distinct (Man et al., 2017). Durant l'enfance, il est amené à découvrir de nouveaux environnements et à avoir des rapprochements variés (par exemple : école, parc, animaux de compagnie, activité sportive) ce qui entraîne des contacts avec de nombreux micro-organismes qui façonnent le développement de son système immunitaire. Une fois à l'âge adulte, le mode de vie, les choix alimentaires, l'hygiène, le lieu de travail et le stress sont des facteurs qui influencent le microbiome. Et enfin, à un âge plus avancé, la réduction de la mobilité, la médication et les maladies sous-jacentes sont tout aussi des facteurs à prendre en compte dans la diversité du microbiome (Claesson et al., 2011; Davenport et al., 2017). Ainsi, le microbiome évolue dans un environnement complexe et possède donc des stratégies pour résister à aux changements de l'environnement dans le parcours de vie de l'individu.

Par ailleurs, il existe plusieurs types de relations entre les espèces bactériennes. Celles-ci comprennent le mutualisme dans une relation symbiotique, le commensalisme où une espèce bénéficie de l'activité de l'autre sans lui nuire, la prédation qui porte préjudice à une autre bactérie, la compétition souvent pour les ressources limitées d'un environnement ou encore, l'équilibre qui mène à la stabilité des différentes communautés d'un microbiome (Brugger et al., 2016; Laux et al., 2019).

Le système respiratoire possède plusieurs barrières pour se protéger d'infections. Une physique avec les poils nasaux, les cils vibratiles ou encore le mucus (Hewitt et al., 2021). Une seconde barrière chimique est composée de lysozyme, de mucines et de lactoferrine (Hewitt et al., 2021; Parker et al., 2011). Et enfin la barrière biologique avec les cellules du système immunitaire et la flore bactérienne normale (Hewitt et al., 2021). La première barrière contre l'agent pathogène est formée par la muqueuse respiratoire et les cellules épithéliales. Le mucus est une composante importante de la défense immunitaire notamment par le biais de l'activité

biologique des immunoglobulines (Roy et al., 2014.). Le mucus permet la sélection et la régulation de la troisième barrière, soit la barrière biologique composée des micro-organismes (notamment ceux commensaux non invasifs) et des défensines qui tapissent les voies aériennes. Les défensines, qui sont des peptides antimicrobiens impliqués dans l'immunité non spécifique ou innée, se retrouvent soit dans des granules sécrétoires de cellules immunes spécialisées (α -défensines) ou sont présentes sur la surface de l'épithélium (β -défensines) (Ganz, 2003). La perte de cette ligne de défense peut conduire à une perturbation de la clairance mucociliaire et à des infections secondaires par l'entrée de bactéries pathogènes (Pittet et al., 2010). De plus, la lyse cellulaire induite par l'infection d'un virus dans les cellules pulmonaires va provoquer la libération de nutriments dérivés de l'hôte et induire une réponse pro-inflammatoire en augmentant les protéines d'adhésion (Siegel et al., 2014). Cette réponse pro-inflammatoire va permettre le recrutement des neutrophiles, des monocytes et autres cellules immunitaires (Pickard et al., 2017).

Par ailleurs, il existe également des synergies virus/bactéries avantageuses pour les bactéries. L'interaction entre l'hôte et le virus favorisant la croissance bactérienne, la plus connue est sûrement celle du virus de la grippe (l'Influenza A H1N1) et du *Streptococcus pneumoniae*. Lors de la pandémie de la grippe espagnole en 1918-1919, bien que plusieurs personnes soient décédées suite à l'infection virale, des millions de personnes sont mortes en raison d'une surinfection au pneumocoque, infection secondaire permise par l'influenza (Bosch et al., 2013; McCullers, 2006). Ainsi, il a été postulé que l'attachement d'un agent pathogène à la surface de l'épithélium de l'hôte peut venir moduler la sensibilité et la réponse immunitaire de ce tissu à la colonisation bactérienne (Bogaert et al., 2004). Et ce faisant, le virus peut prédisposer l'hôte à une infection bactérienne. Un autre exemple d'association entre virus et bactérie, est celle entre influenza A H1N1 et *Staphylococcus aureus* (Safaeyan et al., 2015). Dans ce cas-ci, l'influenza altère la fonction des lymphocytes ou des monocytes favorisant ainsi la prolifération des *S. aureus* (McNamee et al., 2006; Safaeyan et al., 2015).

1.2 Historique de la recherche sur le microbiome

La science du microbiome humain a bénéficié de développements méthodologiques qui ont permis son étude, ceux-ci seront brièvement rapportés dans cette section. La première observation de micro-organisme

associé au corps humain a été faite par Theodor Escherich en 1885 (Hayes et al., 2020; Lu, 2020). Ce pédiatre autrichien a observé la bactérie *Escherichia coli* à l'intérieur d'échantillons de selles dilués dans une solution saline, puis les a cultivés sur milieu solide. Par la suite, d'autres bactéries ont pu être identifiées comme *Veillonella* en 1898 dans les voies respiratoires supérieures ainsi que digestives et intestinales. Ces échantillons ont été mis en culture dans un bouillon nutritif fermé de façon hermétique en anaérobiose (Veillon et al., 1898). Il a également été possible de découvrir des micro-organismes non pathogènes pour l'humain. Par exemple, la découverte des bactéries lactiques par Louis Pasteur a permis de mettre en avant l'existence de bactéries non pathogènes. Par la suite, le chercheur Elis Metchnikoff a étudié leur rôle sur la santé. Les bactéries lactiques ont un rôle important dans la santé intestinale (Mackowiak, 2013). En effet, la bactérie lactique transforme le lactose (et autres sucres) en acide lactique par fermentation, facilitant ainsi la digestion et l'absorption de nutriments par le corps (Mackowiak, 2013). Un autre exemple éloquent est la découverte de champignons du genre *Malassezia* par le chercheur Louis-Charles Malassez. Le genre *Malassezia* sont des levures lipophiles qui vivent sur la peau et qui font partie de la flore commensale de l'homme (Rhimi et al., 2020). D'autres micro-organismes associés au corps humain ont pu être isolés à partir des voies nasales, du tissu cutané, du tractus gastro-intestinal et urogénital pendant le XXe siècle (Lu, 2020). Ainsi, au XXIe siècle, le concept de microbiome humain donne naissance à une nouvelle science. Après que les scientifiques Lederberg et McCray aient proposé le terme « microbiome » en 2001, qu'ils définissent comme étant : « la communauté écologique des micro-organismes commensaux, symbiotiques et pathogènes qui partagent l'espace de notre corps » (Lederberg et al., 2001), les scientifiques Relman et Falkow se sont fixés l'objectif de « constituer un inventaire complet des gènes et du génome microbien dans les quatre principaux sites de colonisation microbienne du corps humain : la bouche, l'intestin, le vagin et la peau » (Hayes et al., 2020; Relman et al., 2001). Ces travaux ont ainsi permis d'obtenir d'importantes informations sur le rôle du microbiome sur la santé et les maladies humaines.

Vers la fin du XIXème siècle, les études portant sur l'identification des bactéries intestinales humaines reposaient sur l'isolement et la culture sur gélose. Cependant, les résultats obtenus étaient une représentation biaisée et incomplète de la composition du microbiome. Ceci est dû au fait que certains micro-organismes,

notamment certaines bactéries anaérobies strictes, ne peuvent pas être cultivés sur une gélose ordinaire en raison de leur besoin d'un environnement sans oxygène. Pour ces micro-organismes, il est nécessaire d'utiliser des géloses spécialement préparées pour créer et maintenir un environnement anaérobique. En 1969, le scientifique Robert Hungate présenta un modèle de culture anaérobique, permettant ainsi l'identification de nouvelles souches bactériennes. La restriction au régime d'oxygène est un exemple des multiples paramètres à prendre en compte si l'on veut avoir une représentation réelle de la composition microbienne d'un échantillon (besoins physiologiques, vitesse de croissance...), et justifie la nécessité d'utiliser divers milieux de culture.

C'est en 1977 que Woese et Fox ont découvert les gènes de l'ARN ribosomal (ARNr). L'ARNr contient, entre autres, les sous-unités ribosomales 16S, qui sont spécifiques aux procaryotes. Elles présentent un fort pouvoir discriminant non pas en raison de leurs régions ultra-conservées, qui sont importantes pour l'identification phylogénétique, mais plutôt grâce à leurs séquences variables, permettant de distinguer les différentes espèces de procaryotes. Ainsi, elles peuvent être utilisées comme marqueurs pour établir des associations phylogénétiques et taxonomiques entre les organismes (Woese et al., 1977). La sous-unité 16S possède les régions V3 et V4, est largement utilisée dans l'identification de la composition du microbiome. Précisément, après isolement de l'ADN total, il est possible par technique de PCR d'amplifier une région spécifique ultra-variable et de les discriminer par les variabilités spécifiques inter-bactériennes (16S pour les procaryotes, tel qu'utilisé dans le présent mémoire) (Powers et al., 1991; Scheper et al., 1994; Woese et al., 1977).

Grâce à ces approches méthodologiques, il a été possible notamment d'associer des bactéries avec des troubles de l'appareil digestifs. À titre d'exemple, une dysbiose intestinale a été associée à la maladie de Crohn se manifestant par un déséquilibre en faveur de *Clostridium* ssp. et de *Bacteriodes* ssp. (Martinez-Medina et al., 2006; Scanlan et al., 2006). Ou encore, une instabilité de la flore intestinale a été associée avec de faibles quantités de *Bifidobacterium* et de *Clostridium* dans un échantillon de patients atteints de fibrose kystique (Duytschaever et al., 2013). De la même manière, la PCR quantitative a été utilisée pour comparer le microbiote intestinal à la suite d'un traitement antibiotique. À cet égard, une étude comparative du microbiote intestinal de personnes âgées ayant subi ou non un traitement d'antibiothérapie a permis de montrer un lien entre la prise

d'antibiotiques et la prolifération d'*Enterococcus faecalis*, un pathogène opportuniste (Bartosch et al., 2004). Cette technique a également permis d'associer un nombre élevé de *Klebsiella pneumoniae* et un faible nombre de *Bifidobacterium* ou *Bacteroides* dans le microbiote intestinal d'enfants nés prématurés (Arboleya et al., 2012).

Le séquençage a révolutionné notre compréhension du microbiome humain-avec un coût abordable et une rapidité d'exécution, cette technologie a permis de générer des millions de séquences et de générer une cartographie de la composition microbienne du corps humain. Cette évolution rapide a contribué à la naissance de nombreux grands projets dont le *Human Microbiome Project* (HMP) (Aagaard et al., 2013) qui est une initiative du *National Institutes of Health* (NIH). Ce projet visait à dresser la liste des micro-organismes qui vivent en association avec l'humain, mais également, de découvrir les liens entre l'état de santé et le microbiome des personnes ayant contribué à l'étude.

1.3 Microbiome et hôte

Bien que l'association des micro-organismes avec la santé de l'hôte fût mise en lumière par les travaux de Miller et ses collègues en 1957 (Miller et al., 1957), la compréhension de la composition du microbiome et la condition de santé de l'hôte demeure à établir. Plusieurs techniques ont été développées afin de séquencer les génomes microbiens, de documenter les fonctions biologiques spécifiques aux micro-organismes considérés et donc de pouvoir faire des liens avec un microbiote particulier et une condition de santé précise (par exemple microbiote gastro-intestinal et colite ulcéreuse). Le séquençage métagénomique *shotgun* est l'une de ces techniques méta-omiques. À la suite du projet Génome humain, grâce aux nouvelles technologies, d'énormes progrès ont été réalisés dans la compréhension de l'interaction complexe entre le microbiome et l'hôte (K. Chen et al., 2005). Ainsi, la métatranscriptomique, s'intéresse à tous les transcrits (les ARN formés) et permet de connaître toute l'activité génique d'un microbiote particulier (Bashiardes et al., 2016), la métaprotéomique, qui définit les protéines produites par les bactéries (Verberkmoes et al., 2009) et la métabolomique, qui étudie les métabolites, afin de mieux connaître et quantifier les produits finaux de l'activité métabolique de la bactérie (Frankel et al., 2017), sont quelques-uns des nouveaux champs d'expertises qui ont vu le jour.

1.4 Le microbiome humain

Ces dernières années, l'avènement des nouvelles méthodes d'identification de bactéries ont permis de définir les principaux micro-organismes qui colonisent notamment la peau, les muqueuses, les voies intestinales et les voies respiratoires, bien que les microbiotes humains ne soient pas encore complètement décrits. Cette colonisation des micro-organismes sur et dans le corps humain se serait d'abord établie il y a des millions d'années lors de l'adaptation de la vie sur terre (Rosenberg et al., 2018). En bref, les vertébrés terrestres ont développé une peau sèche, relativement imperméable et des muqueuses confinées et protégées. Les micro-organismes retrouvés dans les régions chaudes et humides ont dû s'adapter à ces environnements (Dethlefsen et al., 2007). Chaque micro-organisme appartient à une espèce spécifique, qui est elle-même intégrée dans des genres et des familles plus larges. Toutefois, au niveau des espèces, le microbiome peut être aussi unique qu'une empreinte digitale. De plus, il est intéressant de noter que d'autres vertébrés terrestres contiennent des taxons de micro-organismes retrouvés aussi chez l'humain, mais également des distinctes (Muegge et al., 2011). Ces observations indiquent que l'humain a évolué en relation avec les communautés microbiennes présentes selon les conditions de l'environnement (Dethlefsen et al., 2007).

À partir des analyses sur le microbiome humain, on constate que la diversité phylogénétique du microbiome humain couvre une grande variété de micro-organismes, mais que chacun de ces groupes est représenté par un petit nombre d'espèces connues. Avec plus de 50 phylums bactériens sur Terre, seulement 13 de ces derniers sont associées à l'humain incluant les Firmicutes, les Bacteroidota, les Actinomycetota et les Pseudomonadota avec 9 autres phylums qu'on retrouve chez l'humain (les Chlamydiaes, les Cyanobacterias, les Deferribacterota, les Deinococcota, les Fusobacteria, les Spirochaetota, les Verrucomicrobia et les phylums Candidats TM7 et SR1 trouvés plus spécifiquement) (Cho et al., 2012; Turnbaugh et al., 2010). Bien que peu de phylums soient retrouvés chez l'humain, il existe une forte diversité phylotypique des espèces et des souches, due à de la spécialisation et aux pressions sélectives des lignées au cours de l'évolution et du temps. Cette tendance a également été observée chez d'autres vertébrés (Ley et al., 2006).

La colonisation et la diversification du microbiome humain se font tout au long de la vie d'un humain. Chez le nourrisson, le développement de son microbiome débute dès la naissance, lorsqu'il est exposé à l'environnement extérieur. Ce microbiome s'acquiert au fil des jours, des semaines et des mois par les contacts cutanés, par les voies respiratoires, et par l'ingestion d'aliments, ce qui mène à un microbiome mature (Palmer et al., 2007). Les bactéries qui colonisent les voies supérieures du tractus respiratoire sont fortement influencées chez l'enfant par la méthode d'accouchement (Kaan et al., 2021). En effet, les enfants nés par voie naturelle se retrouvent avec une plus forte densité de bactéries provenant du vagin, de la peau de la mère et de l'environnement. Alors que les nouveau-nés par césarienne auront un microbiome composé essentiellement de micro-organismes présents au niveau de la peau de la mère et de l'environnement (Weibel, 2017). Cette différence va s'estomper une fois que les enfants vont rencontrer les mêmes environnements et manger des aliments solides (vers l'âge scolaire) (Bäckhed et al., 2015). Par la suite, le microbiome va continuer de changer en subissant de multiples variations durant l'adolescence. À l'âge adulte, il s'équilibre et s'organise de façon plus spécifique aux habitudes de vie (par ex. : alimentation, activités, consommation d'alcool et de tabac), à l'environnement de l'individu et par toutes les perturbations que celui-ci subit au quotidien.

1.5 Le microbiome du tractus respiratoire

Le tractus respiratoire représente un conduit composé de la cavité nasale, du nasopharynx, de l'oropharynx, de la trachée et trouvant à son extrémité les poumons. Les poumons représentent un organe compartimenté avec cinq lobes dans lesquels on retrouve des bronches, des bronchioles et des alvéoles. C'est dans ce dernier compartiment que s'effectue l'échange gazeux entre l'oxygène et le sang. La surface d'échange alvéolaire représente environ 70 m², ce qui est 40 fois plus grand que la surface de notre peau (Hsia et al., 2016).

Les différentes parties du tractus respiratoire ont des propriétés et des fonctions différentes pour assurer le passage de l'oxygène. Par ailleurs, on a remarqué que le pH augmente tout au long du tractus respiratoire, ainsi que l'humidité et la température. Cela permet d'assurer la protection des tissus fragiles des poumons et de maximiser l'efficacité de l'échange gazeux. Le dépôt de particules se retrouve lui aussi plus fin, avec à son début

des particules de 10 μm dans les voies supérieures pour finir à 1 μm dans les voies inférieures (England et al., 1999; Man et al., 2017; Mosier et al., 2015). Il est également important de remarquer que la pression entre les gaz (dioxygène et dioxyde de carbone) n'est pas la même et soutient la colonisation de bactéries avec différents besoins (Shi et al., 2022). Les sections suivantes dressent un portrait global des caractéristiques du microbiome des voies respiratoires de la bouche au poumon.

1.5.1 Cavité buccale

La cavité buccale, où commence le système digestif et le système respiratoire, se compose de différentes structures anatomiques incluant le palais, la luette, la langue, les dents, les gencives, les glandes salivaires et la salive. Les différentes surfaces constituent des micro-environnements occupés par des communautés microbiennes spécifiques. En effet, la composition microbienne sera influencée par les propriétés physiques et chimiques du milieu, bien que certains organismes, moins impactés par ce gradient physicochimique, sont présentes dans l'ensemble de la cavité buccale.

Ainsi, la salive qui se trouve dans l'ensemble des micro-environnements de la cavité est à un pH relativement stable qui avoisine la neutralité, soit entre 6,7 et 7,3. Grâce à ses propriétés, la salive agit comme un tampon face aux aliments et boissons ingérés, mais également face à l'activité bactérienne en neutralisant les bactéries et leurs produits acides grâce au lysozyme (Baliga et al., 2013). Le microbiote buccal abrite le deuxième microbiote le plus riche après le gastro-intestinal (Verma et al., 2018). Les principaux phylums des cavités buccales sont : les Actinomycetota, les Firmicutes, les Pseudomonadota, les Fusobacteria, les Bacteroidota et les Spirochaetota qui représentent 96 % des bactéries buccales (Lamont et al., 2018; Verma et al., 2018). Ce microbiote fluctue en fonction de l'alimentation, de l'hygiène de vie, de la pollution et de l'air (humidité, pression atmosphérique, pollution, aérosols, etc.) (Krishnan et al., 2017; Li et al., 2014). Bien que le microbiote soit différent d'un individu à un autre, en raison d'une multitude de paramètres incluant les habitudes alimentaires et l'environnement, c'est la classe *Fusobacteria* qui présente la variabilité interindividuelle la plus faible (Zaura et al., 2009). La grande abondance des Firmicutes dans la salive participe à la digestion en raison

de leurs activités enzymatiques. Ces derniers permettent de dégrader les polysaccharides et de faciliter la digestion (Bik et al., 2010).

Dans la bouche, divers facteurs peuvent mener à une dysbiose comme les habitudes alimentaires, le stress, un déséquilibre hormonal, le diabète, l'inflammation gingivale, le tabagisme et la consommation d'alcool. Ce déséquilibre peut mener à des infections buccales ou encore favoriser la croissance de certaines bactéries. À titre d'exemple, il a été observé chez les personnes fumeuses une diminution de la diversité microbienne (Yu et al., 2017). D'autres études montrent qu'il est possible de mettre en relation la composition du microbiote buccal avec des maladies telles que le diabète (Kampoo et al., 2014), l'obésité (Kilian et al., 2016) ou les maladies cardiovasculaires (Menon et al., 2017).

1.5.2 Cavité nasale

La cavité nasale est l'une des portes d'entrée de l'air dans notre corps vers les poumons. Le nez a des fonctions d'olfaction. Il assure aussi la fonction de réchauffer, d'humidifier, de protéger, d'éliminer les débris et de filtrer l'air avant qu'il n'atteigne les poumons (Sobiesk et al., 2021). La cavité nasale est tapissée d'une muqueuse composée de cellules à mucus et d'un épithélium cilié. Ces cellules assurent une fonction de filtration et de nettoyage. La majorité des grosses particules y sont bloquées jusqu'à ce qu'elles en soient expulsées mécaniquement, lors d'un éternuement par exemple. Certaines particules très fines réussissent à traverser la cavité nasale pour atteindre la région où la trachée se divise en deux conduits. Ces conduits, les bronches se subdivisent ensuite en bronchioles dans l'arbre bronchique. Le mucus sécrété par les cellules des voies respiratoires emprisonne la plupart des particules véhiculées par l'air (e.g : poussières). Les cils vibratiles, de minuscules poils recouvrant les cellules épithéliales, dirigent ensuite ce mucus jusqu'à la gorge, où il est éliminé par toux et expectoration ou avalé. Le système s'assure que l'air inspiré soit toujours le plus propre possible dans les poumons (Sobiesk et al., 2021). Le pH des muqueuses nasales est d'environ 6 (+/- 0,5) (England et al., 1999). La fonction principale des muqueuses nasales est celle d'une barrière protectrice face aux agents pathogènes aidés par les agents du système immunitaire, principalement les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes capables de recruter d'autres éléments inflammatoires tels les éosinophiles et

les neutrophiles, dont le rôle est de protéger l'hôte. Ces cellules une fois activées produisent de nombreuses cytokines et immunoglobulines, comme l'immunoglobuline A, qui contribuent à empêcher l'adhésion des agents pathogènes, à neutraliser, ou encore interagir avec le système immunitaire pour améliorer la défense contre l'agent pathogène (Shinkura, 2021). Les lysozymes, organites intracellulaires contenant des enzymes hydrolytiques et protéolytiques, responsables de la digestion cellulaire, dégradent les particules provenant de l'extérieur par un mécanisme nommé hétérophagie. Enfin, la lactoferrine, de la famille des transferrines, présente dans les voies respiratoires, agit également comme agent antimicrobien (Sobiesk et al., 2021). Habituellement présente en faible concentration, la lactoferrine est augmentée lors de la dégranulation des neutrophiles au site d'inflammation. Elle est un élément clef du système de défense inné de l'hôte et possède un large spectre antimicrobien qui s'étend des bactéries, levures, champignons, à certains virus et protozoaires (Gifford et al., 2005; Valenti et al., 2005). Par ailleurs, le mucus est aussi un milieu favorable pour la croissance de certaines bactéries. En fait, bien qu'il soit faible en métabolites essentiels (glucose, fer, sel, acide aminé), pauvres en nutriments (Krismmer et al., 2014) et contenant des cellules immunitaires (macrophages et cellules dendritiques, lymphocytes T et B), certaines espèces microbiennes arrivent à y proliférer et à y vivre en dépit des conditions physiologiques exigeantes (Debertin et al., 2003).

Les phylums bactériens les plus communs dans les cavités nasales sont : Actinomycetota, Firmicutes, Pseudomonadota et Bacteroidota. Les genres *Corynebacterium*, *Staphylococcus* et *Dolosigranulum* sont les plus prépondérants (Kumpitsch et al., 2019). Le *Staphylococcus epidermidis* qui est présent à ce site très tôt dans la vie de l'individu est associé à un microbiote nasal stable (Liu et al., 2015). Bien que très peu présents durant l'âge adulte, les *Moraxella* et *Haemophilus* colonisent la cavité nasale durant l'enfance puis diminuent en abondance avec le temps. Ils représentent une faible proportion des bactéries de la muqueuse nasale à l'âge adulte. En revanche, la présence de certaines bactéries de la même famille est liée à de possibles infections et/ou associées, à des maladies respiratoires, comme *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* et *Moraxella catarrhalis* (Biesbroek et al., 2014; Pettigrew et al., 2008). *Neisseria meningitidis* est une Pseudomonadota ayant la capacité de coloniser la cavité nasale de façon asymptomatique et de se révéler invasive en pénétrant la circulation sanguine pour ensuite provoquer des méningites (Bakir et al., 2001).

Enfin, le microbiote nasal est essentiel contre la prolifération de pathogènes opportunistes (Hardy et al., 2021). C'est un microbiote où la compétition entre micro-organismes est très importante. C'est un milieu où les ressources et l'espace sont limités et où les micro-organismes sont soumis à d'importantes variations de température et d'humidité (Wagner et al., 2019).

1.5.3 Nasopharynx

Le nasopharynx est situé juste après les voies nasales et s'étend jusqu'à la partie supérieure de la gorge. Sa fonction principale est de faire circuler l'air des cavités nasales vers l'oropharynx, la trachée et les poumons. Il est tapissé d'une fine couche de cellules épithéliales cylindriques ciliées jouant un rôle de barrière face aux infections, ainsi qu'un rôle de transport du mucus (Man et al., 2017). Selon les connaissances actuelles, le nasopharynx a un microbiote très similaire à celui de la cavité buccale et du reste des parties supérieures du tractus respiratoire. Il se compose d'Actinomycetota avec les *Corynebacterium*, de Firmicutes avec les *Dolosigranulum*, les *Lactobacillus* et les *Staphylococcus* (Stearns et al., 2015). Il est intéressant de noter que des travaux portant sur l'impact du tabagisme sur le microbiote nasopharyngé ont permis d'observer des associations positives entre la présence de *Corynebacterium* et *Staphylococcus* et l'usage du tabac (De Boeck et al., 2017).

1.5.4 Oropharynx

L'oropharynx est une partie du pharynx qui sert à la fois le système digestif et le système respiratoire. C'est une région critique où se passe la déglutition. Elle est régie par un nombre important de muscles, ce qui en fait une zone très innervée. Son pH est de 7,2 et les cellules épithéliales stratifiées qui le tapissent représentent une surface de 8 cm² (Man et al., 2017). Il existe une certaine similarité entre le nasopharynx et l'oropharynx au niveau de la diversité microbienne, on observe des Firmicutes, des Pseudomonadota et des Bacteroidota (Bach et al., 2021; Zanetta et al., 2021). Les espèces les plus fréquemment rencontrées sont *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* et *Haemophilus parainfluenzae* (Chattopadhyay et al., 2019).

De récentes études sur le cancer de l'oropharynx démontrent que l'environnement s'enrichit en molécules inflammatoires changeant les conditions du milieu et ainsi la composition du microbiome. Ainsi, la présence accrue de *Fusobacterium* et *Prevotella* observée dans un tissu enflammé contribue à rendre l'environnement plus acide et hypoxique (Hooper et al., 2006). À l'exception de certaines études, les données actuelles ne permettent pas de déterminer si l'inflammation et la dysbiose associée favorisent la croissance de la tumeur ou à l'inverse, si la croissance de la tumeur entraîne un environnement tissulaire favorable à la croissance de ces bactéries (Hooper et al., 2006). Toutefois, certains travaux ont permis de déterminer que des espèces bactériennes telles que *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oligofermentans*, *Streptococcus oralis*, et *Streptococcus sanguinis*, ainsi que les sous-espèces non pathogènes de *Lactobacillus*, peuvent aggraver la maladie et être responsables de la production de molécules cancérigènes comme l'acétaldéhyde et des composés hydroxyles (Abranches et al., 2018; La Rosa et al., 2020). De plus, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* et *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* génèrent des composés sulfurés volatiles, tels que les agents génotoxiques et mutagènes comme le sulfure d'hydrogène et le méthylmercaptop. Ces composés induisent une inflammation chronique, une prolifération cellulaire, l'inhibition de l'apoptose et une angiogenèse tumorale (Chattopadhyay et al., 2019).

1.5.5 La trachée

La trachée est un organe du système respiratoire qui a pour fonction de faire passer l'air des voies respiratoires supérieures vers les voies respiratoires inférieures en reliant l'oropharynx aux bronches. C'est un organe essentiellement constitué d'anneaux de cartilage reliés entre eux par des muscles. La trachée est tapissée de cellules sécrétant du mucus, de cellules ciliées ou des cellules caliciformes dotées de cils vibratiles (Furlow et al., 2018; Zhang et al., 2015).

Peu d'études documentent les genres microbiens présents dans la trachée, dues à son accès difficile et à la faible biomasse présente. Les genres les plus représentés sont *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Prevotella*, *Neisseria* et *Moraxella* (Pérez-Losada et al., 2017). Cela correspond aux genres bactériens retrouvés tout le long des voies respiratoires supérieures. Ces genres

bactériens font partie de la flore commensale, mais peuvent se révéler être des pathogènes opportunistes comme *Pseudomonas aeruginosa*.

1.5.6 Les poumons

Le poumon est l'organe par lequel s'effectue la respiration. Une fois que l'air entre dans les poumons, il suit un arbre bronchique divisé en bronchioles lequel se termine dans des sacs alvéolaires où se retrouvent les alvéoles. Cet arbre représente environ 300 millions de sacs alvéolaires pour une surface d'environ 70 m², soit 50 fois la surface de la peau. Les alvéoles des poumons sont tapissées de cellules épithéliales alvéolaires. Le microbiote pulmonaire ressemble en grande partie à celui de l'oropharynx (Marsh et al., 2016). Les phylums les plus rencontrés dans les poumons sont les Bacteroidota, les Firmicutes et les Pseudomonadota. Parmi ces phylums, les genres dominant sont les suivants : *Prevotella*, *Veillonella*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Fusobacterium* et *Streptococcus* (Beck et al., 2012).

Des études ont montré la relation entre la composition du microbiote pulmonaire (sa composition en taxon microbien) et la prédiction de maladies pulmonaires, dans les cas de fibrose pulmonaire idiopathique, de bronchiectasie, de maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC), d'asthme et d'infection respiratoire chez le nourrisson (Dickson et al., 2020).

La fibrose pulmonaire idiopathique est une maladie qui se caractérise par la cicatrisation des poumons, donnant moins d'élasticité aux poumons, rendant plus difficiles les échanges gazeux et entraînant une dyspnée importante (Song et al., 2011). Ainsi, il a été observé une charge bactérienne plus élevée avec une composition et une diversité différente entre les personnes atteintes et les personnes non atteintes. Précisément, les poumons des personnes atteintes ont une plus forte abondance de *Streptococcus*, *Haemophilus*, de *Neisseria* et de *Veillonella* comparativement aux personnes non atteintes (Molyneaux et al., 2014).

Une bronchiectasie est une inflammation chronique menant à une augmentation permanente de la taille des bronches. Cela provoque une forte toux, de la fièvre et de la dyspnée (King et al., 2006). La bronchiectasie s'accompagne d'une charge bactérienne augmentée comparativement aux personnes non atteintes. Cette augmentation bactérienne entraîne une inflammation des voies respiratoires (Sibila et al., 2019). Dans l'étude

de Sibila et al., il a été démontré que l'un des facteurs discriminants était la présence de *P. aeruginosa* et de *H. influenzae*, qui engendraient l'inflammation des poumons et par conséquent, l'aggravation de la bronchiectasie (Rogers et al., 2014; Sibila et al., 2019).

Les patients atteints de MPOC subissent une dégénérescence progressive des tissus pulmonaires qui conduit à une obstruction des voies respiratoires. Cette atteinte peut varier de légère à modérée et sévère. Dans la forme légère, le microbiote est comparable à celui d'individus sains (Sze et al., 2014). Mais, les patients atteints de MPOC de forme sévère ou plus avancée ont une différence significative dans la composition de leur microbiote avec une augmentation de Pseudomonadota ou Firmicutes et une diminution des Bacteroidota (Wu et al., 2014).

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies respiratoires inférieures qui est influencée par divers facteurs génétiques et environnementaux (Lavoie et al., 2022; O'Donnell et al., 2002). Il a été démontré que la présence de bactéries dans les voies respiratoires dès l'enfance peut plus facilement induire ou provoquer une inflammation. En effet, chez les enfants asthmatiques, le microbiote était positivement associé à *Moraxella*, *Streptococcus* et *Haemophilus*, tandis qu'une corrélation négative était observée avec *Corynebacterium*, *Alloicoccus* et *Staphylococcus* (Hufnagl et al., 2020). Dans une autre étude, les enfants asthmatiques avaient une plus grande fréquence de *Haemophilus* et de *Staphylococcus* en comparaison à des enfants non atteints. Toutefois, les Bacteroidota (*Prevotella*) étaient plus abondantes chez les enfants non asthmatiques (Hauptmann et al., 2016 ; Hilty et al., 2010). Le même constat a été fait chez les adultes atteints d'asthme. Ils présentent une diversité bactérienne inférieure à celle des personnes sans asthme. Le phylum des Pseudomonadota avec le genre *Haemophilus* étaient particulièrement abondant chez les individus asthmatiques (Hilty et al., 2010). Ainsi, les modifications du microbiote pulmonaire chez les personnes atteintes d'asthme seraient liées à une dysbiose. Cette dysbiose favoriserait la croissance des Pseudomonadota avec les genres *Haemophilus* et *Moraxella*. Ces bactéries activeraient les lymphocytes Th2 et entraîneraient une neutrophilie ayant comme conséquence une hyperréactivité bronchique. Cette cascade inflammatoire de type neutrophilique pourrait éventuellement conduire à l'obstruction sévère des voies respiratoires (Green et al., 2014). Enfin, selon des études réalisées avec des modèles murins, la colonisation par des bactéries au cours de l'enfance serait

essentielle pour la protection contre le développement de l'asthme plus tard dans la vie de l'individu (Depner et al., 2017).

En somme, les différents microbiotes sont des communautés complexes de micro-organismes pour lesquels de nombreuses études doivent être faites pour en comprendre les rôles et interactions micro-organismes-hôtes. Les techniques de séquençage actuelles permettent de caractériser la composition des microbiomes (incluant l'identification d'espèces, la quantification relative) et de documenter leurs caractéristiques permettra de mieux comprendre l'homéostasie du corps humain et de mieux comprendre leur impact sur la santé. Plusieurs recherches sont nécessaires pour bien documenter la diversité microbienne en fonction de nombreux paramètres incluant l'état de santé de l'individu, son âge, son environnement. Toutes ces études permettront de mieux comprendre les relations micro-organismes-hôtes. Le chapitre suivant présente de manière plus précise le microbiome respiratoire et les perturbations de celui-ci lors d'une infection virale ou bactérienne.

CHAPITRE 2 - LE MICROBIOME DU TRACTUS RESPIRATOIRE

2.1 Formation du microbiome du tractus respiratoire

Le système respiratoire est directement affecté par l'environnement extérieur, en raison de l'exposition aux allergènes (polluants et autres microparticules incluant les bioaérosols). Le microbiote des voies aériennes est caractérisé par la présence de bactéries, de champignons et de virus. Les personnes sans affection respiratoire présentent une faible densité et une grande diversité de micro-organismes. Cependant, en conditions pathologiques cet équilibre n'est plus respecté. En conséquence, il peut se produire une augmentation de certains micro-organismes au détriment d'autres. Ce déséquilibre au profit de certains micro-organismes est une dysbiose (Steenhuijsen et al., 2020). Tel qu'indiqué précédemment dans la section 1.1 du présent mémoire, la colonisation du tractus respiratoire commence dès la naissance. Puis, le développement du microbiote respiratoire s'établit tout au long de la vie et sera caractérisée par les déterminants principaux suivants : le mode d'accouchement (naturel ou par césarienne), l'environnement dans lequel nous vivons, les infections respiratoires en bas âge et la prise d'antibiotique (Gallacher et al., 2016).

Bien qu'il ait été longtemps considéré comme stérile, l'environnement intra-utérin contient des bactéries notamment dans le placenta (Aagaard et al., 2014), dans les membranes fœtales (Jones et al., 2009) et dans le liquide amniotique de grossesse (DiGiulio et al., 2008) d'individu en bonne santé. Quelques minutes après l'accouchement il est possible de détecter des communautés bactériennes dans la cavité orale et dans le nasopharynx du nourrisson (Dominguez-Bello et al., 2010). La colonisation des voies respiratoires chez le nouveau-né se fait alors dès les premiers instants de la vie. Le microbiote respiratoire commence à se développer et deviendra stable dans les 2 premières années de la vie (Gallacher et al., 2016).

La naissance par voie naturelle serait favorable à l'établissement d'un microbiome favorable à une bonne santé. En effet, les résultats d'une étude comparative du microbiote respiratoire de nouveau-nés par voie naturelle à ceux nés par césarienne indiquent que les enfants nés par césarienne présentent une plus grande diversité de bactéries. En revanche, ceux nés par voie naturelle présentent des voies respiratoires colonisées

par un plus grand nombre de *Bifidobacterium* et d'*Akkermansia*, qui sont considérés comme étant bénéfiques pour la santé (Li et al., 2018; Ruiz et al., 2017). Précisément, ces bactéries contribuent au maintien de l'équilibre du système immunitaire et de réduire l'apparition de maladies allergiques (Plovier et al., 2017; Ruiz et al., 2017). Une autre étude a montré que les enfants nés par césarienne présentaient une faible diversité microbienne pouvant provoquer des retards de développement du système immunitaire, contribuant ainsi à une plus grande sensibilité aux troubles immunitaires et métaboliques plus tard dans la vie (Wilson et al., 2021).

Ainsi, l'exposition à un large éventail de micro-organismes semble avoir un effet protecteur sur le développement de l'immunité chez l'enfant. En conséquence, la rencontre d'une multitude de bactéries durant l'enfance permet le développement d'un système immunitaire optimal (Dzidic et al., 2018). À ce propos, une étude a démontré que l'exposition des enfants à la ferme entre 2 et 12 mois favorise le développement d'un microbiote intestinal protecteur contre le développement de l'asthme, en particulier l'asthme allergique. La présence des genres *Roseburia* ou *Corpococcus*, productrices de butyrate qui a des propriétés anti-inflammatoire et immunomodulatrice, serait un des facteurs pouvant expliquer cette observation (Depner et al., 2020). Dans une autre étude, les auteurs ont montré que les enfants développant des maladies allergiques telles que l'asthme présentaient une plus faible diversité de bactéries salivaires et une composition bactérienne différente de celle des enfants sans asthme dès l'âge de 7 ans (Dzidic et al., 2018).

D'autre part, l'utilisation d'antibiotiques durant l'enfance peut également moduler le microbiome sur une longue période. Une étude suggère d'ailleurs que chez les enfants ayant reçu un traitement antibiotique durant leur enfance présentent une composition altérée du microbiote oral (Gomez-Arango et al., 2017). Une des conséquences de cette perturbation est une augmentation de la probabilité de de l'abondance de *Streptococcus*, *H. influenzae* et *Moraxella*. Les enfants infectés par ces bactéries au cours du premier mois de vie, présentent un risque plus accru d'asthme. Ces mêmes bactéries sont associées à l'aggravation de l'asthme menant vers une bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO). Ces résultats indiquent qu'une colonisation microbienne non bénéfique de même, qu'une dysbiose tôt durant l'enfance peuvent avoir des conséquences sur le développement et le maintien du système immunitaire optimal (Santacroce et al., 2020). Ainsi, privilégier

un environnement favorable à l'établissement d'un bon microbiote respiratoire au début de la vie peut représenter une stratégie préventive pour améliorer la santé pulmonaire chez les adultes (Hauptmann et al., 2016).

2.2 Perturbation du microbiome respiratoire

L'interface muqueuse des voies respiratoires est en équilibre constant entre la tolérance de microbes commensaux non invasifs et l'activation immunitaire contre les pathogènes (Hanada et al., 2018). Bien que le maintien d'un équilibre homéostatique par l'hôte au sein du microbiote intestinal participe à la régulation du système immunitaire soit reconnu (Hooper et al., 2001), le microbiome commensal respiratoire pourrait lui aussi réguler les réponses immunitaires dans les muqueuses respiratoires (Ichinohe et al., 2011). En raison de leur capacité fonctionnelle importante, les bactéries se révèlent être des contributeurs clés à des processus critiques, tels que le métabolisme et le maintien de l'homéostasie immunitaire. Elles peuvent également aider et soutenir le système immunitaire chez les individus souffrant de maladies respiratoires chroniques (Ivanov et al., 2009; Lynch, 2014). À titre d'exemple, les genres *Bifidobacterium* ou *Lactobacillus* ont démontré des effets de résilience chez l'hôte et améliorent la qualité de vie des patients atteints de rhinite allergique après administration sous forme de probiotiques (Vliagoftis et al., 2008). Par ailleurs, bien que la cascade de réactions immunitaires innées et adaptatives soit bien connue, des recherches doivent être réalisées pour documenter les interactions entre le microbiome et les cellules résidentes et circulantes impliquées dans ces cascades au niveau des voies respiratoires (Lynch, 2014).

Les traitements antibiotiques peuvent également favoriser la dysbiose (Vangay et al., 2015). Des observations chez des souris ont montré qu'un traitement antibiotique par voie orale peut entraîner une immunité déficiente en lymphocytes T (CD4 et TCD8) et B après une infection par le virus de l'influenza A H1N1 (Ichinohe et al., 2011). Dans cette étude, les auteurs ont observé que les souris ayant reçu des antibiotiques ont une production d'interleukine altérée en plus de présenter une diminution de la production et de la migration des cellules dendritiques vers le système respiratoire. Ils ont également réussi à démontrer que les bactéries

commensales ne contribuent pas à l'immunocompétence, i.e. à la capacité du corps à produire une réponse immunitaire normale à la suite d'une exposition à un antigène (Ichinohe et al., 2011). Un traitement par voie orale à l'aide d'ampicilline a entraîné une réduction systémique de la plupart des bactéries Gram positif et une augmentation des *Enterobacteriaceae* dans les muqueuses du colon et du nez. Cependant, cela n'était pas suffisant à la création d'un environnement immun optimal dans les poumons (Ichinohe et al., 2011). Cette étude montre que l'utilisation d'antibiotiques pour traiter les infections respiratoires secondaires peut avoir un effet négatif sur la réponse immunitaire contre le virus de la grippe, en réduisant la diversité microbienne et en diminuant la production d'interféron (protéines essentielles dans la défense antivirale). Elle suggère que développer des traitements probiotiques immunostimulants seraient plus appropriés pendant la saison de la grippe (Ichinohe et al., 2011).

Par ailleurs, des déséquilibres dans la composition du microbiome respiratoire peuvent être associés à des maladies respiratoires chroniques telles que la rhinosinusite chronique (RSC). Une étude a démontré que le microbiote nasal des patients atteints de RSC étaient caractérisés par une prévalence accrue de *S. aureus* par rapport aux patients non atteints (Feazel et al., 2012). Les patients atteints de RSC présentaient également une diminution des communautés bactériennes. Dans une autre étude, en plus d'un changement significatif de la diversité, le microbiome était caractérisé par la réduction notable des bactéries lactiques (*Lactobacillus salvei*) et une augmentation de l'abondance de *Corynebacterium tuberculostearicum* (Lynch, 2014). Ces résultats suggèrent que plusieurs membres du genre *Lactobacillus* pourraient assurer une protection des muqueuses respiratoires contre les virus et les bactéries (Lynch, 2014).

2.3 Pathogenèse bactérienne facilité par l'infection virale

Lors d'une infection bactérienne ou virale, le microbiome va subir des perturbations qui peuvent avoir un impact sur les communautés présentes. L'influence de la cinétique, la durée de vie spécifique du virus sur la réponse immunitaire innée ou adaptative, la perturbation de la clairance mucociliaire, les lésions épithéliales induites par le virus qui facilitent la dissémination des bactéries sont des phénomènes bien établis (Hussell et

al., 2012; Lynch, 2014). Ainsi, il est crucial de considérer les différences interindividuelles telles que l'âge, la génétique, les maladies préexistantes et les antécédents d'infections. Ces différents facteurs peuvent avoir une incidence sur la composition du microbiome et ainsi déterminer la réponse face à l'infection virale (Cox et al., 2010; Man et al., 2017).

Différentes études démontrent que lors d'une infection virale, le nasopharynx connaît une augmentation significative de la diversité microbienne, tandis qu'une diminution significative de celle-ci lors d'une infection respiratoire bactérienne (Amit et al., 2009). Des modèles murins ont confirmé que l'infection virale, en particulier la grippe, favorise l'adhésion bactérienne au moyen de certains mécanismes dont l'activation du TGF- β ou encore de l'interféron de type I (IFN), ce qui accroît le risque d'infections bactériennes secondaires (Bakaletz, 2017; Edouard et al., 2018). De plus, une étude réalisée chez les enfants a montré qu'une infection au virus de l'influenza peut être associée à une multiplication par 15 fois du nombre de *S. pneumoniae* dans les voies aériennes supérieures contrairement à des enfants ne présentant pas d'infection virale (Vu et al., 2011).

Ces observations peuvent s'expliquer par le fait que le virus, pas des mécanismes extrinsèques ou intrinsèques, pourrait entraîner la suppression de la clairance bactérienne et par conséquent, favoriser la prolifération d'espèces bactériennes qui pourraient bénéficier de ce nouvel environnement favorable à sa croissance et à sa prolifération (Bradley et al., 2011; Rogers et al., 2013). Le virus, en changeant l'environnement des voies aériennes, pourrait également entraîner l'augmentation de l'adhésion bactérienne à l'épithélium bronchique (Avadhanula et al., 2006; Wang et al., 2009), provoquant ainsi l'augmentation du nombre de bactéries et entraînant un déséquilibre au profit des bactéries néfastes pour le bon fonctionnement du système respiratoire. Une analyse comparative a quantifié des bactéries spécifiques chez des patients adultes avec ou sans infection par le virus de l'influenza de type A. Les auteurs ont observé que *S. aureus*, *S. pneumoniae* et *H. influenzae* étaient présents chez des patients infectés en plus grande proportion que chez les patients non infectés, augmentant le risque d'infection respiratoire secondaire (Hanada et al., 2018; Safaeyan et al., 2015).

Certains virus ont la capacité d'infecter de façon systémique grâce au produit de l'activité bactérienne. Par exemple, le clivage de l'hémagglutinine est un élément clé dans l'activation du virus de la grippe. Il permet au virus de se lier à la cellule hôte et d'entrer dans la cellule, ce qui est nécessaire pour que le virus puisse se

répliquer et causer une infection (Böttcher-Friebertshäuser et al., 2013). Par exemple, *H. influenzae* (Diaz-Diaz et al., 2022), *P. aeruginosa* (Qin et al., 2022) et *S. pneumoniae* (Sura et al., 2022) possèdent l'activité protéolytique nécessaire à une réplication et une infectivité virales efficaces (Lynch, 2014; Tashiro et al., 1987).

Une équipe de recherche basée à Hong Kong a décrit comment l'infection au virus de l'influenza A H1N1 peut causer des dommages importants à la paroi épithéliale des voies respiratoires, pouvant entraîner une infection bactérienne potentiellement mortelle. Seules les bactéries capables de détecter et de réagir à un écosystème en évolution rapide peuvent survivre. De là, lors d'une infection, des genres bactériens ont été associés à une augmentation significative de leur abondance (*Pseudomonas*, *Bacillus* et de *Ralstonia*) et portaient des gènes impliqués dans la motilité, la régulation transcriptionnelle, le métabolisme et la signalisation. À l'inverse, les genres qui ont vu une réduction significative de leur abondance (*Prevotella*, *Veillonella* et *Neisseria*), n'ont pas présenté ces gènes fonctionnels de régulation transcriptionnelle, du métabolisme et de la signalisation (Leung et al., 2013).

Même si une infection au virus peut faire bénéficier d'un avantage certain à des taxons bactériens ce n'est pas le cas pour tous les taxons. Une étude démontre que la présence d'une infection par le virus de la grippe diminue l'abondance des populations de bactéries dans le nasopharynx contrairement aux témoins non atteints (Verkaik et al., 2011). La densité bactérienne où les ligands microbiens peuvent augmenter ou diminuer le taux d'infectivité virale, influencent ainsi positivement ou négativement la réponse immunitaire subséquente de l'hôte à l'infection virale (Verkaik et al., 2011).

Des chercheurs ont démontré que les patients atteints de l'influenza A H7N9, avec une infection pulmonaire bactérienne secondaire, présentaient une perturbation significative de la composition de leur microbiote oral par rapport aux patients H7N9 sans infection bactérienne pulmonaire secondaire (Lu et al., 2017). Les bactéries impliquées dans les infections secondaires pulmonaires incluent *S. pneumoniae*, *H. influenzae* et *K. pneumoniae*. Les patients atteints de grippe H7N9 sévère présentent une diminution de l'abondance relative de *S. aureus* et une augmentation de l'abondance des genres *Prevotella*, *Streptobacillus*, *Porphyromonas*, *Granulicatella*, *Veillonella*, *Fusobacterium* et *Haemophilus* (Lu et al., 2017).

Il existe d'autres facteurs qui peuvent affecter les résultats tels que la génétique, l'âge, le sexe, les habitudes d'hygiène, le statut professionnel, le tabagisme, la prise de médicaments, les antécédents médicaux, le moment de prélèvement après l'apparition de l'infection ou la gravité de l'infection, réponse immunitaire à une infection virale aiguë, les modifications causées par le virus sur la surface épithéliale de l'hôte ou le virus lui-même (File, 2000). Ces derniers peuvent influencer la variabilité de l'élimination de la flore commensale normalement présent chez l'hôte et expliquer parfois la discordance des résultats des études sur le microbiome chez les patients atteints d'infections virales (Hanada et al., 2018). Le chapitre suivant présente les coronavirus, les différentes épidémies liées à cette famille de virus et plus en détail les origines de la pandémie due au SARS-CoV-2, son cycle viral ainsi que ses impacts sur la santé.

CHAPITRE 3 - LA PANDÉMIE DU SARS-CoV-2

3.1 Les coronavirus

Les coronavirus ont été identifiés la première fois sur de la volaille en 1930, comme étant responsables d'infections de l'appareil respiratoire, du tube digestif et du système reproducteur de la poule. Ce qui a donné le nom au virus de bronchite infectieuse aviaire maintenant reconnu sur le nom de coronavirus aviaire (Fields, 2007; Vassilara et al., 2018). Depuis, de nombreux autres coronavirus ont pu être identifiés chez l'humain (*Human Coronaviruses* (HCoVs)). Les premières descriptions chez l'humain apparaissent en 1960 avec le HCoV-229E. Il a été identifié à Chicago chez une personne souffrant d'une maladie du tractus respiratoire (Vassilara et al., 2018). Très peu de temps après, une nouvelle souche, le HCoV-OC43, est isolée à partir d'une personne infectée souffrant de détresse respiratoire (McIntosh et al., 1967). L'inoculation de volontaires par les souches HCoV-229 et HCoV-OC43 par le *Common Cold unit* de Salisbury, au Royaume-Uni, a démontré un lien de causalité entre l'infection et l'apparition de symptômes du rhume (Bradburne et al., 1967). Et c'est en 1968 que l'on attribue officiellement l'appellation coronavirus.

Dans la famille des *Coronaviridae*, il existe trois sous-familles ; les *Orthocoronavirinae*, les *Pitovirinae* et les *Letovirinae*. Ici, nous allons nous concentrer sur les *Orthocoronavirinae* (ICTV, 2023). Les *Orthocoronavirinae* sont de formes rondes de 100 à 160 nm de diamètre avec de longs pics en forme de pétales. Ils sont regroupés sous 4 genres (alpha, bêta, gamma, delta) et affectent principalement les oiseaux et les mammifères (incluant notamment la chauve-souris et l'humain). Les alphas et les bêtas sont connus pour infecter l'humain avec comme hôte intermédiaire le dromadaire et la chauve-souris, alors que les deltas et les gammas infectent préférentiellement les oiseaux. Les bêtas sont déjà étudiés depuis des décennies avec le virus de l'hépatite murine (MHV) et les alphas corona avec le HCoV229E, HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 et HCoV-HKU1. Ces derniers provoquent chez l'humain des maladies légères du tractus respiratoire supérieur et sont très souvent associés avec le rhume (Hartenian et al., 2020).

Cependant, durant les 20 dernières années, trois virus sont apparus dans la population humaine causant des maladies respiratoires graves : le coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-1) en 2002, le coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV) en 2011 et le syndrome respiratoire aigu sévère 2 (SARS-CoV-2) en 2019. On estime qu'il y aurait des centaines à des milliers de coronavirus dans le réservoir que représentent les chauves-souris, et que certains de ces virus pourraient être à l'origine de futures transmissions zoonotiques (Hartenian et al., 2020; He et al., 2014). Cela pourrait être relié au fait que les chauves-souris font partie des plus vieux mammifères sur terre avec une grande diversité, représentant aujourd'hui plus de 1000 espèces, mais surtout qu'elles possèdent un système immunitaire particulier qui leurs permet d'héberger un grand nombre de virus (Hooper et al., 2006). Ainsi les *Orthocoronavirinae* se seraient adaptés et auraient évolués en association, ou en symbiose, avec les chauves-souris. Elles sont présentes sur tout le globe terrestre (à l'exception des régions polaires) et sont des animaux grégaires avec une grande longévité, ce qui facilite la transmission des virus entre les individus (Wang et al., 2019).

Les chauves-souris ont été documentées comme étant le réservoir de plusieurs grands groupes de virus, tels que les *Lyssavirus*, les *Paramyxovirus* et les *Filivirus* (Hu et al., 2015). Au cours de la dernière décennie, de nouveaux groupes de *Orthocoronavirinae* ont été découverts chez une grande variété d'espèces en Asie, en Europe, en Afrique et en Amérique (Smith et al., 2013; Drexler et al., 2014). Les genres les plus retrouvés sont les *Alphacoronavirus*, les *Betacoronavirus*, et sont présents principalement chez les mammifères. De plus, il s'avère que sur les 15 espèces référencées, 7 se retrouvent uniquement chez les chauves-souris (Groot et al., 2011).

3.2 Le SARS-CoV-1

Le SARS-CoV-1 a été détecté pour la première fois fin 2002 dans la province de Guangdong en Chine, sous la forme d'une maladie grave appelée « pneumonie atypique ». Elle était caractérisée par de la fièvre, des maux de tête et l'apparition de troubles respiratoires tels que la toux, la dyspnée et la pneumonie (Chinese SARS Molecular Epidemiology Consortium, 2004). Le SARS-CoV-1 s'est propagé jusqu'à Hong Kong et dans d'autres provinces de Chine. Ainsi, on a évalué un R0 de 1,7 à 1,9 pour le SARS-CoV-1 (R0 : mesure la capacité

d'un virus à contaminer une personne non affectée). Ainsi, en 2003, on a recensé plus de 8 000 cas sur un total de 29 pays (WHO, 2003).

Les premiers cas d'infection au SARS-CoV-1 avaient tous des antécédents de contacts avec des animaux dans les marchés ou les restaurants de la province de Guangdong. À la suite de recherches sur l'origine du SARS-CoV-1, la civette, un petit animal carnivore, a été identifié comme un hôte intermédiaire potentiel. Cette hypothèse a été partiellement étayée par l'abattage massif des civettes dans les marchés, une mesure qui a joué un rôle majeur dans le confinement efficace de l'épidémie (Hu et al., 2015). Cependant, cela reste une hypothèse car aucune preuve n'a été trouvée de la présence de SARS-CoV-1 chez les civettes d'élevages ou sauvages, suggérant qu'elles ne sont très probablement pas le réservoir principal. Il est possible qu'un autre animal soit le véritable réservoir. (Guan et al., 2003; Hu et al., 2015)

3.3 Le MERS-CoV

Le MERS-CoV a été détecté pour la première fois en Arabie Saoudite en juin 2012 avec des symptômes similaires au SARS-CoV-1. MERS-CoV a un R_0 de 0,7 et ne s'est donc pas propagé aussi largement que le SARS-CoV-1 (Hu et al., 2015; Petrosillo et al., 2020). Le virus a réussi à atteindre plusieurs pays en Afrique, en Europe et en Amérique, bien que toutes les personnes l'aient contracté au Moyen-Orient. Un des principaux facteurs de risque aurait été le contact avec des dromadaires. L'épidémie de MERS-CoV en Corée du Sud en 2015 a été causée par une personne qui revenait elle aussi du Moyen-Orient. L'épidémie de MERS-CoV aura fait 1 413 cas confirmés, dont 502 décès (Hu et al., 2015). L'ARN de MERS-CoV a été détecté dans des dromadaires en Arabie Saoudite, au Qatar et en Égypte. Ils présentaient tous une grande similarité génomique de l'ARN, mais surtout au niveau de la nucléocapside, de la protéine spike ou encore, des protéines non codantes avec celles retrouvées lors du séquençage du virus retrouvé chez des patients humains. Ces observations suggèrent que le dromadaire transmet les MERS-CoV à l'humain lors d'un contact direct (Alagaili et al., 2014; Briese et al., 2014; Muhairi et al., 2016). En outre, de grandes similitudes sont apparues entre ce virus chez la chauve-souris et le dromadaire. Il a été avancé que la transmission entre la chauve-souris et le dromadaire se serait faite il y a plus de 20 ans en Afrique (Corman et al., 2014).

Le SARS-CoV-1 et le MERS-CoV sont des virus avec pour hôte intermédiaire les chauves-souris. Ce sont des agents pathogènes zooniques ayant franchi la barrière des espèces, c'est-à-dire développant des mutations génétiques permettant la transmission et l'infection chez l'homme. Ils ont franchi cette barrière en infectant des hôtes intermédiaires : la civette et le dromadaire respectivement. Les chercheurs pensent que le MERS-CoV existe depuis quelques années chez les dromadaires et qu'il est largement répandu à travers les pays du Moyen-Orient et de l'Afrique (Cui et al., 2019). La surveillance de ce virus est plus délicate que le SARS-CoV-1. En effet, la consommation de lait et de viande de dromadaire peut être un vecteur de transmission du virus. Une des solutions pour contrer sa propagation serait la vaccination des dromadaires contre le MERS-CoV, afin d'empêcher la transmission du virus à l'humain (Yusof et al., 2015).

3.4 Pandémie du SARS-CoV-2

3.4.1 Origine théorique

En 2023, les origines théoriques les plus probables sur l'émergence du SARS-CoV-2 demeurent la contamination par zoonose (Hu et al., 2021).

La première trace de SARS-CoV-2 a été retracée fin 2019, dans un marché humide de la ville de Wuhan, province de Hubei en Chine (Casella et al., 2022). Ce marché est connu pour ses fruits de mer (poissons et crustacés), mais également pour la vente de divers animaux sauvages, vivants ou morts tels que : les hérissons, les serpents et les oiseaux (Hasöksüz et al., 2020; Wu et al., 2020). Comme bon nombre de coronavirus, le SARS-CoV-2 tiendrait son origine des chauves-souris et aurait été transmis à l'homme par l'intermédiaire d'un autre animal (Hasöksüz et al., 2020). Les pistes concernant l'hôte intermédiaire se sont orientées vers le pangolin. Cet animal était présent dans le marché et testé positif au dépistage du SARS-CoV-2 (Hasöksüz et al., 2020).

Le premier cas recensé est un homme travaillant sur le marché de Wuhan et admis à l'hôpital de Wuhan le 26 décembre 2019 après 6 jours de symptômes grippaux. Le patient était sans antécédent médical particulier et présentait de la fièvre, une oppression thoracique et de la toux. Une semaine après le premier cas, ce sont 44 patients admis dans cet hôpital qui présentaient les mêmes symptômes et, dans certains cas, une pneumonie

(Yesudhas et al., 2021). Les 13, 15 et 20 janvier, ce sont les ministères de la Santé de Thaïlande, du Japon et de la Corée respectivement, qui ont signalé les premiers cas de nouveau coronavirus (Somsen et al., 2020). Dès la fin du mois de janvier, ce sont 1 099 patients présentant un COVID-19 confirmé, dans les 552 hôpitaux des 30 provinces de Chine, qui étaient documentés (Yesudhas et al., 2021). Le 30 janvier l'OMS déclare l'épidémie de COVID-19 comme étant une urgence de santé publique de portée internationale. Puis, ce sont plusieurs pays d'Europe qui signalent les premiers cas de COVID-19. Au 31 mars, le nombre symbolique de 1 million de personnes atteintes par le SARS-CoV-2 est franchi, le virus est alors présent dans le monde entier. Le temps d'incubation du virus serait de 1 à 12 jours et les symptômes les plus courants sont : la fièvre, la toux, la diarrhée et la fatigue (Yesudhas et al., 2021; Somsen et al., 2020). Son mode de transmission interhumain est aéroporté, par gouttelettes (toux ou éternuement) ou, dans une moindre mesure, par contact d'objets infectés (vêtement ou poignée de porte) (Zhang et al., 2020).

En août 2023, on recense chaque jour de nouveaux cas de SARS-CoV-2 sur chaque continent. Il est toujours responsable de centaines de décès chaque jour et de milliers d'infections. D'après l'OMS, ce sont plus de 758 390 000 personnes déclarées infectées, pour un total de 6 859 100 décès depuis le début de la pandémie (World Health Organization, 2022).

3.4.2 Stratégie de réplication virale

Le génome du SARS-Cov2 est d'environ 30 kb d'ARN positif. Le génome viral est recouvert d'une nucléocapside (N) et enfermé dans une bicouche lipidique contenant 3 protéines membranaires : spike (S), membrane (M), et enveloppe (E). La protéine M est la protéine la plus essentielle dans l'incorporation des composants essentiels viraux. La protéine N, s'associe avec le génome viral et participe à l'assemblage avec la protéine M. La protéine E forme un canal ionique dans la membrane virale et participe à l'assemblage viral. La protéine S est nécessaire pour l'entrée du virus dans la cellule, car elle cible et initie la fusion avec la membrane de la cellule hôte.

Pour entrer dans la cellule et détourner la machinerie cellulaire à son avantage, le virus a une affinité particulière avec l'enzyme de conversion à l'angiotensine II, la protéine ACE2. Cette protéine est principalement

transmembranaire et assure un rôle dans le maintien de l'homéostasie des organes sur lesquels elle est présente (Zou et al., 2020). C'est un acteur majeur de la régulation du système-rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) et également du système kinine-kallikrein (SKK), deux systèmes importants dans le processus inflammatoire (Imai et al., 2005; Schmaier, 2002). Ces protéines sont présentes sur les cellules épithéliales des voies respiratoires inférieures (alvéole, bronchiole, bronche, trachée), mais également dans le cerveau, les reins, le foie, et le cœur (Scialo et al., 2020).

3.4.3 Transcription et synthèse polyprotéine et protéolyse

Une fois le virus dans la cellule, il va utiliser la machinerie cellulaire de la cellule hôte pour créer des polyprotéines. Elles vont être créées à partir de l'ARN viral positif et de deux gènes en particulier. Le premier, le gène ORF1a codera pour la polyprotéine pp1a. Et le second, le gène ORF1ab, codera pour la polyprotéine pp1ab. Ces deux polyprotéines vont subir une protéolyse et engendrer 15 à 16 protéines non structurales (Thomas, 2020). Ces protéines sont impliquées dans un large éventail de fonctions, dont la création de la machinerie permettant la réplication du virus. La polymérase dépendante de l'ARN (RdRp) joue un rôle important dans la réplication et la transcription du génome en synthétisant de nouvelles molécules d'ARN. La protéase de type papain (PLPro) est responsable de la maturation et du clivage des polyprotéines, cela a pour rôle la réplication du virus dans l'infection des cellules. Et enfin, le complexe réplique-transcriptase (RTC) forme un complexe de plusieurs protéines permettant de copier et de transcrire l'ARN viral en ARN sous génomique (ARNsg) et en brin ARN génomique (ARNg) pour la réplication. Ainsi le virus va pouvoir se répliquer (Figure 1). L'équilibre entre ces polyprotéines est un facteur déterminant pour l'infection et la réplication du virus, ce qui en fait des pistes d'interventions thérapeutiques (Malone et al., 2022).

3.4.4 Transcription et réplication

La réplication et la synthèse du SARS-CoV-2 impliquent la synthèse du brin complémentaire négatif, qui servira de matrice à la création du brin positif. Cette transformation complémentaire du brin positif en brin négatif se fait grâce à l'enzyme du RdRp, un enzyme codé par le génome du virus lui-même. Par la suite, les protéines

non structurales subissent des modifications post structurales et se rassemblent pour former des complexes de réplifications et de transcription du génome. Les protéines structurales sont traduites dans le réticulum endoplasmique (Alanagreh et al., 2020). Les coronavirus utilisent un complexe de multiprotéines avec le RdRp, une hélicase, une protéine de liaison simple brin, une exonucléase et d'autres cofacteurs et enzymes de coiffage pour permettre la réplication. Bien qu'ils n'aient pas d'activité de contrôle ou de relecture, les coronavirus possèdent de façon exceptionnelle, une exonucléase à haute-fidélité de réplication. La coiffe de l'extrémité 5' de l'ARNm viral est importante pour sa stabilité et pour échapper au système immunitaire (Malone et al., 2022).

3.4.5 Empaquetage et expulsion

Une fois traduit et répliqué, le virus doit pouvoir reformer une capsid dans le cytoplasme de la cellule hôte afin de créer un virion propice à sa sortie. Il va alors provoquer, à l'aide des polyprotéines, la formation d'une vésicule à double membrane à partir de celle du réticulum endoplasmique. Par la suite, les glycoprotéines virales (S, E et M) sont transloquées dans le réticulum endoplasmique. Elles vont devenir le site de bourgeonnement et l'enveloppe lipidique du virion. L'ensemble de ces protéines, se déplace vers le compartiment intermédiaire endoplasmique-réticulum-Golgi (ERGIC) (Alanagreh et al., 2020). Dans le même temps les protéines N sont traduites à partir de l'ARN dans le cytoplasme, pour aller dans le compartiment intermédiaire endoplasmique-réticulum-Golgi. Les protéines N vont ensuite venir emballer l'ARN génomique, pour ensuite se diriger vers le ERGIC pour l'assemblage du virion (Figure 1). Une fois le bourgeonnement fait à partir de la membrane du ERGIC, les virions sont transportés par des vésicules à parois lisses, prêtes à être expulsées par la cellule par exocytose (Alanagreh et al., 2020; Letko et al., 2020).

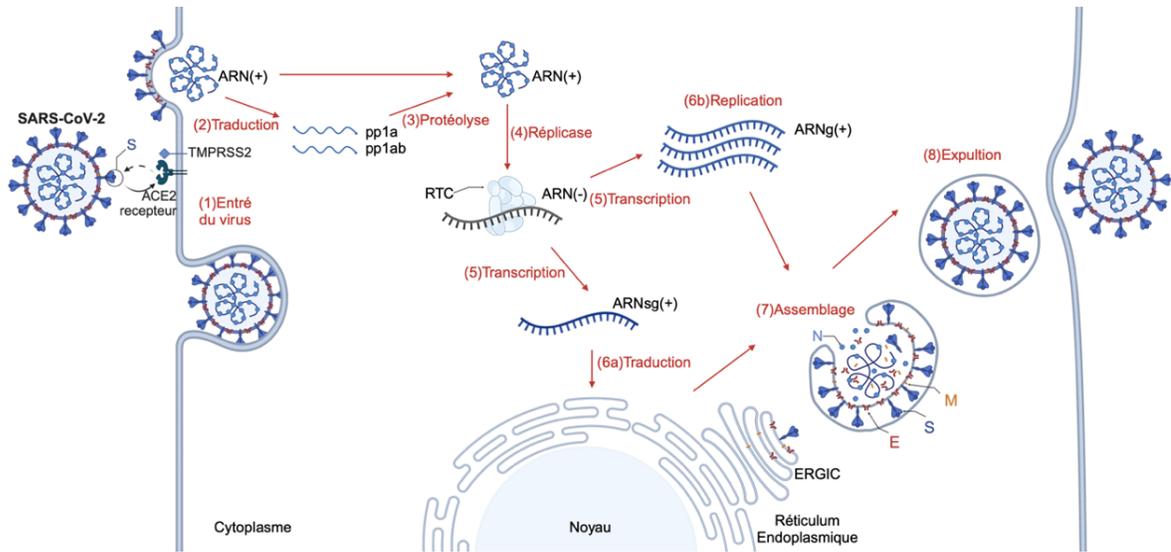


Figure 1. Schéma du cycle viral de la réplication du SARS-CoV-2

(1) Après attachement du virus par la protéine de S sur la cellule, le virus va fusionner ou par phénomène d'endocytose entrer dans la cellule et libérer la nucléocapside dans le cytoplasme. (2) Les gènes de la réplicase sont traduits en polyprotéines pp1a et pp1ab. (3) La protéolyse de ces protéines va former un vaste complexe de protéines nommé : *replicase transcriptase complexe*, qui va permettre la réplication de l'ARN positif en ARN négatif (4). Puis le RTC transcrit l'ARN négatif en brin positif avec la création de l'ARN sous génomique ou en ARN génomique (5). L'ARN sous génomique, va ensuite être traduit par le réticulum endoplasmique et le compartiment intermédiaire endoplasmique-réticulum-Golgi pour former les protéines structurales (6a). L'ARN génomique va être répliqué afin de former l'ARN viral (6b). Par la suite, les protéines traduites par le compartiment intermédiaire endoplasmique-réticulum-Golgi vont former la capsid et les protéines glycoprotéiques d'enveloppe (7). Enfin il y a expulsion du virus à l'extérieur de la cellule (8). (Figure réalisée avec BioRender, 2023©) © William Bourumeau.

3.5 La COVID-19

3.5.1 Tempête cytokinique

Le système immunitaire a pour rôle d'assurer la protection de l'organisme contre les agents pathogènes par la combinaison de mécanismes innés et adaptatifs. Il est essentiel dans la surveillance, la protection de l'organisme, la réaction inflammatoire, la régulation immunitaire et l'établissement de l'homéostasie du corps (Sattler, 2017). Pour cela, les cytokines forment un réseau de communication complexe entre le système pro et anti-inflammatoire afin de fournir une réponse adéquate de la part du système immunitaire. La mise en

défaillance de ce système par le virus du SARS-CoV-2 peut entraîner une réponse inadéquate, incontrôlée, avec un impact systémique sur l'organisme (Zanza et al., 2022).

Lors de la pénétration du virus dans la cellule, le SARS-CoV-2 neutralise la protéine ACE2 (Alanagreh et al., 2020; Ramos et al., 2021). Celle-ci n'étant plus opérationnelle, il va apparaître une dérégulation des systèmes qu'il sert, dont le système rénine angiotensine aldostérone (SRAA), et le système kallikréine-kinine (SKK) (Ramos et al., 2021; Scialo et al., 2020). De cette manière, le SKK se trouve affecté par le blocage de la protéine ACE2, ce qui perturbe cette voie interconnectée avec la voie SRAA. La figure 2A présente la dérégulation du SKK. Le kininogène est le précurseur du système kallikréine-kinine et va être clivé par la kallikreine en bradykinine (BK). La BK peut emprunter deux voies métaboliques, soit elle se lie directement au récepteur 2 de la bradykinine (BK-2R) pour produire des facteurs anti-thrombotiques, anti-coagulants, antioxydants. Dans le même temps, elle peut provoquer une vasodilatation, une perméabilité vasculaire, une natriurèse et une diurèse. L'enzyme kinase1 dégrade la BK pour devenir bradykinine des-Arg9 (des-Arg9 BK), mais elle est rapidement dégradée par la protéine ACE2 et la rend inactive. Cependant, en l'absence de cette protéine ACE2, des-Arg9 BK n'est pas désactivé. Elle se lie ensuite au récepteur BKB-1R et provoque de l'inflammation, de la vasoconstriction et de la fibrose (Blanco-Melo et al., 2020; Oliveira et al., 2021; Ramos et al., 2021).

La figure 2B présente la dérégulation du SRAA. Dans le SRAA, l'angiotensinogène est le précurseur du système rénine-angiotensine-aldostérone et est transformé par la rénine en angiotensine I (Ang I). Puis, Ang I est transformé par l'enzyme ACE1 en angiotensine II (Ang II) et peut alors se fixer sur le récepteur de l'angiotensine II type I (AT1R) ou type II (AT2R). Ou alors, Ang I peut directement se fixer sur l'enzyme ACE2 pour être dégradé en angiotensine [1-9] (Ang [1-9]) et être transformé en angiotensine [1-7] (Ang [1-7]) par le l'enzyme ACE1. L'Ang [1-7] va venir activer la voie métabolique de Mas, connue pour ses effets de vasodilatation, anti-inflammatoires, anticoagulants et diurétiques. Mais aussi, Ang II peut être transformé par l'ACE2 pour devenir Ang [1-7] et rencontrer le récepteur Mas. Or, si l'enzyme ACE2 n'est plus fonctionnel, l'Ang

I n'est plus réduite en Ang [1-5] ou en Ang [1-7], et donc l'angiotensine II est en excès. (Lumpuy-Castillo et al., 2020; Oliveira et al., 2021). Cela a pour conséquence la fixation de l'angiotensine II sur le récepteur de AT1R, ce qui provoque une vasoconstriction et la libération de facteurs pro-inflammatoires, pro-fibrosants, pro-oxydants ainsi que des facteurs anti-apoptotiques et de coagulation (Ramos et al., 2021; Scialo et al., 2020).

La figure 2C présente la cascade menant à la tempête cytokinique. En effet, le récepteur de l'angiotensine de type 1 (AT1R) peut induire par l'intermédiaire d'une métalloprotéase ADAM17 l'activation des voies métaboliques du *Tumor necrosis factors alpha* (TNF- α), de l'*Epidermal growth factor* (EGF) et de *Soluble Interleukin 6 Receptor Alpha* (sIL-6Ra). La métalloprotéase ADAM17 active TNF- α pour prendre une forme soluble et le EGF pour aller respectivement se fixer sur les *Tumor necrosis factors receptor* (TNFR) et les *Epidermal growth factor receptor* (EGFR). Ces deux voies métaboliques aboutissent à la production du *Nuclear factor-kappa B* (NF- κ B) (Hojo et al., 2020). La sIL-6Ra est une forme soluble d'interleukine qui va venir interagir avec la forme insoluble IL-6 pour former le sIL-6Ra-IL-6, l'intermédiaire de la *glycoprotein 130* (gp130), provoqué l'activation de *Signal transducer and activator of transcription* (STAT3), avec une cellule non immunitaire. STAT3 et NF- κ B sont quant à eux capables d'amplifier la production d'IL-6. Et à son tour, IL-6 induit le recrutement des cellules immunitaires acquises et innées, provoquant une réponse inflammatoire démesurée et incontrôlée de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires. (Ramos et al., 2021). Par conséquent, les tissus endothéliaux sont endommagés, entraînant une libération accrue de cytokines et une cascade de dommages tissulaires, connues sous le nom de « tempête cytokinique ». C'est cet ensemble de facteurs qui caractérise la tempête inflammatoire de la COVID-19 (Hojo et al., 2020; Zanza et al., 2022). Lors de biopsies pulmonaires à la suite d'infection au SARS-Cov-2, des études ont montré la présence de pneumocytes de type II et de cellules inflammatoires incluant des neutrophiles, de macrophages granulocytaires (GM-CSF), des monocytes (MCP-1), de lymphocytes T CD8+ et CD4+. C'est le recrutement massif de toutes ces cellules et des cytokines qu'elles produisent qui cause des lésions dans les tissus pulmonaires (Helding et al., 2022).

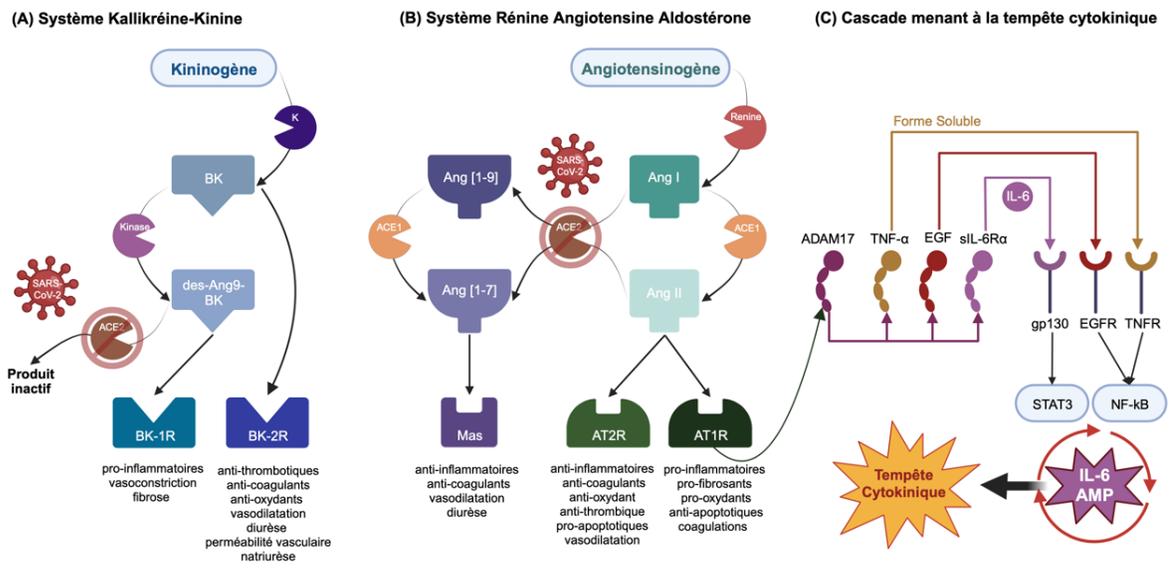


Figure 2. Schéma de dérégulation du système kallikréine-kinine et du système rénine angiotensine aldostérone liée à l'infection au SARS-CoV-2 et de la tempête cytokinique

(A) Le kinogène est clivé par la kallikréine pour devenir la bradykinine. Celle-ci peut directement se fixer sur le récepteur BK-2R. Ou alors, être clivé par une kinase pour devenir des-Ang9-BK et à son tour se fixer sur le récepteur BK-1R ou être dégradé pour l'ACE2 en produit inactif. (B) L'angiotensinogène, clivé par la rénine pour devenir l'Ang I. Celle-ci peut soit se faire cliver par l'ACE2 pour devenir Ang [1-9], une nouvelle fois se faire cliver par l'ACE1 pour devenir Ang [1-7] et venir se fixer aux récepteurs MAS avec un effet protecteur sur l'organisme. Ou alors, se faire cliver par ACE1 pour devenir Ang II et se fixer sur les récepteurs AT1R ou AT2R. Normalement, la majeure partie de Ang II est converti en Ang1-7 par le ACE2, pour se fixer sur le récepteur MAS. Mais dans le cadre d'une infection au SARS-CoV-2, Ang II n'est plus converti et contribue à créer un environnement pro-inflammatoire. (C) Le récepteur AT1R va activer par l'intermédiaire de la métalloprotéase ADAM17, activer la voie métabolique du EGF et du TNF- α , qui stimule la production de NF-kB. ADAM17 active également l'IL-6R α , qui par l'intermédiaire de l'IL-6, va transformer sous forme soluble (sIL-6R α) et former le complexe sIL-6R α -IL-6 pour venir se fixer sur le gp130 (un transducteur de signal de l'IL-6). Et ainsi provoquer l'activation de la STAT3. L'activation en simultané du NF-kB et de la STAT3 est un mécanisme d'amplification d'IL-6. Cela active l'amplificateur IL-6 (IL-6 AMP) et induit la production massive de chimiokines provoquant alors la tempête cytokinique avec tous les dommages liés. (Figure réalisée avec BioRender, 2023®) © William Bourumeau.

3.5.2 Organes touchés par la COVID-19

Comme vu précédemment, le virus a une affinité toute particulière pour le récepteur ACE2. Ce récepteur est présent à la surface d'un grand nombre d'organes, par conséquent cause des dysfonctionnements

systémiques (Ashraf et al., 2021; Gembaradt et al., 2005). Afin de mieux cerner l'ampleur du problème, nous allons passer en revue les principaux organes touchés.

3.5.2.1 Les poumons

Les poumons sont les premiers tissus infectés par le SARS-CoV-2 (Calabrese et al., 2020). Le virus aéroporté se fixe aux récepteurs ACE2 des cellules épithéliales, situées de la trachée aux alvéoles, et ainsi causer l'infection respiratoire (Jia et al., 2005).

Le virus entraîne une manifestation de nombreux symptômes et une sévérité d'atteinte variable. Les atteintes importantes les plus fréquentes sont les détresses respiratoires et les occlusions alvéolaires thrombotiques. Ces pathologies, si elles ne sont pas traitées à temps et convenablement, peuvent mener à une détresse respiratoire sévère (Gando et al., 2022). Tel que vu précédemment dans la section 3.5.1 lors de la tempête cytokinique, l'afflux massif de cytokine et leucocytes mène à une accumulation de liquide dans les interstices pulmonaires, créant ainsi des lésions au niveau de l'endothélium et des alvéoles. Il provoque alors des lésions, allant jusqu'à la mort cellulaire, mais aussi une fibrose des tissus, rendant impossible l'échange gazeux des alvéoles pulmonaires (Luks et al., 2020). La symptomatologie est la suivante : dyspnée, hypoxie sévère, cyanose provoquant un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), ainsi que des troubles systémiques de plusieurs organes dus à un manque d'oxygène. Cet ensemble de dysfonctionnement nécessite parfois la mise en place d'une aide respiratoire et dans certains cas la mise en coma du patient. (Batah et al., 2021; Stenmark et al., 2021).

3.5.2.2 Le cerveau

Bien que le cerveau soit l'un des organes le mieux protégé contre les toxines, les agents pathogènes et les infections virales, grâce à de multiples barrières incluant l'hémato-encéphalique et le système immunitaire, il n'est pas épargné par le SARS-CoV-2 (Daneman et al., 2015). Le virus peut entrer dans les cellules gliales, perturber les mécanismes cellulaires et le bon repliement des protéines, causant des agrégats anormaux de protéines et des inflammations dues à la tempête cytokinique (Lippi et al., 2020). Le virus a une affinité particulière pour le bulbe olfactif, ayant comme conséquence la perte du goût (agueusie) et de l'odorat (anosmie). Mais d'autres troubles ont été rencontrés comme des céphalées, des méningites, des troubles de la

conscience, de l'attention et même des pertes de mémoire (Fotuhi et al., 2020; Montalvan et al., 2020). De plus, dans le cas de la COVID longue, à la suite d'infection du cerveau par le SARS-CoV-2, des articles suggèrent que le développement de certaines maladies neurodégénératives, dont l'Alzheimer et le Parkinson, seraient activées et accélérées (Fotuhi et al., 2020; Rahman et al., 2021; Troyer et al., 2020). De plus, l'apparition de maladies auto-immunes et/ou démyélinisantes comme la sclérose en plaques, à la suite d'une atteinte de la moelle épinière par le SARS-CoV-2 est également rapportée (Montalvan et al., 2020).

3.5.2.3 Le cœur

Le cœur est un organe formé de fibres musculaires lisses sur lesquelles on retrouve des récepteurs ACE2 à leurs surfaces (Mendoza-Torres et al., 2015). Des défaillances cardiaques au niveau du myocarde ont été remarquées chez certains patients atteints de la COVID-19. Il a été remarqué différents types de dysfonctionnement incluant une augmentation de l'activité sympathique, de la rétention d'eau, de la sécrétion d'aldostérone et une vasoconstriction augmentant la pression artérielle (Ashraf et al., 2021; Lumpuy-Castillo et al., 2020). Les lésions causées par l'inflammation peuvent avoir des répercussions sur l'activité cardiaque à moyen et long terme pour certaines personnes menant à des cardiomyopathies comme de l'hypertension, des arythmies, des myocardites, des ischémies cardiaques et d'autres problèmes coronariens (Hafiane, 2020).

3.5.2.5 Les reins

De nombreux cas de personnes admises à l'hôpital pour COVID-19 présentaient des dysfonctionnements rénaux caractérisés par une protéinurie, une hématurie et dans les cas les plus graves une hypokaliémie (Huang et al., 2020). De plus, une augmentation de la réabsorption du sodium, une augmentation du volume sanguin et par conséquent, une augmentation de la pression artérielle (South et al., 2020). Cet ensemble de facteurs provoque à son tour de la fibrose, de l'inflammation et affecte la microcirculation rénale déclenchant la coagulation et la nécrose des tissus. Tous ces symptômes finissent par produire une insuffisance rénale aiguë (Gabarre et al., 2020).

Somme toute, le virus du SARS-CoV-2 vient créer du désordre dans le SRAA et le SKK, en faveur d'une tempête inflammatoire dans l'ensemble des tissus entraînant le dysfonctionnement des organes. La pandémie

a placé la population mondiale dans une situation critique et mis en lumière la nécessité de mieux comprendre la biologie de ce virus, ses interactions avec les autres espèces incluant les micro-organismes, pour contribuer à réduire son potentiel infectieux, améliorer son traitement et être mieux préparé pour faire face aux prochaines pandémies. Ainsi, connaître la biodiversité bactérienne présente dans les voies aériennes peut-être une piste pour mieux comprendre la pathogénèse et pourrait contribuer à identifier des pistes potentielles pour prévenir l'infection au SARS-CoV-2. Documenter la diversité microbienne pourrait contribuer à réduire les risques pour les personnes plus vulnérables en raison de leur microbiome. Le chapitre suivant présente les dernières recherches sur le lien entre le microbiote nasopharyngée et l'infection au virus SARS-CoV-2, à la suite de la pandémie de la COVID-19.

CHAPITRE 4 - LE MICROBIOTE NASOPHARYNGÉ DE PERSONNES INFECTÉES PAR LE SARS-CoV-2

Bien que la majorité des cas de la COVID-19 soient bénins, certains cas peuvent entraîner des complications graves nécessitant une hospitalisation, menant à une insuffisance respiratoire ou à la mort. Cette hétérogénéité des symptômes de la COVID-19 serait due entre autres au génome des individus, à la variabilité de leurs statuts immunitaires et à leurs réponses individuelles face à l'infection par le SARS-CoV-2 (Le Bert et al., 2020; Ren et al., 2021; Zuo et al., 2021). Parmi les facteurs potentiels pouvant expliquer les variations individuelles face à la COVID-19, la diversité microbienne des voies aériennes supérieures pourraient en être une raison.

L'impact du SARS-CoV-2 sur le microbiome, analysé à partir d'échantillons nasopharyngés, a été étudié dans le contexte de la COVID-19 par différents groupes de recherche à travers diverses populations et sur plusieurs variants du virus. La majorité des études réalisées ont utilisé des échantillons prélevés à l'aide d'écouvillons nasopharyngés.

4.1 Modification de la composition bactérienne du microbiote nasopharyngé

Le microbiome respiratoire des patients infectés par le SARS-CoV-2 a été étudié pour comprendre comment les changements dans la diversité bactérienne peuvent influencer la gravité de la maladie de la COVID-19. Les résultats de ces études ont montré que les patients infectés avaient un microbiome significativement altéré par rapport aux individus témoins non infectés. Une diminution de la richesse des bactéries commensales et l'enrichissement en bactéries pathogènes opportunistes sont associés à une diminution de la densité bactérienne et ces observations représentent un facteur de risque pour le développement de la symptomatologie (Hoque et al., 2021; Kolhe et al., 2021).

Le changement de la diversité bactérienne peut avoir un impact sur la santé du patient et sur le phénotype de la maladie COVID-19. Les patients atteints de la COVID-19 ont également montré une plus grande variabilité taxonomique dans le temps (Iebba et al., 2021; Merenstein et al., 2021; Mostafa et al., 2020).

Les espèces bactériennes pathogènes opportunistes sont plus abondantes chez les personnes atteintes de la COVID-19. Par exemple, une étude a démontré que le genre *Prevotella* était associé à des formes sévères de la maladie (Andrade et al., 2022). En effet, bien que le genre *Prevotella* soit très commun dans le microbiome humain et principalement commensal, il est connu pour sa capacité à promouvoir l'infection virale et à augmenter l'inflammation. Cela suggère que, dans certains contextes, sa présence est associée à la sévérité de la maladie (Haran et al., 2021). À l'inverse, le genre *Dolosigranulum*, qui est connu pour protéger contre les dommages liés à l'inflammation, a été négativement corrélé avec le genre *Prevotella* (Mostafa et al., 2020). De plus, une corrélation négative entre la gravité des symptômes et l'abondance de l'espèce *Fusobacterium periodonticum* a été documentée (Nardelli et al., 2021).

Ainsi, plusieurs études ont mis en évidence des différences significatives dans la composition des communautés bactériennes en fonction de la sévérité due à une infection au SARS-CoV-2. À cet effet, les travaux de Ren et ses collaborateurs ont permis de documenter la diversité microbienne allant de la forme asymptomatique au décès (Ren et al., 2021). Dans cette étude, des différences significatives de taxonomie et de communauté ont été mesurées entre les groupes, avec des particularités notables chez les personnes décédées à la suite de l'infection. Une augmentation des bactéries pathogènes opportunistes chez les personnes gravement malades, ainsi qu'une diminution des bactéries protectrices ont été observées (Dubourg et al., 2022; Gauthier et al., 2022; Gupta et al., 2022; Ventero et al., 2021). Enfin, une autre étude a indiqué qu'il existe des différences significatives entre les personnes atteintes par la forme modérée et sévère. Dans celle-ci, les auteurs suggèrent que les bactéries Gram négatif peuvent aggraver la condition de l'infection des personnes atteintes de la COVID-19, en plus de présenter un risque pour le développement d'infections secondaires (Qin et al., 2022).

En somme, l'infection au SARS-CoV-2 diminue la diversité bactérienne et perturbe l'équilibre bactérien dans le tractus respiratoire, entraînant une dysbiose qui aggraverait les symptômes. Les patients atteints de la COVID-19 avaient une association avec des genres bactériens opportunistes en proportion plus importante. Les

individus non atteints par le SARS-CoV-2 présentaient une plus grande diversité. Le tableau n°1 présente les modifications du microbiote nasopharyngé chez les personnes atteintes de la COVID-19. Toutes ces recherches tendent à démontrer que l'infection au SARS-CoV-2 provoque un changement dans le microbiote nasopharyngé.

Tableau 1. Modifications du microbiote nasopharyngé chez les personnes atteintes de la COVID-19

Microorganismes différentiellement abondants dans le microbiome des patients COVID-19 +	Principaux résultats de l'article	Référence
<ul style="list-style-type: none"> ↑ <i>M. catarrhalis</i> ↑ <i>H. influenzae</i> ↑ <i>S. pneumoniae</i> ↑ <i>Propionibacteriaceae</i> 	<p><i>Corynebacterium accolons</i> (bactérie commensale) était associée négativement avec une colonisation par <i>S. pneumoniae</i> (pathogène opportuniste).</p>	(Mostafa et al., 2020)
<ul style="list-style-type: none"> ↓ Pseudomonadota ↓ Fusobacteria ↓ <i>Haemophilus</i> ↓ <i>Leptotrichia</i> ↓ <i>Fusobacterium</i> 	<p>Espèces <i>F. periodonticum</i> étaient corrélées négativement avec la gravité des symptômes.</p>	(Nardelli et al., 2021)
<ul style="list-style-type: none"> ↑ <i>Staphylococcus</i> ↑ <i>Klebsiella</i> ↑ <i>Stenotrophomonas</i> ↓ Pseudomonadota ↓ Actinomycetota ↓ <i>Hemophilus</i> ↓ <i>Actinomyces</i> ↓ <i>Neisseria</i> 	<p>Diminution significative des phylums Pseudomonadota et Actinomycetota chez les personnes atteintes de la forme plus sévère de la maladie avec une augmentation de <i>S. aureus</i>, <i>Klebsiella aerogens</i> et <i>Stenotrophomonas</i> chez les patients hospitalisés.</p>	(Merenstein et al., 2021)
<ul style="list-style-type: none"> ↑ <i>Prevotella</i> ↑ <i>Leptotrichia</i> ↑ <i>Streptococcus</i> 	<p><i>Streptococcus</i>, <i>Leptotrichia</i> et <i>Prevotella</i> étaient caractéristiques des personnes atteintes par la COVID-19 et le genre <i>Prevotella</i> était également lié à la gravité de la COVID-19.</p>	(Ventero et al., 2021)

<ul style="list-style-type: none"> ↑ <i>Salmonella</i> ↑ <i>E. coli</i> ↑ <i>Shigella</i> ↑ <i>S. aureus</i> ↑ <i>S. haemolyticus</i> ↑ <i>K. aerogenes</i> ↑ <i>H. influenzae</i> ↑ <i>Acinetobacter</i> ↑ <i>Moraxella</i> 	<p>Augmentation significative de la famille des <i>Enterobacteriaceae</i> et de pathogènes opportunistes chez les personnes hospitalisées.</p>	<p>(Gauthier et al., 2022)</p>
<ul style="list-style-type: none"> ↑ <i>Pseudomonadota</i> ↑ <i>Haemophilus</i> ↑ <i>Prevotella</i> ↑ <i>Stenotrophomonas</i> ↑ <i>Acinetobacter</i> ↑ <i>Moraxella</i> ↑ <i>Corynebacterium</i> ↑ <i>Gemella</i> ↑ <i>Ralstonia</i> 	<p>Les Firmicutes étaient dominants chez les personnes non infectées, alors que se sont les Pseudomonadota qui le sont chez les personnes infectées.</p> <p>Augmentation des bactéries opportunistes (<i>Streptococcus</i>, <i>Rothia</i> et <i>Neisseria</i>) chez les personnes infectées par le SARS-CoV-2 ce qui suggère que l'environnement inflammatoire provoqué par la présence du SARS-CoV-2 entraîne la présence de bactéries susceptibles de provoquer une infection secondaire.</p>	<p>(Gupta et al., 2022)</p>
<ul style="list-style-type: none"> ↑ <i>Staphylococcus capitis</i> ↑ <i>S. pneumoniae</i> ↑ <i>Corynebacterium propinquum</i> ↑ <i>Corynebacterium accolens</i> ↑ <i>Bacillus massiliamazoniensis</i> ↑ <i>M. catarrhalis</i> ↑ <i>Anaerobacillus alkalidiazotrophicus</i> ↑ <i>Afipia birgiae</i> ↑ <i>K. pneumoniae</i> ↑ <i>Enterococcus faecalis</i> 	<p>Augmentation des bactéries pathogènes opportunistes chez les personnes malades ainsi qu'une diminution des bactéries protectrices, relation avec la gravité de l'infection, notamment chez les patients décédés.</p>	<p>(Dubourg et al., 2022)</p>

↑ *Burkholderia*
↑ *Acinetobacter*
↑ *Staphylococcus*
↑ *Escherichia*
↑ *Shigella*
↑ *Morganella*
↑ *Corynebacterium*

Augmentation des bactéries potentiellement pathogènes chez les personnes admises en soins intensifs.

(Qin et al., 2022)

↑ *Peptoniphilus lacrimalis*
↑ *Campylobacter hominis*
↑ *Prevotella*
↑ *Anaerococcus*

Association entre la composition du microbiome, une augmentation de la diversité des espèces, l'augmentation de l'abondance des pathogènes opportunistes et l'infection au SARS-CoV-2.

(Rosas-Salazar et al., 2021)

↑ : augmentation ↓ : diminution

4.2 Liens entre la COVID-19 et les comorbidités

Bien que tous les effets pathogéniques du SARS-CoV-2 ne soient pas encore documentés, il a été remarqué que les personnes âgées ou/et présentant des comorbidités, comme une maladie inflammatoire chronique, avaient un risque plus élevé de développer une forme grave de la maladie ou des infections secondaires (Bai et al., 2022; Kumar et al., 2022). Ainsi, la présence en amont d'une comorbidité peut induire une dysbiose avant l'infection au SARS-COV-2. Si cette dysbiose devient trop importante, elle peut devenir un facteur aggravant dans le développement des symptômes de la COVID-19 (Ren et al., 2021).

Parmi les comorbidités liées à la COVID-19 sévère on compte la présence de maladies métaboliques incluant l'hypertension artérielle, le diabète, l'obésité et les maladies cardiovasculaires. D'autres comorbidités comme les maladies rénales et les maladies pulmonaires sont aussi souvent retrouvées dans les cas de la COVID-19 sévères (Hernández-Terán et al., 2021). Le tableau n°2 présente les études ayant mis en lumière les modifications du microbiote nasopharyngé en lien avec les comorbidités aggravant la pathogenèse de la COVID-19. Toutes ces recherches tendent à démontrer que l'infection au SARS-CoV-2 provoque des cas plus sévères de la COVID-19 pour les personnes présentant des comorbidités liées aux maladies métaboliques indépendamment des modifications observées dans la diversité microbienne.

Tableau 2. Modifications du microbiote nasopharyngé et les comorbidités aggravant la pathogénèse de la COVID-19

Microorganismes différenciellement abondants dans le microbiome des patients COVID-19 +	Principaux résultats de l'article	Comorbidité	Référence
<p>↑ <i>Corynebacterium</i> ↑ <i>Staphylococcus</i> ↑ <i>Dolosigranulum</i></p>	<p>La gravité de la maladie de la COVID-19 est négativement corrélée avec la présence du genre <i>Corynebacterium</i>.</p>	<p>Obésité (IMC > 30) Diabète Hypertension Maladies cardiaques Maladies pulmonaires</p>	<p>(Shilts et al., 2022)</p>
<p>↑ <i>Streptococcus</i> ↑ <i>Veillonella</i> ↑ <i>Actinomyces</i></p>	<p>Une importante dysbiose du microbiome était significativement associée à un risque accru de forme sévères ou fatales de la COVID-19.</p>	<p>Diabète de type 2 Hypertension Tabagisme Âge < 50 ans Traitements antibiotiques IMC élevé</p>	<p>(Hernández-Terán et al., 2021)</p>
<p>↑ <i>S. aureus</i> ↑ <i>H. influenzae</i> ↑ <i>Cutibacterium acnes</i> ↑ <i>Corynebacterium accolens</i> ↑ <i>C. pseudodiphtheriticum</i> ↓ <i>Ralstonia</i> ↓ <i>Lactobacillus</i> ↓ <i>Porphyromonas</i> ↓ <i>Neisseria</i> ↓ <i>Rothia</i></p>	<p>Réduction des bactéries commensales chez les personnes atteintes de la COVID-19. Les personnes atteintes de la forme la plus grave étaient atteintes de comorbidités.</p>	<p>Hypertension Diabète Maladies pulmonaires chroniques Maladies cardiaques ischémiques Maladies inflammatoires systémiques Maladies neurologiques</p>	<p>(Bai et al., 2022)</p>
<p>↑ <i>Corynebacterium</i> ↑ <i>Staphylococcus</i> ↑ <i>Serratia</i> ↑ <i>Klebsiella</i> ↑ <i>Acinetobacter</i> ↑ <i>Ralstonia</i></p>	<p>Les patients décédés de la COVID-19 avaient une plus grande abondance de pathogènes opportunistes et souffraient de comorbidités.</p>	<p>Maladies cardiaques Hypertension</p>	<p>(Kumar et al., 2022)</p>

↑ : augmentation ↓ : diminution

4.3 Identification de biomarqueurs prédictifs

Afin de permettre l'identification des personnes les plus vulnérables et/ou les plus susceptibles de développer la forme sévère de la COVID-19, il est nécessaire de développer des outils permettant de cibler ces personnes. Les biomarqueurs permettent notamment le diagnostic, l'identification et la surveillance des facteurs de risque (Kim et al., 2023).

L'identification de biomarqueurs de pronostic de gravité de la maladie est un enjeu majeur pour la prise en charge des patients infectés par le SARS-CoV-2. Des études ont cherché à établir une corrélation entre la composition bactérienne des prélèvements par écouvillon oropharyngé à l'admission des patients ayant permis leurs diagnostics. Les résultats montrent que l'abondance des genres bactériens *Streptococcus* et *Actinomyces* est négativement corrélée avec la gravité de la maladie chez les patients atteints de la forme sévère de la COVID-19 (Ren et al., 2021; Shen et al., 2022). En revanche, la diminution de ces genres bactériens représente un état de dysbiose dans le microbiome du tractus respiratoire supérieur. Tout d'abord, cela peut diminuer la résistance à la colonisation du virus SARS-CoV-2 puis prédisposer le patient à une infection secondaire, conduisant à un mauvais pronostic. Les auteurs ont également identifié des biomarqueurs associés à une réduction de plus de 90 % de l'utilisation de ventilation mécanique chez les personnes présentant la forme sévère. Ces biomarqueurs sont *Selenomonas*, *Filifactor*, *Actinobacillus* et *Chroococcidiopsis* (Ventero et al., 2022).

D'autres études sur l'identification de biomarqueurs ont démontré que la présence de certaines bactéries pouvait être associée à une réduction significative de la gravité de la maladie et qu'une faible diversité du microbiome était liée à une gravité plus importante. De plus, la faible diversité du microbiote nasopharyngé peut donc être un biomarqueur pronostic de la gravité de la COVID-19 à l'admission du patient à l'hôpital (Kim et al., 2023). Cela suggère que la gravité de la dysbiose peut être corrélée avec la gravité de la maladie. Ainsi, certaines bactéries pourraient être utilisées comme des biomarqueurs de pronostic et permettre d'identifier les personnes susceptibles de développer la forme sévère de la COVID-19. L'identification des personnes à risque

de présenter la forme sévère permettrait une meilleure prise en charge de ces patients en permettant de réduire le nombre de personnes nécessitant des soins intensifs, de réduire le nombre de jours aux soins intensifs et le taux de mortalité liés à la COVID-19.

En prévention, une des possibilités serait, par exemple, l'administration de probiotique et prébiotique, est envisagé. Les probiotiques, des microorganismes bénéfiques, et les prébiotiques, des composés non digestibles, agissent différemment pour améliorer la santé intestinale en stimulant la croissance et l'activité des bactéries bénéfiques. Cette simple mesure pourrait être bénéfique dans le maintien de l'équilibre de la flore microbienne, et assurer un meilleur fonctionnement de système immunitaire, et ainsi réduire l'inflammation (Shen et al., 2022). Le tableau n°3 présente les modifications du microbiote nasopharyngé associées à la COVID-19 sévère. Toutes ces recherches tendent à démontrer qu'il est possible d'identifier des biomarqueurs à partir du microbiote nasopharyngé lors de l'infection au SARS-CoV-2.

Tableau 3. Modifications du microbiote nasopharyngé et les biomarqueurs associés à la sévérité de la COVID-19

Microorganismes différenciellement abondants dans le microbiome des patients de la COVID-19 + sévère	Principaux résultats de l'article	Biomarqueur	Référence
<p>↓ <i>Selenomonas</i> ↓ <i>Filifactor</i> ↓ <i>Actinobacillus</i></p>	<p>Les genres <i>Selenomonas</i>, <i>Filifactor</i>, <i>Actinobacillus</i> ou <i>Chroococcidiopsis</i> sont des biomarqueurs associés à une réduction de plus de 90 % de l'utilisation de la ventilation mécanique pour les personnes atteintes de la forme sévère de la COVID-19.</p>	<p><i>Filifactor</i> <i>Actinobacillus</i> <i>Chroococcidiopsis</i> <i>Selenomonas</i></p>	<p>(Ventero et al., 2022)</p>
<p>↑ <i>Rothia</i> ↑ <i>Veillonella</i> ↑ <i>Actinomyces</i></p>	<p>Le genre <i>Streptococcus</i> a été associé à la stabilité du microbiome. L'espèce <i>S. parasanguinis</i> détectée à l'admission, est significativement corrélée au pronostic chez les patients de la forme légère à modérée.</p>	<p><i>Streptococcus</i> <i>S. parasanguinis</i></p>	<p>(Ren et al., 2021)</p>
<p>↑ <i>Enterococcus</i> ↑ <i>Candida</i> ↓ <i>Bacteroides</i> ↓ <i>Streptococcus</i> ↓ <i>Actinomyces</i> ↓ <i>Atopobium</i></p>	<p>Les genres <i>Streptococcus</i>, <i>Actinomyces</i>, <i>Atopobium</i> sont négativement corrélés avec la gravité de la maladie chez les patients admis en soins intensifs contrairement à <i>Enterococcus</i> et <i>Candida</i>.</p>	<p><i>Streptococcus</i> <i>Atopobium</i></p>	<p>(Shen et al., 2022)</p>
<p>↑ <i>Bifidobacterium</i> ↑ <i>Lactobacillus</i></p>	<p>Les genres <i>Bifidobacterium</i> et <i>Lactobacillus</i> sont positivement corrélés avec la sévérité de la maladie.</p>	<p><i>Bifidobacterium</i> <i>Lactobacillus</i></p>	<p>(Kim et al., 2023)</p>

<p>↑ <i>Corynebacterium</i> ↑ <i>Staphylococcus</i> ↑ <i>Serratia</i> ↑ <i>Klebsiella</i> ↑ <i>Acinetobacter</i> ↑ <i>Ralstonia</i></p>	<p>Les genres <i>Corynebacterium</i>, <i>Staphylococcus</i>, <i>Serratia</i>, <i>Micrococcus</i> et <i>Klebsiella</i> sont des biomarqueurs pour les patients décédés. L'espèce <i>Ochrobactrum burkholderia</i> et le phylum Betaproteobacteria sont des biomarqueurs pour les patients atteints COVID-19.</p>	<p><i>Corynebacterium xerosis</i> <i>Serratia epidermidis</i> <i>Serratia liquefaciens</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>Ochrobactrum anthropic</i> <i>Ochrobactrum tritici</i> <i>Burkholderia cepacia</i></p>	<p>(Kumar et al., 2022)</p>
<p>↑ <i>S. aureus</i> ↑ <i>H. influenzae</i></p>	<p>Les genre <i>Moraxella</i> et <i>Propionibacterium</i> sont associés à une amélioration de l'état de santé et diminution de l'inflammation chez les patients atteints de la COVID-19.</p>	<p><i>Moraxella. lincolnii</i> <i>Propionibacterium namnetense</i></p>	<p>(Bai et al., 2022)</p>

↑ : augmentation ↓ : diminution

CHAPITRE 5 - BACTERIAL BIOMARKERS OF THE OROPHARYNGEAL AND ORAL CAVITY DURING SARS-COV-2 INFECTION

William Bourumeau^{1,2}, Karine Tremblay^{3,4}, Luigi Bouchard^{5,6}, Guillaume Jourdan², Catherine Girard^{1,2}, Catherine Laprise^{1,2*}

¹ Département des Sciences Fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, Saguenay, QC G7H 2B1, Canada. wbourumeau@etu.uqac.ca ; c9girar@uqac.ca ; catherine.laprise@uqac.ca

² Centre Intersectoriel en Santé Durable, Université du Québec à Chicoutimi, Saguenay, QC G7H 2B1, Canada. wbourumeau@etu.uqac.ca ; c9girar@uqac.ca ; catherine.laprise@uqac.ca ; guillaume.jourdan@usherbrooke.ca

³ Pharmacology–Physiology Department, Université de Sherbrooke, Saguenay, QC J1K 2R1, Canada. karine.tremblay@usherbrooke.ca

⁴ Research Centre of Centre intégré universitaire de santé et de services sociaux du Saguenay–Lac-Saint-Jean (CIUSSS-SLSJ), Saguenay, QC G7H 7K9, Canada. karine.tremblay@usherbrooke.ca

⁵ Biochemistry and Functional Genomics Department, Faculty of Medicine and Health Sciences (FMHS), Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC J1K 2R1, Canada. Luigi.Bouchard@usherbrooke.ca

⁶ Department of Laboratory Medicine, Centre intégré universitaire de santé et de services sociaux (CIUSSS) du Saguenay-Lac-Saint-Jean - Hôpital de Chicoutimi, Saguenay, QC G7H 5H6, Canada. Luigi.Bouchard@usherbrooke.ca

* Correspondence: ; catherine.laprise@uqac.ca ; Tel.: 418 545-5011 poste 5659 ; 555 boulevard de l'Université Chicoutimi, QC G7H 2B1, Canada.

5.1 Avant-propos

Cet article a été soumis le 26 septembre 2023 au *Microorganisms Journal* et publié le 4 novembre 2024.

Contributions des auteurs : Conceptualisation, C.L. ; méthodologie, C.G. et A.M.M. ; validation, A.M.M. et C.G. ; analyse formelle, W.B. ; investigation, W.B. ; ressources, C.L., K.T., L.B. et G.J. ; conservation des données, W.B. ; rédaction - préparation de la version originale, W.B. ; rédaction - révision et édition, C.L., C.G., A.M.M. K.T., L.B. et G.J. ; visualisation, W.B. ; supervision, C.L. et C.G. ; administration du projet, C.L. ; acquisition des fonds, C.L. Tous les auteurs ont lu et approuvé la version publiée du manuscrit.

Financement : Ce travail a été rendu possible grâce au partage ouvert des données et des échantillons de la Biobanque québécoise de la COVID-19 (BQC19), financée par le Fonds de recherche du Québec - Santé, Génome Québec, l'Agence de la santé publique du Canada et, à partir de mars 2022, le ministère de la Santé et des Services sociaux. Catherine Laprise fait partie du Réseau de santé respiratoire du Québec (RSR ; <https://rsr-qc.ca/en/>), est investigatrice de l'étude CHILD, directrice du Centre intersectoriel en santé durable de l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC) et titulaire de la Chaire de recherche du Canada en génomique de l'asthme et des maladies allergiques (<http://www.chairs.gc.ca>) ainsi que cotitulaire de la Chaire de recherche du Québec en santé durable.

Déclaration sur la disponibilité des données : Les données présentées dans cette étude sont disponibles sur demande auprès de l'auteur correspondant. Les données ne sont pas accessibles au public pour des raisons éthiques.

Remerciements : Nous remercions tous les participants du BQC19 pour leur contribution. Nous remercions le Pr Luigi Bouchard (Université de Sherbrooke), chef du Service de biologie moléculaire et de génétique, Département clinique de médecine de laboratoire du CIUSSS du SLSJ, et son équipe pour leur aimable soutien dans la fourniture des échantillons cliniques analysés dans cette étude.

Conflits d'intérêts : Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêts.

5.2 Résumé

(1) Contexte : Les personnes atteintes de COVID-19 présentent différentes formes de gravité de la maladie et il a été suggéré que le microbiome des voies respiratoires supérieures joue un rôle crucial dans le développement de ces symptômes ; (2) Méthodes : La présente étude a analysé les profils microbiens de la cavité buccale et de l'oropharynx de 182 patients atteints de la COVID-19, comparés à ceux de 75 individus non atteints. Les échantillons ont été obtenus à partir d'échantillons de dépistage par gargarisme. Le séquençage de l'amplicon de l'ARNr 16S a été appliqué pour analyser les échantillons. (3) Résultats : La présente étude montre que l'infection par le SARS-CoV-2 induit des différences significatives dans les assemblages de communautés bactériennes, avec *Prevotella* et *Veillonella* comme biomarqueurs pour les personnes testées positives et *Streptococcus* et *Actinomyces* pour les personnes testées négatives. Cela suggère également un état de dysbiose de la part des personnes infectées en raison des différences significatives dans la communauté bactérienne en faveur d'un microbiome plus riche en pathogènes opportunistes. (4) Conclusions : L'infection par le SARS-CoV-2 induit une dysbiose dans les voies respiratoires supérieures. L'identification de ces biomarqueurs pathogènes opportunistes pourrait constituer un nouvel outil de dépistage et de prévention pour les personnes présentant une dysbiose antérieure.

Mots clés : SARS-CoV-2 1 ; Oropharynx 2 ; Cavité buccale 3 ; Microbiome 4 ; MiniSeq 5 ; Biomarqueurs 6 ; Dysbiose 7

5.3 Abstract

(1) Background: Individuals with COVID-19 display different forms of disease severity and the upper respiratory tract microbiome has been suggested to play a crucial role in the development of its symptoms; (2) Methods: The present study analyzed the microbial profiles of the oral cavity and oropharynx of 182 COVID-19 patients compared to 75 unaffected individuals. The samples were obtained from gargle screening samples. 16S rRNA

amplicon sequencing was applied to analyze the samples. (3) Results: The present study shows that SARS-CoV-2 infection induced significant differences in bacterial community assemblages, with *Prevotella* and *Veillonella* as biomarkers for positive-tested people and *Streptococcus* and *Actinomyces* for negative-tested people. It also suggests a state of dysbiosis on the part of the infected individuals due to significant differences in bacterial community in favor of a microbiome richer in opportunistic pathogens. (4) Conclusions: SARS-CoV-2 infection induces dysbiosis in the upper respiratory tract. The identification of these opportunistic pathogenic biomarkers could be a new screening and prevention tool for people with prior dysbiosis.

Keywords: SARS-CoV-2 1; Oropharynx 2; Oral cavity 3; Microbiome 4; MiniSeq 5; Biomarkers 6; Dysbiosis 7

Abbreviation

ASVs: amplicon sequence variants

BQC19 : Biobanque québécoise de la COVID-19

BR: Broad Range

CIUSSS : Centre intégré universitaire de santé et de services sociaux

CL2: Containment Level 2

COVID-19: coronavirus disease 2019

LDA: Linear discriminant analysis

LEfSe: Linear discriminant analysis effect size

LPS: lipopolysaccharides

NK: natural killer

NMDS: Non-metric Multidimensional Scaling

NT: negative test

OCO: oral cavity and oropharynx

PT: positive test

RHN: Respiratory Health Network

SARS-CoV-2: severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

SLSJ: Saguenay–Lac-St-Jean

UQAC : Université du Québec à Chicoutimi

5.4 Introduction

In 2020, the World Health Organization declared that the coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by the new severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) coronavirus had reached pandemic levels [1]. As of 2023, it has infected more than 761 million individuals worldwide [2]. To date, the scientific community has been working on several fronts to better understand the virus, the health impacts both short- and long-term, and to establish prevention and intervention strategies [3–5].

In healthy individuals, the airways harbor a complex community of microorganisms (or microbiome) that contributes to the development of the respiratory tract architecture, plays a role in the development and function of the immune system, and acts as an important component of the epithelial barrier to airway infection [6–8]. This has been shown in acute viral respiratory infection, where in this context, the airway microbiome is altered by the viral infection or to support the host immune system response [9,10], which may be promoted by the microbiome via epithelial cells through stimulation of immunocompetence [10,11]. A study on influenza demonstrated *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* in the airways in maintaining a protective immune environment against viral infections [10]. Conversely, the presence of opportunistic pathogens such as *Streptococcus*, *Haemophilus* and *Neisseria* can potentially contribute to the development of opportunistic respiratory diseases, thereby leading to more severe respiratory diseases [12,13].

A better understanding of the role of the microbiome in relation to the immune response may lead to the use of probiotics to prevent or treat diseases. In this regard, certain taxa in the microbiome could serve as indicators of disease susceptibility and help tailor treatments to restore a more resistant microbial signature to the initial stage of care [14]. Indeed, during viral infections, the oral administration of *Lactobacillus* genera has had a beneficial effect in inducing protective immunity via increased antibody production and natural killer cell (NK) recruitment [15]. Several other examples of the impact of probiotic treatments for respiratory infections or diseases were described in mouse models. Oral administration of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Lactococcus* strains improves the symptoms of influenza infection by modulating the gut microbiota [16] and the increase of Th2 (responsible for chronic disease) in the blood caused by antibiotics, can be prevented by a probiotic treatment [16–18]. Those studies showed the impact of probiotics on the gut microbiome but not on the

airway one. However, research have demonstrated how the gut microbiome can modulate microbiome diversity in the lung through the gut-lung axis [19,20]. This process includes the oropharynx, which is central to the migration of environmental products and bacteria from one organ to the other and illustrates how ingested probiotics can alter oropharynx microbiome through gut microbiome modifications [21].

In the human airways, the oropharynx harbors the densest and most diverse microbiome [11]. The taxonomic richness of the respiratory tract is at its highest in the oropharynx, primarily because of its unique anatomical location, serving both the digestive and respiratory systems [11]. It is the main source of the pulmonary microbiome in adults, which makes it an interesting region to study as it represents the health status of the airway microbiome [7,11,22].

Several studies have been conducted on the impact of microbiome diversity, particularly in the oropharyngeal microbiome, on COVID-19 risk and symptoms. Disruption of the oropharyngeal microbiome in patients with COVID-19 may promote the growth of respiratory pathogens, leading to metabolic imbalances and increasing disease severity [11,23]. Moreover, the composition of the oropharyngeal microbiome is closely linked to the requirement for respiratory support, underscoring the critical role of a healthy oropharyngeal microbiome in the prevention and treatment of COVID-19 [24]. This disruption appears to promote the growth of respiratory pathogens such as *Staphylococcus* and favored the onset of bacteremia following respiratory colonization by *Enterococcus*, suggesting a microbial dysbiosis in patients with COVID-19 [23]. Further studies have demonstrated an inflammatory dysbiosis in patients with COVID-19, marked by the presence of the *Prevotella* and *Veillonella* genera. These findings have been linked to respiratory infections and an increased in the clinical severity of the disease [11,24]. Additionally, the presence of the *Leptotrichia* genus have been associated with the establishment of a pro-inflammatory environment characterized by the production of lipopolysaccharides (LPS) [24]. Furthermore, certain bacteria, like *Actinomyces*, known for producing mycolic acid, exhibited an inverse correlation with the requirement for respiratory assistance [25]. Gaining a deeper comprehension of taxa that serve as indicators of COVID-19 risk or severity holds significant importance for this disease, given its high variability in terms of disease presentation and symptoms severity [11].

In this study, alterations in microbial diversity and the presence of biomarkers in both infected and uninfected individuals were observed, suggesting that viral infection induces changes in the bacterial homeostasis of the respiratory tract. Furthermore, the identification of biomarkers in each group allows us to further our understanding of these links and explore potential prevention strategies for future epidemics. This research is of considerable importance for understanding the interaction between the virus and the microbiome of the oral cavity and oropharynx (OCO), which will enable us to develop targeted measures for preventive public health interventions.

5.5 Materials and methods

Study population

Samples were collected in the Saguenay–Lac-St-Jean (SLSJ) region, in northeastern Quebec (Canada). Population genetics in SLSJ have a unique structure due to several isolated migratory flows [26]. This homogeneity is interesting to study genetics, culture and environmental exposures [27]. This region was largely protected from initial waves of infection which affected the rest of the province in 2020, due to its remoteness and isolation from large cities, but by the end of 2020 exhibited infection rates comparable to the rest of the province, mainly due to the SARS-CoV-2 alpha variant [28].

Samples from the Quebec Biobank of COVID-19

Samples were obtained from screening tests performed by public health officials in SLSJ. From 2020 to 2022, public health guidelines encouraged and/or required the public to get screened to prevent the spread of COVID-19. Individuals were screened following contact with an infected person or if they presented COVID-like symptoms [1]. Screening was done by gargle test following the *Centre Intégré Universitaire de Santé et de Service Sociaux* (CIUSSS) protocol and according to the standards [29]. This technique involves gargling the mouth and throat twice with 5 ml of commercial plain water and spitting into a cup which is then transferred to a plastic tube. These tests were used for PCR screening by Quebec provincial public health to detect the presence of SARS-CoV-2. During these screening tests, each individual had the opportunity to participate in the provincial

effort for the study of COVID-19; the *Biobanque québécoise de la COVID-19* (BQC19; <https://www.bqc19.ca/en>) which aimed to collect samples and data for research projects [30]. Informed consent for inclusion in the BQC19 was obtained from individuals being screened or their legal representatives. Ethical approval for the present project was obtained from the Research Ethics Board of the *CIUSSS du SLSJ* (IDs: 2022-388, 2021-026). An aliquot of the gargles was kept for each person tested at the Molecular Biology and Genetics Service, Clinical Department of Laboratory Medicine at the *CIUSSS du SLSJ*, for the purposes of this project. After COVID-19 screening, we had access to 256 samples to conduct the microbiome study. Among them, 182 samples were from individuals who screened positive to SARS-CoV-2 and 75 were from individuals who tested negative. Individuals positive to SARS-CoV-2 were either asymptomatic or presented a mild to moderate form of COVID-19. No individuals included in the study were hospitalized due to COVID-19. The SARS-CoV-2 variant that principally struck Quebec at the time of sample collection was the alpha variant [28].

Participants' sex and age are presented in Table 1, with age groups classified according to Health Canada's guidelines [31]. The cohort included 149 women and 108 men, and the average age was similar for men (36 ± 21 years) and women (38 ± 20 years). The positive test (PT) group included 182 individuals (103 women, 79 men) with a mean age of 40 ± 20 years old. There were 74 individuals (45 women, 29 men) in the negative test (NT) group, with a mean age of 30 ± 19 years old. (Table 1).

Table 4. Age and sex of individuals

	Positive test (PT)		Negative test (NT)		
	182 (71.1 %)		74 (28.9 %)		Total
Age group	Men, n (%)	Women, n (%)	Men, n (%)	Women, n (%)	
Children (0-14 years)	5 (2%)	13 (5.1%)	12 (4.7%)	4 (1.6%)	34 (13.3%)
Teenagers (15-24 years)	14 (5.5%)	15 (5.9%)	9 (3.5%)	12 (4.7%)	50 (19.5%)
Adults (25-64 years)	47 (18.4%)	63 (24.6%)	7 (2.7%)	25 (9.8%)	142 (55.5%)
Elderly (65 + years)	13 (5.1%)	12 (4.7%)	1 (0.4%)	4 (1.6%)	30 (11.7%)
Total	79 (30.9%)	103 (40.2%)	29 (11.3%)	45 (17.6%)	256 (100%)

DNA extraction

DNA was extracted from gargle samples with the DNeasy Powersoil Pro kit (QIAGEN) following the manufacturer's recommendations, in a Containment Level 2 (CL2) laboratory. DNA was quantified using a fluorometer (Qubit 4) using the Invitrogen™ Qubit™ 1X dsDNA Broad Range (BR) Assay Kit (ThermoFischer Scientific), with mean DNA concentrations of 6.14 ± 3.14 ng/μL (Supplementary Table 5). Samples were normalized in 10 mM Tris solution to a concentration at 5 ng/μL for further processing.

Library preparation and sequencing

Sequencing libraries of the V3-V4 regions of the 16S rRNA gene were prepared by 2-step PCR according to the Illumina protocol "16S Metagenomic Sequencing Library Preparation" [33]. Primers used for the first PCR were 341F (5'- TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG-3') and 805R (5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C-3'). The second PCR was prepared with the Nextera XT index Kit v2 (Illumina) [34]. Library size was checked

with a Qiaxcel Advanced system (QIAGEN) and confirmed at 550 bp. Libraries were quantified using a fluorometer (Fluoroskan) with the Quant-iT™ 1X dsDNA Assay Kits [35]. Libraries were sequenced on Illumina MiniSeq by paired-end 150 bp cycles. Four sequencing runs were performed on four 96-well plates, generating a total of 47,233,715 reads with a mean of $184,507 \pm 3,709$ per sample. Sequencing details and results are presented in Supplementary Table 6.

Sequence processing

All analyses were performed with R studio software environment (version 4.2.0)[36]. In order to perform the DNA amplicon sequencing analysis, the DADA2 pipeline was used [37]. Sequence trimming and alignment were done with the `filterAndTrim()` function of the `dada2` {} package (version 1.24.0). In the trimming step, retained strands were trimmed to a length of 115 bp (`truncLen=c(115,115)`), no sequences with more than 2 errors were retained (`maxEE=c(2,2)`) and after trimming, sequences with a quality of less than two were deleted (`truncQ=2`). This step was performed without removing the primers. Then, errors generated during sequencing were removed (`dada()`), reverse and forward sequences were merged (`mergePairs()`), a table with the obtained sequences was created (`makeSequenceTable()`), sequencing chimeras were eliminated (`removeBimeraDenovo()`), and taxonomy was assigned to the non-chimeric sequences using a reference database (`assignTaxonomy()`). All these functions were used from the `dada2` {} (version 1.24.0) [38]. Finally, a file to store the DNA sequences thanks to the `DNAStrngSet()` with the `Biostings`{} package version (2.64.1) was written [39]. Taxonomic assignment of amplicon sequence variants (ASVs) was performed with the SILVA SSU reference database (version r132_March2018). Finally, the `phyloseq()` function allowed to create a `phyloseq` file to facilitate the analysis and the visualization of the data [40]. For all these functions, the parameters have been defined by default. This produced a taxonomic table containing 20,206 ASVs, and samples contained an average of $69,949 \pm 28,555$ reads.

The taxonomic table was filtered using `DECONTAM`{} package (version 1.16.0) to remove contaminating sequences, which identifies contaminants based on the frequency distribution of each ASV as a function of input DNA concentration [41]. Using the `filter_taxa()` function, bacterial taxa that have an abundance greater than four

counts in at least 10% of the samples are retained, the others were removed [42]. The decontaminated taxonomic table contained an average of $68,284 \pm 28,015$ reads per sample. These sequences allowed the identification of 9,818 ASVs in a total of 256 samples. Multiple rarefaction curves were plotted to ensure that each sample reached saturation of taxa (Supplementary Figure 7).

Diversity analyses

The relative distribution of phyla was calculated and compared with a Mann-Whitney test (p -value < 0.05). Subsequently, linear regressions were performed on all phyla using the `lm()` function without multiple correction, to check whether the variables "age" and "sex" and two combined could influence the significant difference in distribution between the PT and NT groups.

Diversity analyses were also performed in R with the `phyloseq` package (version 1.40.0) [40] and the `plot_diversity_stats()` function of the `microbiomeutilities` package (version 1.0.16) [43]. Taxonomic richness was calculated with the observed and Shannon diversity indices and compared with a Mann-Whitney test (p -value < 0.05) between the PT and NT groups. A Breusch-Pagan test of homoscedasticity (p -value < 0.05) was performed using the `bp_test()` function from the `lmtest` package (version 0.9.40) and on R.

Community composition across positive test (PT) and negative test (NT) groups

Community composition was compared through the Bray-Curtis dissimilarity index and visualized in Non-metric Multidimensional Scaling (NMDS) using the `plot_ordination()` function of the `phyloseq` package (version 3.3.6). We tested for normality using the Shapiro test with `shapiro.test()`. Then the distribution of the NMDS data was compared with the Mann-Whitney test with `wilcox.test()` (p -value < 0.05). Analysis of similarity was performed by permutation test with the `adonis2()` function (p -value < 0.05) of the `vegan` package (version 2.6.2) [44]. The measure of the dispersion of the proportions within each sample group was performed by `betadisper()` function with `vegan` package (p -value < 0.05 ; version 2.6.2) [44]. Finally, we did permutations with the `permutest()` function of the `vegan` package (p -value < 0.05 ; version 2.6.2), which allows to see if there are significantly different distributions between the groups.

Abundance of specific taxa in the positive test (PT) and negative test (NT) groups

Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) was performed using `run_lefse()`, with the `microbiomeMarker` package (version 1.2.2) [45] to identify the microbial taxa that were features (biomarkers) of the PT and NT groups of participants. The significance threshold for the Kruskal-Wallis test was set with an alpha of 0.05, the significance threshold for the Wilcoxon test was set with an alpha of 0.05 and an LDA log score threshold of four. Taxa scoring higher than four are identified as features.

A heatmap was made to visualize the similarities and differences between the samples according to their taxonomic composition. The prevalence threshold was set to 0.1, which means that only those bacteria that were detected in at least 10% of the samples will be included. It was made using the `plot_core()` function of the `microbiome` package (version 1.18.0) [46]. A volcano plot was made to visualize differentially abundant taxa across the PT and NT groups, calculated using the `ancombc()` function of the `ANCOMBC` package (version 1.6.2) [47], with an alpha detection threshold of 0.01 and Bonferroni's correction for multiple comparisons.

5.5 Results

Firmicutes and Actinobacteriota dominate the OCO microbiome

For both the PT and NT groups, Firmicutes and Actinobacteriota were the most abundant phylum (with ranges of 56.84 - 72.48 % and 12.82 - 24.98 %, respectively), followed by Bacteroidota (3.47 - 8.84 %), Proteobacteria (1.05 - 7.54 %), Fusobacteriota (0.60 - 2.02 %) and Patescibacteria (0.27 - 1.16 %) (Figure 3).

The relative distribution of phyla varied between PT and NT groups. Following a Mann-Whitney test, a significant difference was observed in the abundance of Firmicutes (with a mean for PT = 62.68 and NT = 67.83, p -value = 0.004), Bacteroidota (with a mean for PT = 7.64 and NT = 5.11, p -value = $7e-04$), and Fusobacteriota (with a mean for PT = 2.04 and NT = 0.95, p -value = $7.87e-08$). Based on linear regression analyses, no significant difference was found in the distribution of phyla abundance between each subcategory within each group (age and sex, see Figures 9a and 9b).

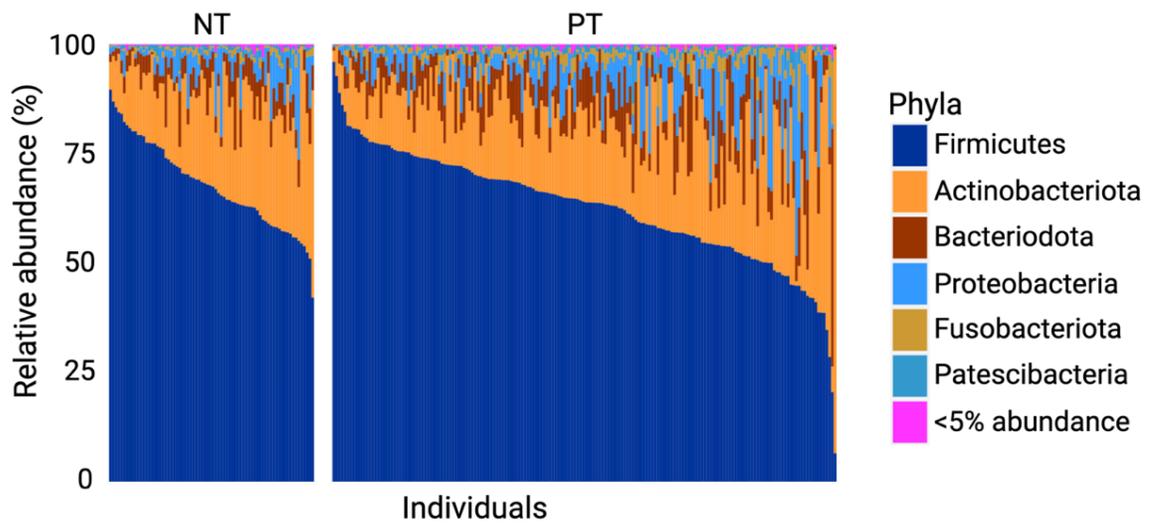


Figure 3. Relative abundance of phyla in samples of the positive test (PT) and negative test (NT) groups. Phyla accounting for less than 5% over all samples were grouped together in the “<5% abundance” group.

No significant difference in alpha diversity between PT and NT individuals

Alpha diversity indices were employed to compare the taxonomic richness between PT and NT groups. The results showed no significant difference in taxonomic richness between the two groups (Figure 4A). The mean taxonomic richness based on the observed species index was $1,257 \pm 510$ for the PT group and $1,235 \pm 400$ for the NT group. Similarly, for the Shannon index, the mean was 5.94 ± 0.48 for the PT group and 5.94 ± 0.32 for the NT group. The Wilcoxon test yielded a p-value > 0.05 for both the observed index and the Shannon index, indicating no significant difference between the two groups for either index (Figure 4A and Figure 4B).

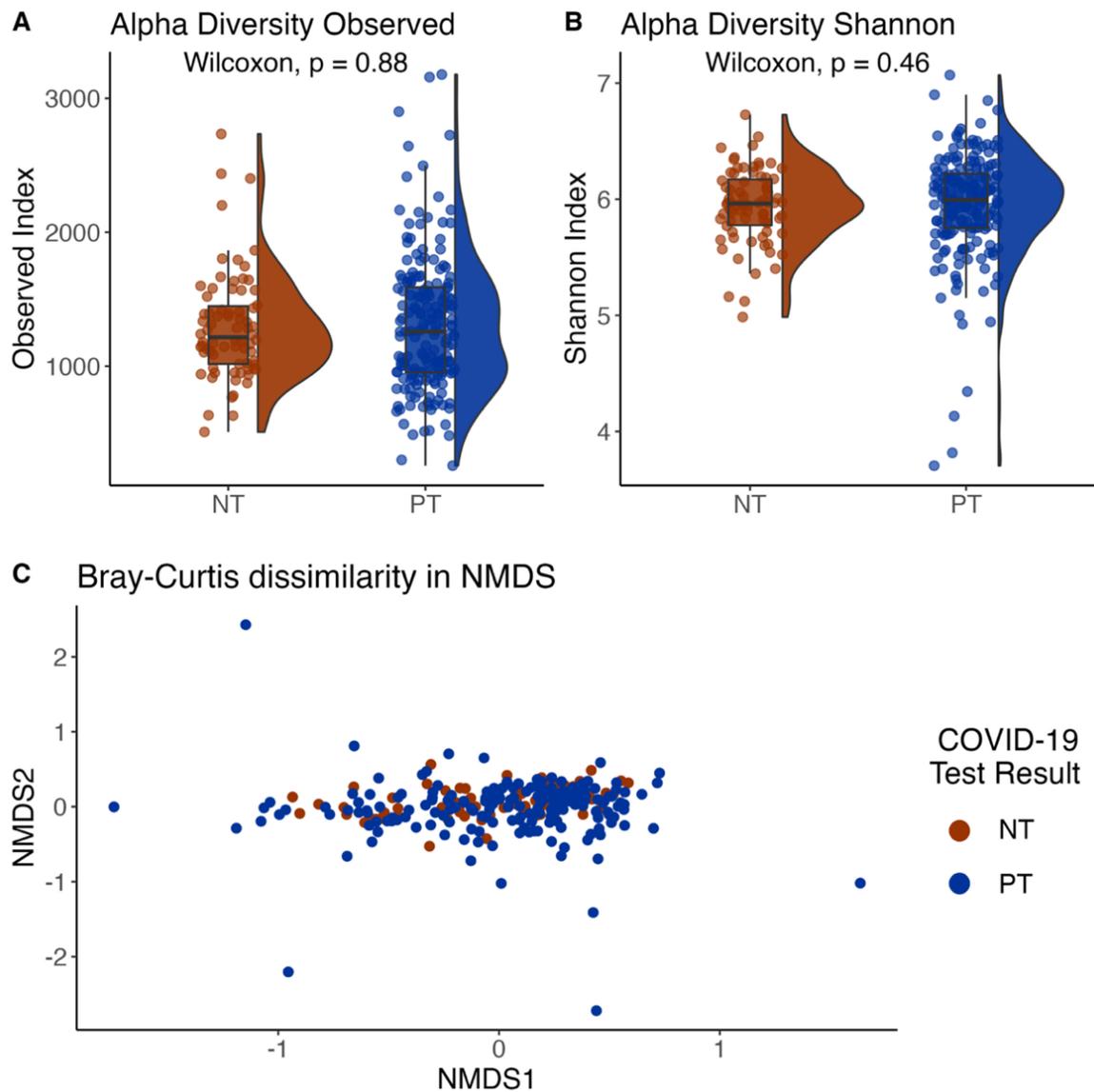


Figure 4. Taxonomic richness and bacterial community composition in samples of the positive test (PT) and negative test (NT) groups

(A) Observed and (B) Shannon diversity indices. Half-violine plots show the distribution of the calculated index across samples of PT and NT groups. Boxes show quartiles that represent the largest distribution of both sample groups, with the line showing the median. P-values reported are from Mann-Whitney tests, with “ns” showing non-significant differences (p -value > 0.05). (C) Community composition (beta diversity) calculated using Bray-Curtis dissimilarity index in non-metric multidimensional scaling (NMDS) space, for samples of the PT and NT groups.

Significant difference in beta diversity in bacterial communities in samples of the positive test (PT) and negative test (NT) groups

The nonmetric multidimensional scaling (NMDS) graph depicted from our two sample groups (Figure 4C) illustrates the dissimilarity among our samples. After analyzing the bacterial community structure of the OCO, the Bray-Curtis dissimilarity index was calculated. Subsequently, the beta diversity index was employed to compare the taxonomic richness between samples of the PT and NT groups. Given the Shapiro-Wilk test results (p-value = 2.749e-16), the Mann-Whitney test was used to compare richness between the groups. The results showed a significant difference in taxon richness among our samples between the PT and NT groups (Mann-Whitney test; p-value = 0.043).

The adonis2 test shows a variance difference in the taxonomic composition, indicating that the average dissimilarity of bacterial communities was not homogeneous between samples of the PT and NT groups. The screening test variable exhibited an R² of 2.7% (p-value < 0.001). Furthermore, the Betadisp index, computed from the Bray-Curtis index, showed a distance of 0.412 and 0.367 between the sample centroids for the PT and NT groups, respectively. The dispersion within each group shows a significant difference (p-value = 0.002).

***Prevotella* and *Veillonella* are features of OCO in COVID-19 patients.**

The LEfSe test highlights the bacterial genera most likely to significantly explain the differences between individuals of the PT and NT groups (Figure 5A).

In this study, the LEfSe test revealed a distinct variation in the relative distribution of genera between our samples from the PT and NT groups. Following a Mann-Whitney test, statistically significant differences were observed for *Prevotella* (mean for PT = 5.54 and NT = 3.27, p-value = 1.78e-5), *Veillonella* (mean for PT = 6.87 and NT = 4.58, p-value = 3.70e-05), *Streptococcus* (mean for PT = 49.73 and NT = 58.96, p-value = 1.38e-06) and *Actinomyces* (mean for PT = 5.08 and NT = 6.16, p-value = 8.72e-03). These findings indicate that *Prevotella* and *Veillonella* bacteria are features of the PT group, while *Streptococcus* and *Actinomyces* bacteria are characteristic of the NT group.

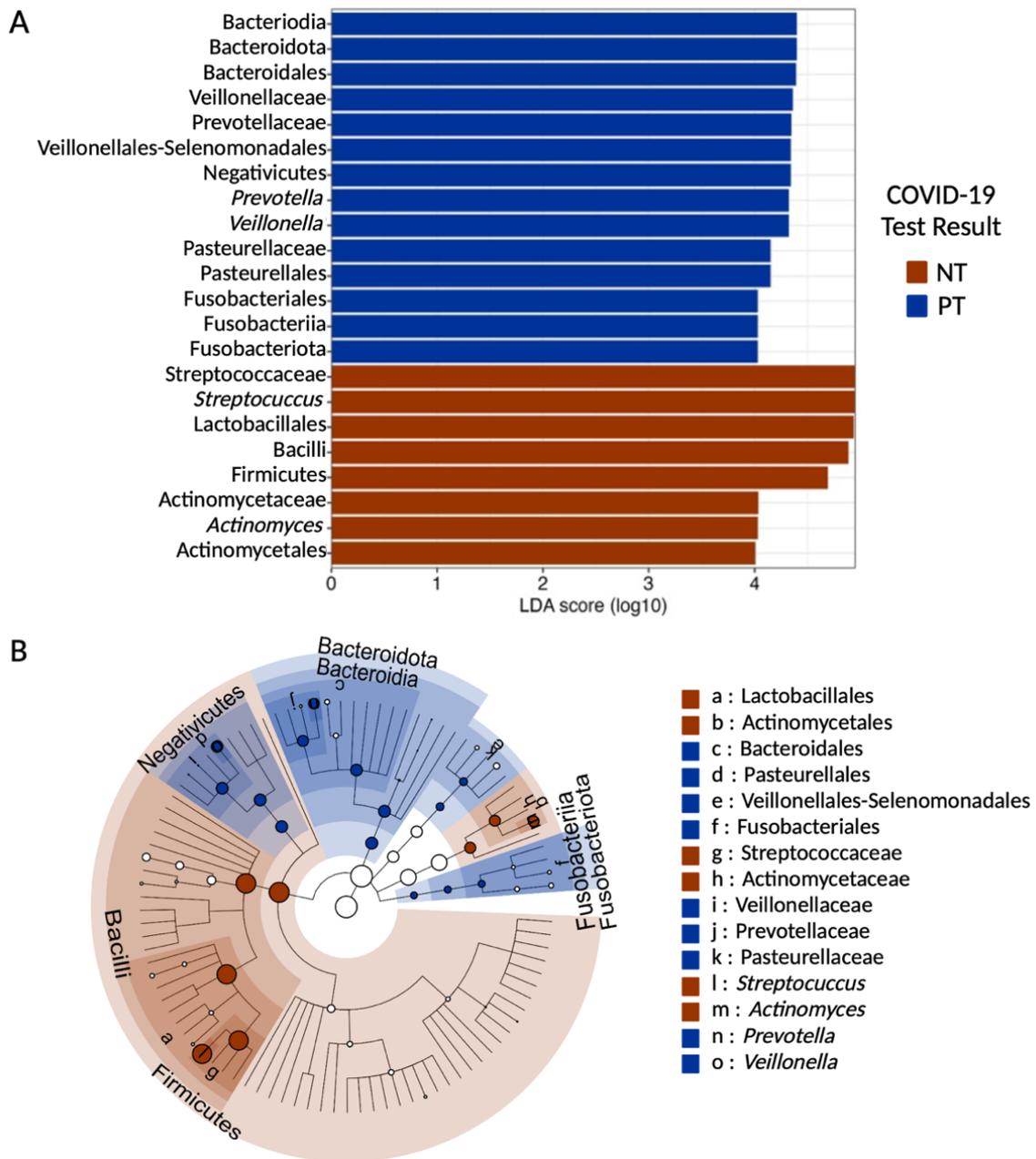


Figure 5. Linear discriminant analysis (LDA) score and cladogram of LEfSe biomarkers

(A) Linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) score (minimal score at 4, $P < 0.05$) for taxa identified as biomarkers of either samples of the PT or NT groups. **(B)** Cladogram showing the phylogeny of identified features. Concentric circles represent different taxonomic levels, with the outermost being genus. The nodes (red or blue) represent significantly different features identified as biomarkers. The diameter of each node is proportional to the abundance of the taxonomic rank in the group. Nodes in white are taxonomic ranks that are not significantly different but exhibit differential abundance.

Individuals with COVID-19 exhibit greater diversity within their core OCO microbiome

Of the 106 bacterial genera in the dataset, 38 were identified as part of the core microbiome, common in all samples from both the PT and NT groups. The relative taxonomic diversity between the two communities remained consistent, including Firmicutes, Actinobacteriota, Bacteroidota, Proteobacteria and Fusobacteriota, which were found in all samples but with variations in prevalence (Figure 10). The most abundant and widespread genera are, in order *Streptococcus*, *Rothia*, *Veillonella*, *Actinomyces*, *Prevotella*, *Gemella*, *Fusobacterium*, *Granulicatella* and *Porphyronomonas*, found across all samples (Figure 6). However, the prevalence of these genera differed between the two communities. Overall, samples from the PT group exhibited 74 prevalent taxa, while samples from the NT group showed 69 prevalent taxa, each at a relative abundance of 0.001%.

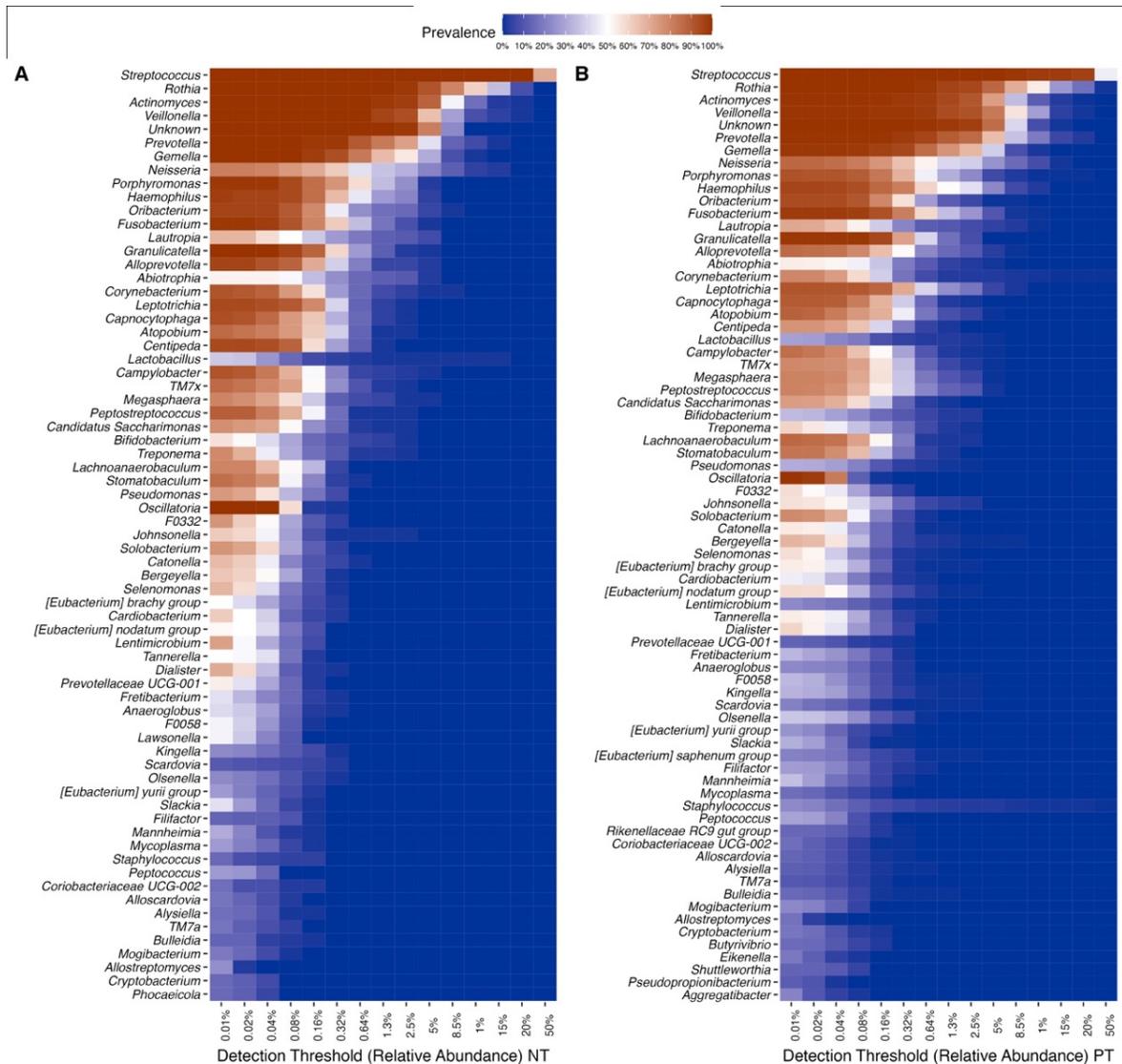


Figure 6. Heatmap of the most abundant genera

Core microbiome genera, shown through their prevalence across samples of the PT and NT groups (intensity of color) along a step-wise increase in the detection threshold (relative abundance) (x-axis).

COVID-19 infection status is associated with differentially abundant taxa

Differentially In this dataset 18 genera were identified as differentially abundant (after Bonferroni correction; p-value 0.01; Figure 7). There were 11 differentially abundant genera that were overrepresented in the PT group: *Lentimicrobium*, *Lawsonella*, *Pseudomonas*, *Centipeda*, *Prevotellaceae*, *Oscillatoria*, *F0332*, *Corynebacterium*, *Bifidobacterium*, *Anaeroglobus*. Meanwhile, 7 genera were significantly more abundant in the

NT group: *Aggregatibacters*, *Olsenellas*, *Filifactor*, *Staphylococcus*, *Eubacterium saphenum*, *Lachnoanaerobaculum*, *Kingella*.

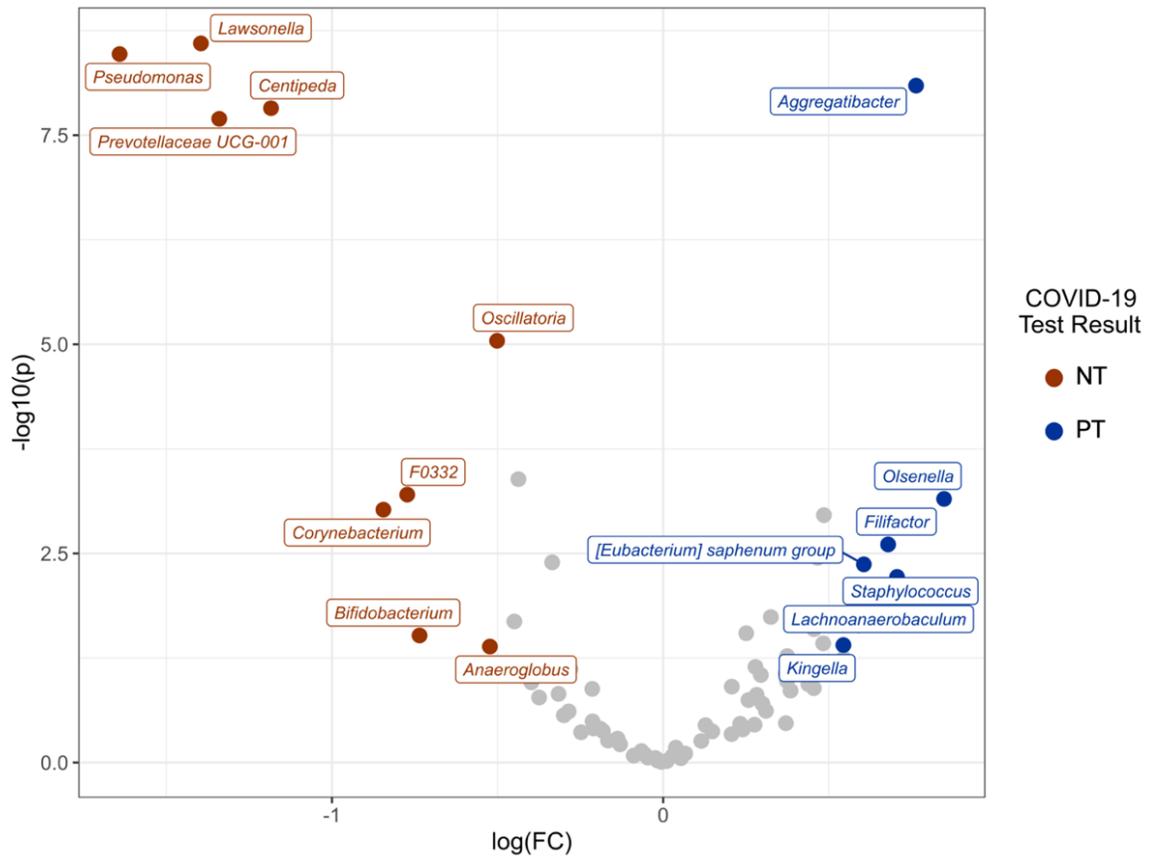


Figure 7. Differentially abundant genera between PT and NT

Volcano plot showing differentially expressed genera between PT and NT groups using the `ancombc()` function. Genera are colored if they pass the p - \log_{10} value threshold (p -value = 0.05) and an absolute \log fold change ≥ 0.05 . Those that are more abundant in bacterial communities from the PT group are shown in red, while those more abundant in bacterial communities from the NT group are displayed in blue ($P < 0.01$; after Bonferroni correction).

5.7 Discussion

The upper respiratory tract is the main entry point for the SARS-COV-2 virus. After entering the type II epithelial cells, the virus disrupts the homeostasis of the OCO microbiome through viral infection of host cells [48]. This disruption can potentially lead to inflammatory damage, an inadequate immune response, or reduce resilience to the development of COVID-19 [49]. To gain a better understanding of the biology of SARS-CoV-2

infection and its associated symptomatology, this study examined the bacterial communities of the upper respiratory tract and investigated their composition in individuals infected and uninfected with the SARS-CoV-2 alpha variant in the SLSJ region. Early studies conducted at the onset of the COVID-19 pandemic investigating OCO bacterial communities, did not reveal a significant difference between SARS-CoV-2 infected and uninfected individuals [50]. However, recent studies, including the present one, have demonstrated distinct bacterial communities [23,24,48]. In this study, alterations in microbial diversity and the presence of biomarkers in infected and uninfected individuals were observed, suggesting that the virus induces changes in bacterial homeostasis in the respiratory tract, or that certain microbiome assemblages may promote SARS-CoV-2 infection. While the direction of causality is difficult to identify, this study shows that there are interactions between viral respiratory infections and the OCO microbiome.

A notable strength of this study lies in the fact that the population sampled comes from the SLSJ region, which is geographically remote from the major cities, making it possible to control for variations in the microbiome due to environmental factors (e.g. lower diversity of circulating viruses) or significant cultural differences. Nevertheless, it is important to acknowledge certain limitations associated with the sample composition. Biases in sampling arose because most individuals who underwent COVID-19 testing were either symptomatic, suggesting a proportion of individuals may have tested negative to COVID-19, but may potentially have other unidentified infections. Consequently, interpreting the results was made more challenging by the fact that symptomatic individuals with negative tests might have experienced alterations in microbial diversity, due to another respiratory infection. Furthermore, the regular testing of people in the medical field resulted in an overrepresentation of adult and women in the sample.

The analyses of phylum abundance revealed that both SARS-CoV-2 infected or uninfected individuals shared the same dominant phyla, with Firmicutes being the most prevalent. Firmicutes encompasses a wide range of taxa in the human commensal flora and has been previously identified as the dominant phylum in both healthy individuals and those infected with COVID-19 in previous studies [7,51–53]. The other phyla identified

(from most to least abundant; Actinobacteriota, Bacteroidota, Proteobacteria, Fusobacteriota, and Patecibacteria) are also part of the commensal and the SARS-CoV-2 infected flora of the OCO [52–54]. Among these phyla, a significant decrease in the relative abundance of Firmicutes and a significant increase in Bacteroidota and Fusobacteriota were observed in infected individuals compared to uninfected ones. As these phyla are the most abundant in the OCO, the differences in their relative abundance in infected individuals suggest a state of dysbiosis, indicative of a disturbance in the commensal microbiome. This has been corroborated by other studies that have highlighted an infectious state and a decrease in Firmicutes (see review [55]). Additionally, among the genera belonging to the Firmicutes and Bacteroidota phyla, three were found to exhibit significant differences in their relative abundance and were identified as features of the SARS-CoV-2 infected OCO microbiome. No biomarkers were identified for the phylum Fusobacteriota. However, bacterial genera of this phylum have been shown to produce compounds such as hydrogen sulfide and methyl mercaptan, which, in high concentrations, induce inflammation [56]. Another study shows a negative correlation between the taxon *F. periodonticum* and the severity of COVID-19 symptoms [57], indicating the potential importance of this phylum in the immune and inflammatory responses associated with COVID-19 infection.

Despite the decrease in the abundance of the Firmicutes phylum in infected individuals, the genera *Veillonella* and *Prevotella* genera showed a significant increase in infected individuals and were identified as features for SARS-CoV-2 infection. Both genera are known for their production of LPS [24,25]. LPS, present on the outer membrane of Gram-negative bacteria, can have pro-inflammatory effects on the host immune system and induce systemic inflammation if they are predominant in microbiome [58,59]. Prior studies have demonstrated correlations between *Veillonella* and *Prevotella* abundances and the severity of COVID-19 symptoms [24,55,60–62]. Additionally, individual taxa belonging to these genera, such as *V. parvula*, *V. dispar*, *V. infantium*, *P. enoeca* and *P. melaninogenica*, were significantly enriched in the OCO microbiome of individuals infected with SARS-CoV-2 and experiencing prolonged symptoms or co-infection with influenza, which can lead to pneumonia [24,63–65]. As this study utilized 16S rRNA gene sequencing, which provides information down to the bacterial genus level, specific validation of these results regarding taxa abundance in this sample was not

possible. However, the strength of this amplicon-based sequencing method is its ability to screen large populations in a cost-effective manner. The results from the present dataset of 256 individuals strengthens observations made on *Prevotella* and *Veillonella*, underscore their contribution in maintaining the commensal OCO microbiome, and suggest they may play a critical role in inflammation in the upper airways.

The third genus identified as a feature was *Streptococcus* (Firmicutes phylum), which served as a biomarker for uninfected individuals. In this study, a significantly higher proportion of *Streptococcus* was observed in uninfected individuals, contributing to the overall increase observed for this phylum. *Streptococcus* is the most abundant genus in the upper respiratory tract and plays a crucial role in maintaining the homeostasis of the oral microbiome [66]. Microbiomes with a greater abundance of *Streptococcus* and more specifically of *S. parasanguinis* tended to be more stable and resistant to co-infections or secondary infections, significantly correlating with mild or moderate forms of COVID-19 [63,67]. The depletion of specific *Streptococcus* taxa could indicate a state of dysbiosis of the OCO microbiome, possible resulting from the overgrowth of other bacteria or an intense immune response [65,68]. This could also potentially be due to direct competitive processes within the OCO microbiome, as observed by the anti-*Streptococcus* effect of host lipids cleaved by *Corynebacterium* [69]. Co-infection with another *Streptococcus* taxa, *S. pneumoniae*, has been found to be one of the most common occurrences following SARS-CoV-2 infection, affecting up to 79% of individuals admitted to the hospital and leading to pneumonia [63,70–73]. While the functional interactions between *Streptococcus* and SARS-CoV-2 infection could not be assessed from this present amplicon-based analysis, this genus may be an interesting target to develop COVID-19 sensitivity screenings, and to better understand the ecological interactions within the OCO microbiome during infection.

The analyses further identified other possible biomarkers from the aforementioned three phyla. The genus *Actinomyces* was found to be a feature uninfected individual. While certain *Actinomyces* taxa were associated with mild or moderate forms of COVID-19, a decrease in their abundance was observed in severely affected individuals, and they were also negatively correlated with inflammatory biomarkers like C-reactive

protein [67,74]. On the other hand, the Pasteurellales family and Fusobacteriales order were identified as biomarkers for COVID-19 infection, although no specific genus within these taxa showed significant differences. Nonetheless, genera belonging to these taxa have been found significantly increased in cases of co-infection with SARS-CoV-2 [70,75–77].

Consistent with previous findings, the results of this study reveal that taxonomic diversity varies in infected individuals compared to uninfected individuals [63,78]. While there was no statistical difference in taxonomic richness between both groups, there were significant differences in community composition, indicating that 2.7% of the variance in taxonomic assemblages of the OCO microbiome was influenced by individuals' infection status. Given the complexity of the OCO environment and the multitude of variables that could not be included in the analysis (tobacco use, air quality, etc.), this value still represents a significant proportion of the communities. Indeed, in comparison, beta diversity differences in the OCO microbiome for other infectious diseases typically fall below 1% [79,80].

The bacterial communities of infected individuals exhibited greater taxonomic diversity in terms of alpha diversity and infected samples were more dispersed when visualized in NMDS space. The conventional notion suggests that a healthy microbiome should be characterized by diversity to enhance resilience against disturbances [81,82]. However, stochastic processes that shape bacterial communities can lead to higher diversity than that of a healthy microbiome [63,83]. This observation is further supported by the differential abundance of microbial genera known as opportunistic airway pathogens. Specifically, *Pseudomonas* and *Corynebacterium* were more abundant in the infected individuals, consistent with findings from previous studies [84,85]. These genera are associated with secondary infections in the context of SARS-CoV-2 infection [84–86]. It is essential to note that no causality can be inferred from these observed associations, and they may be influenced by unmeasured confounding factors.

In conclusion, this study presents the composition and diversity of the OCO microbiome of infected and uninfected individuals with SARS-CoV-2 from the SLSJ region in Canada. The results showed that the OCO microbiome of infected individuals have a different taxonomic composition and diversity suggestive of dysbiosis, or of increased sensitivity of certain microbiomes to infection. Additionally, four genera have been identified as possible biomarkers for SARS-CoV-2 infection (*Prevotella* and *Veillonella*) and two for absence of SARS-CoV-2 infection (*Streptococcus* and *Actinomyces*). This study could help to highlight and understand the relationship between the microbiome of the respiratory tract and health in the context of a new pandemic.

5.8 Conclusions

The results of the present study, show that the OCO microbiome of infected individuals exhibits a distinct taxonomic composition and community assembly, suggesting dysbiosis. Microbial features such as those identified in this study can be used as biomarkers to implement preventive measures, such as specialized pre/probiotics (for *Streptococcus*), or to identify the most vulnerable individuals in order to apply appropriate treatments (*Veillonella*).

5.9 References

1. World Health Organization Coronavirus Disease (COVID-19) Pandemic 2022.
2. World Health Organization WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard 2022.
3. Sun, P.; Lu, X.; Xu, C.; Sun, W.; Pan, B. Understanding of COVID-19 Based on Current Evidence. *J. Med. Virol.* 2020, 92, 548–551.
4. Lopez-Leon, S.; Wegman-Ostrosky, T.; Perelman, C.; Sepulveda, R.; Rebolledo, P.A.; Cuapio, A.; Villapol, S. More than 50 Long-Term Effects of COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci. Rep.* 2021, 11, 16144.
5. Gavriatopoulou, M.; Ntanasis-Stathopoulos, I.; Korompoki, E.; Fotiou, D.; Migkou, M.; Tzanninis, I.-G.; Psaltopoulou, T.; Kastritis, E.; Terpos, E.; Dimopoulos, M.A. Emerging Treatment Strategies for COVID-19 Infection. *Clin. Exp. Med.* 2021, 21, 167–179.
6. Brown, R.L.; Sequeira, R.P.; Clarke, T.B. The Microbiota Protects against Respiratory Infection via GM-CSF Signaling. *Nat. Commun.* 2017, 8, 1–11.
7. Man, W.H.; de Steenhuijsen Pipers, W.A.A.; Bogaert, D. The Microbiota of the Respiratory Tract: Gatekeeper to Respiratory Health. *Nat. Rev. Microbiol.* 2017, 15, 259–270, doi:10.1038/nrmicro.2017.14.
8. Gollwitzer, E.S.; Saglani, S.; Trompette, A.; Yadava, K.; Sherburn, R.; McCoy, K.D.; Nicod, L.P.; Lloyd, C.M.; Marsland, B.J. Lung Microbiota Promotes Tolerance to Allergens in Neonates via PD-L1. *Nat. Med.* 2014, 20, 642–647.
9. Porto, B.N.; Moraes, T.J. The Triad: Respiratory Microbiome–Virus–Immune Response in the Pathophysiology of Pulmonary Viral Infections. *Expert Rev. Respir. Med.* 2021, 15, 635–648.
10. Ichinohe, T.; Pang, I.K.; Kumamoto, Y.; Peaper, D.R.; Ho, J.H.; Murray, T.S.; Iwasaki, A. Microbiota Regulates Immune Defense against Respiratory Tract Influenza A Virus Infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011, 108, 5354–5359.
11. Ma, S.; Zhang, F.; Zhou, F.; Li, H.; Ge, W.; Gan, R.; Nie, H.; Li, B.; Wang, Y.; Wu, M. Metagenomic Analysis Reveals Oropharyngeal Microbiota Alterations in Patients with COVID-19. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2021, 6, 1–11.

12. Molyneaux, P.L.; Cox, M.J.; Willis-Owen, S.A.G.; Mallia, P.; Russell, K.E.; Russell, A.-M.; Murphy, E.; Johnston, S.L.; Schwartz, D.A.; Wells, A.U.; et al. The Role of Bacteria in the Pathogenesis and Progression of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2014, 190, 906–913, doi:10.1164/rccm.201403-0541OC.
13. de Steenhuijsen Pijters, W.A.A.; Sanders, E.A.M.; Bogaert, D. The Role of the Local Microbial Ecosystem in Respiratory Health and Disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2015, 370, 20140294, doi:10.1098/rstb.2014.0294.
14. Pichon, M.; Lina, B.; Josset, L. Impact of the Respiratory Microbiome on Host Responses to Respiratory Viral Infection. *Vaccines* 2017, 5, 40.
15. Wypych, T.P.; Wickramasinghe, L.C.; Marsland, B.J. The Influence of the Microbiome on Respiratory Health. *Nat. Immunol.* 2019, 20, 1279–1290.
16. Shahbazi, R.; Yasavoli-Sharahi, H.; Alsadi, N.; Ismail, N.; Matar, C. Probiotics in Treatment of Viral Respiratory Infections and Neuroinflammatory Disorders. *Molecules* 2020, 25, 4891.
17. Sudo, N.; Yu, X.; Aiba, Y.; Oyama, N.; Sonoda, J.; Koga, Y.; Kubo, C. An Oral Introduction of Intestinal Bacteria Prevents the Development of a Long-term Th2-skewed Immunological Memory Induced by Neonatal Antibiotic Treatment in Mice. *Clin. Exp. Allergy* 2002, 32, 1112–1116.
18. Rinninella, E.; Raoul, P.; Cintoni, M.; Franceschi, F.; Miggiano, G.A.D.; Gasbarrini, A.; Mele, M.C. What Is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* 2019, 7, 14.
19. Jia, Y.; He, T.; Wu, D.; Tong, J.; Zhu, J.; Li, Z.; Dong, J. The Treatment of Qibai Pingfei Capsule on Chronic Obstructive Pulmonary Disease May Be Mediated by Th17/Treg Balance and Gut-Lung Axis Microbiota. *J. Transl. Med.* 2022, 20, 1–21.
20. Alharris, E.; Mohammed, A.; Alghetaa, H.; Zhou, J.; Nagarkatti, M.; Nagarkatti, P. The Ability of Resveratrol to Attenuate Ovalbumin-Mediated Allergic Asthma Is Associated with Changes in Microbiota Involving the Gut-Lung Axis, Enhanced Barrier Function and Decreased Inflammation in the Lungs. *Front. Immunol.* 2022, 13, 805770.

21. Yuksel, N.; Gelmez, B.; Yildiz-Pekoz, A. Lung Microbiota: Its Relationship to Respiratory System Diseases and Approaches for Lung-Targeted Probiotic Bacteria Delivery. *Mol. Pharm.* 2023.
22. Bassis, C.M.; Erb-Downward, J.R.; Dickson, R.P.; Freeman, C.M.; Schmidt, T.M.; Young, V.B.; Beck, J.M.; Curtis, J.L.; Huffnagle, G.B. Analysis of the Upper Respiratory Tract Microbiotas as the Source of the Lung and Gastric Microbiotas in Healthy Individuals. *MBio* 2015, 6, e00037-15.
23. Merenstein, C.; Liang, G.; Whiteside, S.A.; Cobián-Güemes, A.G.; Merlino, M.S.; Taylor, L.J.; Glascock, A.; Bittinger, K.; Tanes, C.; Graham-Wooten, J. Signatures of COVID-19 Severity and Immune Response in the Respiratory Tract Microbiome. *MBio* 2021, 12, e01777-21.
24. Haran, J.P.; Bradley, E.; Zeamer, A.L.; Cincotta, L.; Salive, M.-C.; Dutta, P.; Mutaawe, S.; Anya, O.; Meza-Segura, M.; Moormann, A.M. Inflammation-Type Dysbiosis of the Oral Microbiome Associates with the Duration of COVID-19 Symptoms and Long COVID. *JCI Insight* 2021, 6.
25. Bradley, E.S.; Zeamer, A.L.; Bucci, V.; Cincotta, L.; Salive, M.-C.; Dutta, P.; Mutaawe, S.; Anya, O.; Tocci, C.; Moormann, A. Oropharyngeal Microbiome Profiled at Admission Is Predictive of the Need for Respiratory Support Among COVID-19 Patients. *medRxiv* 2022.
26. Bchetnia, M.; Bouchard, L.; Mathieu, J.; Campeau, P.M.; Morin, C.; Brisson, D.; Laberge, A.-M.; Vézina, H.; Gaudet, D.; Laprise, C. Genetic Burden Linked to Founder Effects in Saguenay–Lac-Saint-Jean Illustrates the Importance of Genetic Screening Test Availability. *J. Med. Genet.* 2021, 58, 653–665.
27. Shifman, S.; Darvasi, A. The Value of Isolated Populations. *Nat. Genet.* 2001, 28, 309–310.
28. Chen, Z.; Azman, A.S.; Chen, X.; Zou, J.; Tian, Y.; Sun, R.; Xu, X.; Wu, Y.; Lu, W.; Ge, S. Global Landscape of SARS-CoV-2 Genomic Surveillance and Data Sharing. *Nat. Genet.* 2022, 54, 499–507.
29. CIUSSSMCQ Méthode de Prélèvement Par Gargarisme Pour Le Diagnostic de La COVID-19 2021.
30. Tremblay K; Rousseau S The Biobanque Québécoise de La COVID-19 (BQC19)—A Cohort to Prospectively Study the Clinical and Biological Determinants of COVID-19 Clinical Trajectories. *PLoS One* 2021.
31. Gouvernement du Canada Santé Canada.
32. ThermoFischer Scientific Qubit™ 1X DsDNA High Sensitivity (HS) and Broad Range (BR) Assay Kits.

33. Ciceri, F.; Castagna, A.; Rovere-Querini, P.; De Cobelli, F.; Ruggeri, A.; Galli, L.; Conte, C.; De Lorenzo, R.; Poli, A.; Ambrosio, A. Early Predictors of Clinical Outcomes of COVID-19 Outbreak in Milan, Italy. *Clin. Immunol.* 2020, 217, 108509.
34. Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation.
35. Invitrogen Quant-IT™ 1X DsDNA HS Assay Kit.
36. Allaire, J. RStudio: Integrated Development Environment for R. *Boston MA* 2012, 770, 165–171.
37. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.A.; Holmes, S.P. DADA2: High-Resolution Sample Inference from Illumina Amplicon Data. *Nat. Methods* 2016, 13, 581–583, doi:10.1038/nmeth.3869.
38. Callahan, B.; McMurdie, P.; Holmes, S.; Biostrings, I.; BiocStyle, S.; Rcpp, L.; biocViews ImmunoOncology, M. Package ‘Dada2.’ Accurate High-Resolut. Sample Inference Amplicon Seq. Data 2018.
39. Pages, H.; Aboyoun, P.; Gentleman, R.; DebRoy, S.; Pages, M.H.; DataImport, D.; BSgenome, S.; XStringSet-class, R.; MaskedXString-class, R.; XStringSet-io, R. Package ‘Biostrings.’ *Bioconductor* 2013, 18129.
40. McMurdie, P.J.; Holmes, S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 2013, 8, e61217.
41. 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* 2018, 6, 226, doi:10.1186/s40168-018-0605-2.
42. McMurdie, P.J.; Holmes, S. Basic Storage, Access, and Manipulation of Phylogenetic Sequencing Data with Phyloseq. 2013.
43. Shetty, S.A.; Lahti, L.; de Vos, W.M.; Smidt, H. Microbiomeutilities: An R Package for Utilities to Guide in-Depth Marker Gene Amplicon Data Analysis. *Ecophysiol. Insights Hum. Intest. Microbiota Single Strains Defin. Consortia* 2018, 95.

44. Oksanen, J.; Kindt, R.; Legendre, P.; O'Hara, B.; Stevens, M.H.H.; Oksanen, M.J.; Suggests, M. The Vegan Package. *Community Ecol. Package* 2007, 10, 719.
45. Cao, Y.; Dong, Q.; Wang, D.; Zhang, P.; Liu, Y.; Niu, C. MicrobiomeMarker: An R/Bioconductor Package for Microbiome Marker Identification and Visualization. *Bioinformatics* 2022, 38, 4027–4029.
46. Barnett, D.J.; Arts, I.C.; Penders, J. MicroViz: An R Package for Microbiome Data Visualization and Statistics. *J. Open Source Softw.* 2021, 6, 3201.
47. Lin, H.; Peddada, S.D.; Lin, M.H. Package 'ANCOMBC.' 2021.
48. Wu, Y.; Cheng, X.; Jiang, G.; Tang, H.; Ming, S.; Tang, L.; Lu, J.; Guo, C.; Shan, H.; Huang, X. Altered Oral and Gut Microbiota and Its Association with SARS-CoV-2 Viral Load in COVID-19 Patients during Hospitalization. *Npj Biofilms Microbiomes* 2021, 7, 61.
49. Long, Q.-X.; Liu, B.-Z.; Deng, H.-J.; Wu, G.-C.; Deng, K.; Chen, Y.-K.; Liao, P.; Qiu, J.-F.; Lin, Y.; Cai, X.-F. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients with COVID-19. *Nat. Med.* 2020, 26, 845–848.
50. De Maio, F.; Posteraro, B.; Ponziani, F.R.; Cattani, P.; Gasbarrini, A.; Sanguinetti, M. Nasopharyngeal Microbiota Profiling of SARS-CoV-2 Infected Patients. *Biol. Proced. Online* 2020, 22, 18–18, doi:10.1186/s12575-020-00131-7.
51. Dickson, R.P.; Erb-Downward, J.R.; Martinez, F.J.; Huffnagle, G.B. The Microbiome and the Respiratory Tract. *Annu. Rev. Physiol.* 2016, 78, 481–504.
52. Rattanaburi, S.; Sawaswong, V.; Chitcharoen, S.; Sivapornnukul, P.; Nimsamer, P.; Suntronwong, N.; Puenpa, J.; Poo-vorawan, Y.; Payungporn, S. Bacterial Microbiota in Upper Respiratory Tract of COVID-19 and Influenza Patients. *Exp. Biol. Med.* 2022, 247, 409–415.
53. Bingula, R.; Filaire, M.; Radosevic-Robin, N.; Bey, M.; Berthon, J.-Y.; Bernalier-Donadille, A.; Vasson, M.-P.; Filaire, E. Desired Turbulence? Gut-Lung Axis, Immunity, and Lung Cancer. *J. Oncol.* 2017, 2017.
54. Lemon, K.P.; Klepac-Ceraj, V.; Schiffer, H.K.; Brodie, E.L.; Lynch, S.V.; Kolter, R. Comparative Analyses of the Bacterial Microbiota of the Human Nostril and Oropharynx. *MBio* 2010, 1, e00129-10.
55. Woodall, C.A.; McGeoch, L.J.; Hay, A.D.; Hammond, A. Respiratory Tract Infections and Gut Microbiome Modifications: A Systematic Review. *Plos One* 2022, 17, e0262057.

56. Chattopadhyay, I.; Verma, M.; Panda, M. Role of Oral Microbiome Signatures in Diagnosis and Prognosis of Oral Cancer. *Technol. Cancer Res. Treat.* 2019, 18, 1533033819867354–1533033819867354, doi:10.1177/1533033819867354.
57. Nardelli, C.; Gentile, I.; Setaro, M.; Di Domenico, C.; Pinchera, B.; Buonomo, A.R.; Zappulo, E.; Scotto, R.; Scaglione, G.L.; Castaldo, G. Nasopharyngeal Microbiome Signature in COVID-19 Positive Patients: Can We Definitely Get a Role to *Fusobacterium Periodonticum*? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021, 11, 625581.
58. Teixeira, P.C.; Dorneles, G.P.; Santana Filho, P.C.; da Silva, I.M.; Schipper, L.L.; Postiga, I.A.; Neves, C.A.M.; Junior, L.C.R.; Peres, A.; de Souto, J.T. Increased LPS Levels Coexist with Systemic Inflammation and Result in Monocyte Activation in Severe COVID-19 Patients. *Int. Immunopharmacol.* 2021, 100, 108125.
59. Bayston, K.F.; Cohen, J. Bacterial Endotoxin and Current Concepts in the Diagnosis and Treatment of Endotoxaemia. *J. Med. Microbiol.* 1990, 31, 73–83.
60. Hernández-Terán, A.; Mejía-Nepomuceno, F.; Herrera, M.T.; Barreto, O.; García, E.; Castillejos, M.; Boukadida, C.; Matias-Florentino, M.; Rincón-Rubio, A.; Avila-Rios, S. Dysbiosis and Structural Disruption of the Respiratory Microbiota in COVID-19 Patients with Severe and Fatal Outcomes. *Sci. Rep.* 2021, 11, 21297.
61. Ventero, M.P.; Cuadrat, R.R.; Vidal, I.; Andrade, B.G.; Molina-Pardines, C.; Haro-Moreno, J.M.; Coutinho, F.H.; Merino, E.; Regitano, L.C.; Silveira, C.B. Nasopharyngeal Microbial Communities of Patients Infected with SARS-CoV-2 That Developed COVID-19. *Front. Microbiol.* 2021, 560.
62. Rosas-Salazar, C.; Kimura, K.S.; Shilts, M.H.; Strickland, B.A.; Freeman, M.H.; Wessinger, B.C.; Gupta, V.; Brown, H.M.; Rajagopala, S.V.; Turner, J.H. SARS-CoV-2 Infection and Viral Load Are Associated with the Upper Respiratory Tract Microbiome. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2021, 147, 1226–1233.
63. Ren, L.; Wang, Y.; Zhong, J.; Li, X.; Xiao, Y.; Li, J.; Yang, J.; Fan, G.; Guo, L.; Shen, Z. Dynamics of the Upper Respiratory Tract Microbiota and Its Association with Mortality in COVID-19. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2021, 204, 1379–1390.

64. Soffritti, I.; D'Accolti, M.; Fabbri, C.; Passaro, A.; Manfredini, R.; Zuliani, G.; Libanore, M.; Franchi, M.; Contini, C.; Caselli, E. Oral Microbiome Dysbiosis Is Associated with Symptoms Severity and Local Immune/Inflammatory Response in COVID-19 Patients: A Cross-Sectional Study. *Front. Microbiol.* 2021, 12, 687513.
65. Hanada, S.; Pirzadeh, M.; Carver, K.Y.; Deng, J.C. Respiratory Viral Infection-Induced Microbiome Alterations and Secondary Bacterial Pneumonia. *Front. Immunol.* 2018, 9, 2640.
66. Abranches, J.; Zeng, L.; Kajfasz, J.K.; Palmer, S.; Chakraborty, B.; Wen, Z.; Richards, V.P.; Brady, L.J.; Lemos, J.A. Biology of Oral Streptococci. *Microbiol. Spectr.* 2018, 6, 6–5.
67. Shen, Y.; Yu, F.; Zhang, D.; Zou, Q.; Xie, M.; Chen, X.; Yuan, L.; Lou, B.; Xie, G.; Wang, R. Dynamic Alterations in the Respiratory Tract Microbiota of Patients with COVID-19 and Its Association with Microbiota in the Gut. *Adv. Sci.* 2022, 9, 2200956.
68. Dickson, R.P.; Huffnagle, G.B. The Lung Microbiome: New Principles for Respiratory Bacteriology in Health and Disease. *PLoS Pathog.* 2015, 11, e1004923.
69. Horn, K.J.; Jaber Vivar, A.C.; Arenas, V.; Andani, S.; Janoff, E.N.; Clark, S.E. *Corynebacterium* Species Inhibit *Streptococcus pneumoniae* Colonization and Infection of the Mouse Airway. *Front. Microbiol.* 2022, 12, 804935.
70. Wolff, L.; Martiny, D.; Deyi, V.Y.M.; Maillart, E.; Clevenbergh, P.; Dauby, N. COVID-19–Associated *Fusobacterium nucleatum* Bacteremia, Belgium. *Emerg. Infect. Dis.* 2021, 27, 975.
71. Westblade, L.F.; Simon, M.S.; Satlin, M.J. Bacterial Coinfections in Coronavirus Disease 2019. *Trends Microbiol.* 2021, 29, 930–941.
72. Mostafa, H.H.; Fissel, J.A.; Fanelli, B.; Bergman, Y.; Gniazdowski, V.; Dadlani, M.; Carroll, K.C.; Colwell, R.R.; Simner, P.J. Metagenomic Next-Generation Sequencing of Nasopharyngeal Specimens Collected from Confirmed and Suspect COVID-19 Patients. *MBio* 2020, 11, e01969-20.
73. Dubourg, G.; Yacouba, A.; Bossi, V.; Raoult, D.; Lagier, J.-C. Profile of the Nasopharyngeal Microbiota Affecting the Clinical Course in COVID-19 Patients. *Front. Microbiol.* 2022, 13.

74. Chen, J.; Liu, X.; Liu, W.; Yang, C.; Jia, R.; Ke, Y.; Guo, J.; Jia, L.; Wang, C.; Chen, Y. Comparison of the Respiratory Tract Microbiome in Hospitalized COVID-19 Patients with Different Disease Severity. *J. Med. Virol.* 2022, 94, 5284–5293.
75. Bao, L.; Zhang, C.; Lyu, J.; Yan, C.; Cao, R.; Pan, M.; Li, Y. Beware of Pharyngeal *Fusobacterium Nucleatum* in COVID-19. *BMC Microbiol.* 2021, 21, 1–12.
76. Budhraja, A.; Basu, A.; Gheware, A.; Abhilash, D.; Rajagopala, S.; Pakala, S.; Sumit, M.; Ray, A.; Subramaniam, A.; Mathur, P. Molecular Signature of Postmortem Lung Tissue from COVID-19 Patients Suggests Distinct Trajectories Driving Mortality. *Dis. Model. Mech.* 2022, 15, dmm049572.
77. Cabras, O.; Turmel, J.-M.; Olive, C.; Bigeard, B.; Lehoux, M.; Pierre-Francois, S.; Guitteaud, K.; Abel, S.; Cuzin, L.; Cabié, A. COVID-19 and *Pasteurella Multocida* Pulmonary Coinfection: A Case Series. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2022, 7, 429.
78. Shilts, M.H.; Rosas-Salazar, C.; Strickland, B.A.; Kimura, K.S.; Asad, M.; Sehanobish, E.; Freeman, M.H.; Wessinger, B.C.; Gupta, V.; Brown, H.M. Severe COVID-19 Is Associated with an Altered Upper Respiratory Tract Microbiome. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022, 1436.
79. Li, Y.; Liu, J.; Zhu, Y.; Peng, C.; Dong, Y.; Liu, L.; He, Y.; Lu, G.; Zheng, Y. Alterations of Oral Microbiota in Chinese Children with Viral Encephalitis and/or Viral Meningitis. *J. Microbiol.* 2022, 60, 429–437.
80. Zhang, Y.; D'Souza, G.; Fakhry, C.; Bigelow, E.O.; Usyk, M.; Burk, R.D.; Zhao, N. Oral Human Papillomavirus Associated With Differences in Oral Microbiota Beta Diversity and Microbiota Abundance. *J. Infect. Dis.* 2022, 226, 1098–1108.
81. Deng, F.; Li, Y.; Zhao, J. The Gut Microbiome of Healthy Long-Living People. *Aging* 2019, 11, 289.
82. Santoro, A.; Ostan, R.; Candela, M.; Biagi, E.; Brigidi, P.; Capri, M.; Franceschi, C. Gut Microbiota Changes in the Extreme Decades of Human Life: A Focus on Centenarians. *Cell. Mol. Life Sci.* 2018, 75, 129–148.
83. Zaneveld, J.R.; McMinds, R.; Vega Thurber, R. Stress and Stability: Applying the Anna Karenina Principle to Animal Microbiomes. *Nat. Microbiol.* 2017, 2, 1–8.

84. Merenstein, C.; Bushman, F.D.; Collman, R.G. Alterations in the Respiratory Tract Microbiome in COVID-19: Current Observations and Potential Significance. *Microbiome* 2022, 10, 1–14.
85. Garcia-Vidal, C.; Sanjuan, G.; Moreno-García, E.; Puerta-Alcalde, P.; Garcia-Pouton, N.; Chumbita, M.; Fernandez-Pittol, M.; Pitart, C.; Inciarte, A.; Bodro, M. Incidence of Co-Infections and Superinfections in Hospitalized Patients with COVID-19: A Retrospective Cohort Study. *Clin. Microbiol. Infect.* 2021, 27, 83–88.
86. Marino, A.; Campanella, E.; Stracquadiano, S.; Ceccarelli, M.; Zagami, A.; Nunnari, G.; Cacopardo, B. *Corynebacterium Striatum* Bacteremia during SARS-CoV2 Infection: Case Report, Literature Review, and Clinical Considerations. *Infect. Dis. Rep.* 2022, 14, 383–390.

DISCUSSION

Ce projet de maîtrise avait pour but de documenter les communautés microbiennes présentes à la suite d'une infection au SARS-CoV-2 dans le microbiome du tractus respiratoire. Le premier objectif était de comparer la diversité microbienne buccale et oropharyngée des personnes atteintes de la COVID-19 à celle, des personnes non atteintes, et le second était de déterminer si une infection au SARS-CoV-2 avait une influence sur la diversité microbienne buccale et oropharyngée.

Un séquençage du gène de l'ARNr 16S a été réalisé à partir 257 d'échantillons de gargarismes obtenus à la suite du test de dépistage de la COVID-19. Cent quatre-vingt-deux individus ont été testés positifs et 75 ont été testés négatifs. Le séquençage au MiniSeq et les analyses bio-informatiques ont permis l'identification de communautés bactériennes présentes dans les gargarismes. De cette façon, il a été possible d'avoir une représentation du microbiome bactérien chez les personnes atteintes et des personnes non atteintes par le SARS-CoV-2. Chez les deux groupes d'individus, le phylum dominant était le même. À savoir, dans l'ordre décroissant, les Firmicutes, les Actinomycetota, les Bacteroidota, les Pseudomonadota, les Fusobacteria et enfin les Patecibacteria. Ces phylums ont déjà été identifiés chez des personnes saines et font partie de la flore commensale normale.

Le présent projet a permis d'identifier des biomarqueurs bactériens, et également une différence taxonomique entre les deux groupes. Chez les personnes infectées par le SARS-CoV-2 ce sont les genres *Prevotella* et *Veillonella* qui ont été identifiés comme biomarqueurs. Ces résultats sont en accord avec les travaux de différentes équipes de recherche, qui avaient également noté l'abondance significativement plus élevée de ces genres pathogènes opportunistes à partir d'écouillons du tractus respiratoire supérieur (Gupta et al., 2022; Haran et al., 2021; Iebba et al., 2021; Liu et al., 2021). En effet, ces genres sont connus pour leurs productions de LPS, présents à la surface des bactéries Gram négatif, et connus pour avoir un effet pro-inflammatoire, et capables d'induire des inflammations systémiques. De plus, d'autres études démontrent le lien

entre l'abondance de ces genres et la gravité des symptômes (Bradley et al., 2022; Haran et al., 2021). Pour les personnes non atteintes, les genres *Streptococcus* et *Actinomyces* ont été identifiés dans la présente étude comme biomarqueurs. Le genre *Streptococcus* est le genre le plus abondant dans le microbiome du tractus respiratoire supérieur et joue un rôle important dans l'homéostasie de celui-ci. Lors de précédentes études, sa présence a été associée à un microbiome stable et résistant aux infections secondaires (Abranches et al., 2018). Le genre *Actinomyces* comporte des taxons associés à des formes légères ou modérées de la COVID-19 (Chen et al., 2022). Sa présence a été négativement corrélée à la gravité de la COVID-19 (Shen et al., 2022).

Aucune différence significative n'a été identifiée pour la richesse spécifique du microbiome entre les personnes atteintes et non-atteintes de la COVID-19. Cependant, une plus grande diversité taxonomique a été identifiée chez les personnes infectées par le SARS-CoV-2. Ainsi 2,7 % de la composition taxonomique des communautés bactériennes de l'oropharynx était influencée par le statut infectieux des individus. Cette différence entre communautés est faible, mais peut être importante au vu de la complexité de cet environnement (Samaranayake et al., 2017). En comparaison, des études portant sur d'autres maladies infectieuses rapportent une proportion de la composition taxonomique reliée à l'infection inférieure à 1 % (Li et al., 2022; Zhang et al., 2022). Une plus grande diversité bactérienne chez les personnes infectées par le SARS-CoV-2, pourrait être due à des perturbations du microbiome. Ceci est cohérent avec le principe d'Anne Karenina qui suggère qu'un microbiome sain présente généralement des caractéristiques similaires ; les microbiomes perturbés peuvent présenter des caractéristiques avec des différences, conduisant à une grande diversité (Zaneveld et al., 2017). Ces résultats suggèrent alors une dysbiose du microbiome bactérien respiratoire des personnes infectées par le SARS-CoV-2.

Une des forces de notre étude est d'avoir fait le présent projet avec des échantillons provenant tous d'une seule population présentant des caractéristiques génétiques uniques et un environnement assez homogène. En effet, la population du Saguenay–Lac-Saint-Jean présente des caractéristiques génétiques similaires liées à divers flux migratoires qui lui sont propres (Bchetnia et al., 2021). De plus, son éloignement des grandes villes en fait un échantillon isolé, mais aussi exposé à un même environnement (Shifman et al.,

2001). Par ailleurs, due à son éloignement des grandes villes, l'infection par le variant alpha était le plus dominant lors du prélèvement des échantillons, ce qui donne une idée plus précise sur la réponse du microbiome face à l'infection de ce variant-ci (Tremblay et al., 2021).

Bien que les résultats de cette étude soient intéressants, il est important de reconnaître certaines limites. La principale limite de cette étude est la composition de notre échantillon. Tout d'abord, les individus avec des symptômes qui ont été testés pour la COVID-19, bien que certains aient eu un résultat négatif, leurs symptômes pourraient avoir engendré des modifications dans la diversité microbienne, causées par une autre raison que la COVID-19. Ce biais rend les comparaisons plus difficiles à interpréter. Deuxièmement, la population étudiée était principalement composée d'adultes, ce qui peut s'expliquer par le fait que les personnes travaillant dans le domaine médical à l'époque étaient régulièrement testées. Troisièmement, bien qu'il n'y ait pas de différence entre les hommes et les femmes, la population étudiée était également majoritairement féminine. Selon certaines études, les hommes sont plus vulnérables à la COVID-19 (Chen et al., 2020; Onder et al., 2020). Cela peut constituer une limite à la compréhension des communautés bactériennes de l'oropharynx. Quatrièmement, l'échantillonnage n'ayant été réalisé qu'une seule fois, les résultats actuels ne concernent que le variant alpha et il serait pertinent de réaliser des analyses avec d'autres variants. Enfin, l'hôpital a fourni très peu d'informations sur l'état des patients échantillonnés (mode de vie, maladie, traitement, etc.). Les habitudes de vie et les traitements sont des facteurs de variation de la composition microbienne, il aurait alors été intéressant de prendre en compte ces covariables. Connaître le degré de sévérité de la COVID-19 chez les patients nous aurait permis d'être plus précis dans la discrimination et l'identification de biomarqueurs potentiels.

Cette étude était basée sur le séquençage du gène de l'ARNr 16S, qui fournit des informations jusqu'au genre bactérien. Pour pallier cette limite, il aurait été possible de réaliser le séquençage de l'ensemble des ARN messagers (métatranscriptomique) ou le séquençage du génome au complet (métagénomique shotgun) et non sur une seule partie du génome. Cela aurait permis d'avoir d'autres informations telles que les gènes exprimés et les fonctions génétiques avec des voies métaboliques actives permettant l'identification des espèces bactériennes présentes (Wang et al., 2015).

Quant au séquençage, il a été réalisé sur MiniSeq, ce qui peut avoir des conséquences sur la précision des informations générées, réduite par rapport au séquençage sur MiSeq. En effet, le MiSeq a un débit de séquence plus élevé générant ainsi plus de données par séquençage que le MiniSeq. De plus, le séquençage bidirectionnel sur MiSeq se fait sur une plus grande longueur de paires de bases (pb) (2x300 pb pour le MiSeq tandis que le MiniSeq a une limite de 2x150 pb) (Illumina, 2023).

Bien que présentant certaines limites, cette étude a permis d'identifier des différences significatives d'intérêt entre le microbiote de la cavité buccale et oropharyngée des personnes infectées et celui des personnes non infectées.

Une suite logique de ce projet serait de faire l'étude du microbiome bactérien au rang taxonomique le plus avancé, jusqu'à l'espèce. Ensuite, étudier la métatranscriptomique des bactéries en étudiant les différents domaines « omique » (métagénomique, métaprotéomique, métabolomique...) renseignerait sur les niveaux d'expression de gènes, des protéines et autres métabolites produits par l'activité bactérienne.

CONCLUSION

La présente étude a permis d'atteindre l'objectif de comparer la diversité microbienne des personnes atteintes de la COVID-19 à celle, des personnes non atteintes et de mesurer l'impact du virus du SARS-CoV-2 sur la diversité microbienne buccale et oropharyngée, sur un échantillon de la population du Saguenay-Lac-Saint-Jean. Ces résultats viennent contribuer à la compréhension de la réponse du microbiome face à l'infection par le SARS-CoV-2. Cette étude a également permis d'accroître nos connaissances sur le microbiome bactérien du tractus respiratoire supérieur. Les biomarqueurs bactériens identifiés pour les personnes atteintes du SARS-CoV-2 sont associés à un contexte pro-inflammatoire et pourraient expliquer, du moins en partie, la diversité taxonomique bactérienne observée en cas d'infection. Ces bactéries pourraient entraîner une dysbiose qui créerait un environnement favorable à une infection secondaire. Ces marqueurs pourraient éventuellement permettre d'identifier les personnes les plus vulnérables face à une potentielle nouvelle pandémie.

BIBLIOGRAPHIE

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J., & Versalovic, J. (2014). The placenta harbors a unique microbiome. *Science Translational Medicine*, 6(237), 237ra65-237ra65. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599>
- Aagaard, K., Petrosino, J., Keitel, W., Watson, M., Katancik, J., Garcia, N., ... Hamilton, H. (2013). The Human Microbiome Project strategy for comprehensive sampling of the human microbiome and why it matters. *The FASEB Journal*, 27(3), 1012-1022. <https://doi.org/10.1096/fj.12-220806>
- Abranches, J., Zeng, L., Kajfasz, J. K., Palmer, S., Chakraborty, B., Wen, Z., ... Lemos, J. A. (2018). Biology of oral streptococci. *Microbiology Spectrum*, 6(5), 6-5. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018>
- Alagaili, A. N., Briese, T., Mishra, N., Kapoor, V., Sameroff, S. C., de Wit, E., ... Kapoor, A. (2014). Middle East respiratory syndrome coronavirus infection in dromedary camels in Saudi Arabia. *MBio*, 5(2), e00884-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.00884-14>
- Alanagreh, L., Alzoughool, F., & Atoum, M. (2020). The human coronavirus disease COVID-19: Its origin, characteristics, and insights into potential drugs and its mechanisms. *Pathogens*, 9(5), 331. <https://doi.org/10.3390/pathogens9050331>
- Amit, I., Garber, M., Chevrier, N., Leite, A. P., Donner, Y., Eisenhaure, T., ... Zuk, O. (2009). Unbiased reconstruction of a mammalian transcriptional network mediating pathogen responses. *Science*, 326(5950), 257-263. <https://doi.org/10.1126/science.1179050>
- Andrade, B. G., Cuadrat, R. R., Tonetti, F. R., Kitazawa, H., & Villena, J. (2022). The role of respiratory microbiota in the protection against viral diseases: Respiratory commensal bacteria as next-generation probiotics for COVID-19. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 41(3), 94-102. <https://doi.org/10.12938/bmfh.2022-009>
- Arbex, M. A., Santos, U. de P., Martins, L. C., Saldiva, P. H. N., Pereira, L. A. A., & Braga, A. L. F. (2012). Air pollution and the respiratory system. *Jornal brasileiro de pneumologia*, 38, 643-655. <https://doi.org/10.1590/s1806-37132012000500015>
- Arbolea, S., Binetti, A., Salazar, N., Fernández, N., Solís, G., Hernandez-Barranco, A., ... Gueimonde, M. (2012). Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. *FEMS microbiology ecology*, 79(3), 763-772. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01261.x>
- Ashraf, U. M., Abokor, A. A., Edwards, J. M., Waigi, E. W., Royfman, R. S., Hasan, S. A.-M., ... Koch, L. G. (2021). SARS-CoV-2, ACE2 expression, and systemic organ invasion. *Physiological Genomics*, 53(2), 51-60. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00087.2020>
- Avadhanula, V., Rodriguez, C. A., DeVincenzo, J. P., Wang, Y., Webby, R. J., Ulett, G. C., & Adderson, E. E. (2006). Respiratory viruses augment the adhesion of bacterial pathogens to respiratory epithelium in a viral species-and cell type-dependent manner. *Journal of Virology*, 80(4), 1629-1636. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.4.1629-1636.2006>
- Bach, L. L., Ram, A., Ijaz, U. Z., Evans, T. J., & Lindström, J. (2021). A Longitudinal Study of the Human Oropharynx Microbiota Over Time Reveals a Common Core and Significant Variations With Self-

Reported Disease. *Frontiers in microbiology*, 11, 573969-573969.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.573969>

- Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., ... Zhong, H. (2015). Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host & Microbe*, 17(5), 690-703. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.004>
- Bai, X., Narayanan, A., Skagerberg, M., Ceña-Diez, R., Giske, C. G., Strålin, K., & Sönnernborg, A. (2022). Characterization of the upper respiratory bacterial microbiome in critically ill COVID-19 patients. *Biomedicines*, 10(5), 982. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10050982>
- Bakaletz, L. O. (2017). Viral-bacterial co-infections in the respiratory tract. *Current Opinion in Microbiology*, 35, 30-35. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.11.003>
- Bakir, M., Yagci, A., Ulger, N., Akbenlioglu, C., Ilki, A., & Soyletir, G. (2001). Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in relation to *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* colonization in healthy children : Apropos of 1400 children sampled. *European Journal of Epidemiology*, 17(11), 1015-1018. <https://doi.org/10.1023/A:1020021109462>
- Baliga, S., Muglikar, S., & Kale, R. (2013). Salivary pH: A diagnostic biomarker. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 17(4), 461-465. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.118317>
- Bartosch, S., Fite, A., Macfarlane, G. T., & McMurdo, M. E. (2004). Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3575-3581. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3575-3581.2004>
- Bashiardes, S., Zilberman-Schapira, G., & Elinav, E. (2016). Use of metatranscriptomics in microbiome research. *Bioinformatics and Biology Insights*, 10, BBI-S34610. <https://doi.org/10.4137/BBI.S34610>
- Batah, S. S., & Fabro, A. T. (2021). Pulmonary pathology of ARDS in COVID-19 : A pathological review for clinicians. *Respiratory Medicine*, 176, 106239-106239. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2020.106239>
- Bchetnia, M., Bouchard, L., Mathieu, J., Campeau, P. M., Morin, C., Brisson, D., ... Laprise, C. (2021). Genetic burden linked to founder effects in Saguenay-Lac-Saint-Jean illustrates the importance of genetic screening test availability. *Journal of Medical Genetics*, 58(10), 653-665. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2021-107809>
- Beck, J. M., Young, V. B., & Huffnagle, G. B. (2012). The microbiome of the lung. *Translational research : The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 160(4), 258-266. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.02.005>
- Biesbroek, G., Bogaert, D., & Sanders, E. A. M. (2014). Early Respiratory Microbiota Composition Determines Bacterial Succession Patterns and Respiratory Health in Children. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 190(11). <https://doi.org/10.1164/rccm.201407-1240OC>
- Bik, E. M., Long, C. D., Armitage, G. C., Loomer, P., Emerson, J., Mongodin, E. F., ... Relman, D. A. (2010). Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *The ISME Journal*, 4(8), 962-974. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.30>
- Blanco-Melo, D., Nilsson-Payant, B. E., Liu, W.-C., Uhl, S., Hoagland, D., Møller, R., ... tenOever, B. R. (2020). Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell*, 181(5), 1036-

1045.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.026>

- Bogaert, D., de Groot, R., & Hermans, P. (2004). *Streptococcus pneumoniae* colonisation: The key to pneumococcal disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 4(3), 144-154. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)00938-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)00938-7)
- Bosch, A. A. T. M., Biesbroek, G., Trzcinski, K., Sanders, E. A. M., & Bogaert, D. (2013). Viral and bacterial interactions in the upper respiratory tract. *PLoS Pathogens*, 9(1), e1003057-e1003057. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003057>
- Bo-Shun, Z., Li, L., Qian, Z., Zhen, W., Peng, Y., Guo-Dong, Z., ... Zhi-Jing, X. (2020). Co-infection of H9N2 influenza virus and *Pseudomonas aeruginosa* contributes to the development of hemorrhagic pneumonia in mink. *Veterinary Microbiology*, 240, 108542. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108542>
- Böttcher-Friebertshäuser, E., Klenk, H.-D., & Garten, W. (2013). Activation of influenza viruses by proteases from host cells and bacteria in the human airway epithelium. *Pathogens and Disease*, 69(2), 87-100. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12053>
- Bradburne, A., Bynoe, M., & Tyrrell, D. (1967). Effects of a "new" human respiratory virus in volunteers. *British Medical Journal*, 3(5568), 767. <https://doi.org/10.1136/bmj.3.5568.767>
- Bradley, E. S., Zeamer, A. L., Bucci, V., Cincotta, L., Salive, M.-C., Dutta, P., ... Moormann, A. (2022). Oropharyngeal Microbiome Profiled at Admission is Predictive of the Need for Respiratory Support Among COVID-19 Patients. *medRxiv*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1009440>
- Bradley, J. S., Byington, C. L., Shah, S. S., Alverson, B., Carter, E. R., Harrison, C., ... Moore, M. R. (2011). The management of community-acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age: Clinical practice guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 53(7), e25-e76. <https://doi.org/10.1093/cid/cir531>
- Briese, T., Mishra, N., Jain, K., Zalmout, I. S., Jabado, O. J., Karesh, W. B., ... Lipkin, W. I. (2014). Middle East respiratory syndrome coronavirus quasispecies that include homologues of human isolates revealed through whole-genome analysis and virus cultured from dromedary camels in Saudi Arabia. *MBio*, 5(3), e01146-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01146-14>
- Brown, R. L., Sequeira, R. P., & Clarke, T. B. (2017). The microbiota protects against respiratory infection via GM-CSF signaling. *Nature Communications*, 8(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01803-x>
- Brugger, S. D., Bomar, L., & Lemon, K. P. (2016). Commensal-pathogen interactions along the human nasal passages. *PLoS Pathogens*, 12(7), e1005633. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005633>
- Brüssow, H. (2020). Problems with the concept of gut microbiota dysbiosis. *Microbial Biotechnology*, 13(2), 423-434. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13479>
- Budden, K. F., Shukla, S. D., Rehman, S. F., Bowerman, K. L., Keely, S., Hugenholtz, P., ... Chung, K. F. (2019). Functional effects of the microbiota in chronic respiratory disease. *The Lancet Respiratory Medicine*, 7(10), 907-920. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30510-1](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30510-1)
- Calabrese, F., Pezzuto, F., Fortarezza, F., Hofman, P., Kern, I., Panizo, A., ... Lunardi, F. (2020). Pulmonary

- pathology and COVID-19: Lessons from autopsy. The Experience of European Pulmonary Pathologists. 477(3), 359-372. <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02886-6>
- Cascella, M., Rajnik, M., Aleem, A., Dulebohn, S. C., & Di Napoli, R. (2022). Features, evaluation, and treatment of coronavirus (COVID-19). Statpearls.
- Chattopadhyay, I., Verma, M., & Panda, M. (2019). Role of Oral Microbiome Signatures in Diagnosis and Prognosis of Oral Cancer. *Technology in Cancer Research & Treatment*. <https://doi.org/10.1177/1533033819867354>
- Chen, J., Liu, X., Liu, W., Yang, C., Jia, R., Ke, Y., ... Chen, Y. (2022). Comparison of the Respiratory Tractmicrobiome in Hospitalized COVID-19 Patients with Different Disease Severity. <https://doi.org/10.1002/jmv.28002>
- Chen, K., & Pachter, L. (2005). Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities. *PLoS computational biology*, 1(2), e24. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0010024>
- Chen, N., Zhou, M., Dong, X., Qu, J., Gong, F., Han, Y., ... Wei, Y. (2020). Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China : A descriptive study. *The Lancet*, 395(10223), 507-513. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)
- Chinese SARS Molecular Epidemiology Consortium. (2004). Molecular evolution of the SARS coronavirus during the course of the SARS epidemic in China. *Science*, 303(5664), 1666-1669. <https://doi.org/10.1126/science.1092002>
- Cho, I., & Blaser, M. J. (2012). The human microbiome : At the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 260-270. <https://doi.org/10.1038/nrg3182>
- Chow, J., & Mazmanian, S. K. (2010). A pathobiont of the microbiota balances host colonization and intestinal inflammation. *Cell Host & Microbe*, 7(4), 265-276. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.03.004>
- Claesson, M. J., Cusack, S., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., de Weerd, H., Flannery, E., ... Fitzgerald, G. (2011). Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 4586-4591. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000097107>
- Corman, V. M., Ithete, N. L., Richards, L. R., Schoeman, M. C., Preiser, W., Drosten, C., & Drexler, J. F. (2014). Rooting the phylogenetic tree of middle East respiratory syndrome coronavirus by characterization of a conspecific virus from an African bat. *Journal of Virology*, 88(19), 11297-11303. <https://doi.org/10.1128/JVI.01498-14>
- Cox, M. J., Allgaier, M., Taylor, B., Baek, M. S., Huang, Y. J., Daly, R. A., ... Fujimura, K. E. (2010). Airway microbiota and pathogen abundance in age-stratified cystic fibrosis patients. *PloS One*, 5(6), e11044. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011044>
- Cui, J., Li, F., & Shi, Z.-L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 181-192. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
- Daneman, R., & Prat, A. (2015). The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412>
- Davenport, E. R., Sanders, J. G., Song, S. J., Amato, K. R., Clark, A. G., & Knight, R. (2017). The human

microbiome in evolution. *BMC Biology*, 15(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0454-7>

- De Boeck, I., Wittouck, S., Wuyts, S., Oerlemans, E. F. M., van den Broek, M. F. L., Vandenheuveld, D., ... Lebeer, S. (2017). Comparing the Healthy Nose and Nasopharynx Microbiota Reveals Continuity As Well As Niche-Specificity. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2372-2372. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02372>
- Debertin, A. S., Tschernig, T., Tönjes, H., Kleemann, W. J., Tröger, H. D., & Pabst, R. (2003). Nasal-associated lymphoid tissue (NALT) : Frequency and localization in young children. *Clinical and Experimental Immunology*, 134(3), 503-507. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2003.02311.x>
- de Groot, R. J., Baker, S. C., Baric, R. S., Brown, C. S., Drosten, C., Enjuanes, L., Fouchier, R. A., Galiano, M., Gorbalenya, A. E., Memish, Z. A., Perlman, S., Poon, L. L., Snijder, E. J., Stephens, G. M., Woo, P. C., Zaki, A. M., Zambon, M., & Ziebuhr, J. (2013). Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *Journal of virology*, 87(14), 7790-7792. <https://doi.org/10.1128/JVI.01244-13>
- Depner, M., Ege, M. J., Cox, M. J., Dwyer, S., Walker, A. W., Birzele, L. T., ... Danielewicz, H. (2017). Bacterial microbiota of the upper respiratory tract and childhood asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(3), 826-834. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.05.050>
- Depner, M., Taft, D. H., Kirjavainen, P. V., Kalanetra, K. M., Karvonen, A. M., Peschel, S., ... Lauener, R. (2020). Maturation of the gut microbiome during the first year of life contributes to the protective farm effect on childhood asthma. *Nature Medicine*, 26(11), 1766-1775. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1095-x>
- de Steenhuijsen Piters, W. A. A., Sanders, E. A. M., & Bogaert, D. (2015). The role of the local microbial ecosystem in respiratory health and disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 370(1675), 20140294. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0294>
- de Steenhuijsen Piters, W. A., Binkowska, J., & Bogaert, D. (2020). Early life microbiota and respiratory tract infections. *Cell Host & Microbe*, 28(2), 223-232. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.07.004>
- Dethlefsen, L., McFall-Ngai, M., & Relman, D. A. (2007). An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature*, 449(7164), 811-818. <https://doi.org/10.1038/nature06245>
- Diaz-Diaz, A., Bunsow, E., Garcia-Maurino, C., Moore-Clingenpeel, M., Naples, J., Juergensen, A., ... Gern, J. (2022). Nasopharyngeal codetection of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* shapes respiratory syncytial virus disease outcomes in children. *The Journal of Infectious Diseases*, 225(5), 912-923. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab481>
- Dickson, R. P., Schultz, M. J., van der Poll, T., Schouten, L. R., Falkowski, N. R., Luth, J. E., ... Biomarker Analysis in Septic ICU Patients (BASIC) Consortium. (2020). Lung Microbiota Predict Clinical Outcomes in Critically Ill Patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 201(5), 555-563. <https://doi.org/10.1164/rccm.201907-1487OC>
- DiGiulio, D. B., Romero, R., Amogan, H. P., Kusanovic, J. P., Bik, E. M., Gotsch, F., ... Relman, D. A. (2008). Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor : A molecular and culture-based investigation. *PLoS One*, 3(8), e3056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003056>
- Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body

- habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(26), 11971-11975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107>
- Drexler, J. F., Corman, V. M., & Drosten, C. (2014). Ecology, evolution and classification of bat coronaviruses in the aftermath of SARS. *Antiviral Research*, 101, 45-56. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.10.013>
- Dubourg, G., Yacouba, A., Bossi, V., Raoult, D., & Lagier, J.-C. (2022). Profile of the nasopharyngeal microbiota affecting the clinical course in COVID-19 patients. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.871627>
- Duytschaever, G., Huys, G., Bekaert, M., Boulanger, L., De Boeck, K., & Vandamme, P. (2013). Dysbiosis of bifidobacteria and Clostridium cluster XIVa in the cystic fibrosis fecal microbiota. *Journal of Cystic Fibrosis*, 12(3), 206-215. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2012.10.003>
- Dzidic, M., Abrahamsson, T. R., Artacho, A., Collado, M. C., Mira, A., & Jenmalm, M. (2018). Oral microbiota maturation during the first 7 years of life in relation to allergy development. *Allergy*, 73(10), 2000-2011. <https://doi.org/10.1111/all.13449>
- Edouard, S., Million, M., Bachar, D., Dubourg, G., Michelle, C., Ninove, L., ... Raoult, D. (2018). The nasopharyngeal microbiota in patients with viral respiratory tract infections is enriched in bacterial pathogens. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37, 1725-1733. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3305-8>
- Empey, D. W. (1978). Diseases of the respiratory system. Introduction : Structure and function of the lungs. *British Medical Journal*, 1(6113), 631. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.6113.631>
- England, R. J. A., Homer, J. J., Knight, L. C., & Ell, S. R. (1999). Nasal pH measurement : A reliable and repeatable parameter. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 24(1), 67-68. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2273.1999.00223.x>
- Facklam, R. (2002). What happened to the streptococci : Overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4), 613-630. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.613-630.2002>
- Feazel, L. M., Robertson, C. E., Ramakrishnan, V. R., & Frank, D. N. (2012). Microbiome complexity and *Staphylococcus aureus* in chronic rhinosinusitis. *The Laryngoscope*, 122(2), 467-472. <https://doi.org/10.1002/lary.22398>
- Fields, B. N. (2007). *Fields' Virology* (Vol. 1). Lippincott Williams & Wilkins.
- File, T. M. (2000). The epidemiology of respiratory tract infections. *Seminars in respiratory infections*, 15(3), 184-194. <https://doi.org/10.1053/srin.2000.18059>
- Fotuhi, M., Mian, A., Meysami, S., & Raji, C. A. (2020). Neurobiology of COVID-19. *Journal of Alzheimer's Disease*, 76(1), 3-19. <https://doi.org/10.3233/JAD-200581>
- Frankel, A. E., Coughlin, L. A., Kim, J., Froehlich, T. W., Xie, Y., Frenkel, E. P., & Koh, A. Y. (2017). Metagenomic shotgun sequencing and unbiased metabolomic profiling identify specific human gut microbiota and metabolites associated with immune checkpoint therapy efficacy in melanoma patients. *Neoplasia*, 19(10), 848-855. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.08.004>

- Furlow, P. W., & Mathisen, D. J. (2018). Surgical anatomy of the trachea. *Annals of cardiothoracic surgery*, 7(2), 255. <https://doi.org/10.21037/acs.2018.03.01>
- Gabarre, P., Dumas, G., Dupont, T., Darmon, M., Azoulay, E., & Zafrani, L. (2020). Acute kidney injury in critically ill patients with COVID-19. *Intensive Care Medicine*, 46(7), 1339-1348. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-06153-9>
- Gallacher, D. J., & Kotecha, S. (2016). Respiratory microbiome of new-born infants. *Frontiers in Pediatrics*, 4, 10. <https://doi.org/10.3389/fped.2016.00010>
- Gando, S., & Wada, T. (2022). Pathomechanisms Underlying Hypoxemia in Two COVID-19-Associated Acute Respiratory Distress Syndrome Phenotypes : Insights From Thrombosis and Hemostasis. *Shock (Augusta, Ga.)*, 57(1), 1. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001825>
- Ganz, T. (2003). Defensins : Antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 3(9), 710-720. <https://doi.org/10.1038/nri1180>
- Gauthier, N. P., Locher, K., MacDonald, C., Chorlton, S. D., Charles, M., & Manges, A. R. (2022). Alterations in the nasopharyngeal microbiome associated with SARS-CoV-2 infection status and disease severity. *PLoS One*, 17(10), e0275815. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0275815>
- Gemhardt, F., Sterner-Kock, A., Imboden, H., Spalteholz, M., Reibitz, F., Schultheiss, H.-P., ... Walther, T. (2005). Organ-specific distribution of ACE2 mRNA and correlating peptidase activity in rodents. *Peptides*, 26(7), 1270-1277. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.01.009>
- Gifford, J., Hunter, H., & Vogel, H. (2005). Lactoferricin : Lactoferricin : A lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 2588-2598. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5373-z>
- Gollwitzer, E. S., Saglani, S., Trompette, A., Yadava, K., Sherburn, R., McCoy, K. D., ... Marsland, B. J. (2014). Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1. *Nature Medicine*, 20(6), 642-647. <https://doi.org/10.1038/nm.3568>
- Gomez-Arango, L. F., Barrett, H. L., McIntyre, H. D., Callaway, L. K., Morrison, M., & Dekker Nitert, M. (2017). Antibiotic treatment at delivery shapes the initial oral microbiome in neonates. *Scientific Reports*, 7(1), 43481. <https://doi.org/10.1038/srep43481>
- Green, B. J., Wiriyaichai, S., Grainge, C., Rogers, G. B., Kehagia, V., Lau, L., ... Howarth, P. H. (2014). Potentially pathogenic airway bacteria and neutrophilic inflammation in treatment resistant severe asthma. *PloS One*, 9(6), e100645. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100645>
- Guan, Y., Zheng, B., He, Y., Liu, X., Zhuang, Z., Cheung, C., ... Guan, Y. (2003). Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science*, 302(5643), 276-278. <https://doi.org/10.1126/science.1087139>
- Gupta, A., Bhanushali, S., Sanap, A., Shekatkar, M., Kharat, A., Raut, C., ... Sharma, A. (2022). Oral dysbiosis and its linkage with SARS-CoV-2 infection. *Microbiological Research*, 261, 127055. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127055>
- Gupta, A., Karyakarte, R., Joshi, S., Das, R., Jani, K., Shouche, Y., & Sharma, A. (2022). Nasopharyngeal microbiome reveals the prevalence of opportunistic pathogens in SARS-CoV-2 infected individuals and their association with host types. *Microbes and Infection*, 24(1), 104880.

<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2021.104880>

- Hafiane, A. (2020). SARS-CoV-2 and the cardiovascular system. *Clinica Chimica Acta*, 510, 311-316. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.07.019>
- Hanada, S., Pirzadeh, M., Carver, K. Y., & Deng, J. C. (2018). Respiratory viral infection-induced microbiome alterations and secondary bacterial pneumonia. *Frontiers in Immunology*, 9, 2640. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02640>
- Haran, J. P., Bradley, E., Zeamer, A. L., Cincotta, L., Salive, M.-C., Dutta, P., ... Moormann, A. M. (2021). Inflammation-type dysbiosis of the oral microbiome associates with the duration of COVID-19 symptoms and long COVID. *JCI insight*, 6(20). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.152346>
- Hardy, B. L., & Merrell, D. S. (2021). Friend or Foe: Interbacterial Competition in the Nasal Cavity. *Journal of bacteriology*, 203(5), e00480-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00480-20>
- Hartenian, E., Nandakumar, D., Lari, A., Ly, M., Tucker, J. M., & Glaunsinger, B. A. (2020). The molecular virology of coronaviruses. *Journal of Biological Chemistry*, 295(37), 12910-12934. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.013930>
- Hasöksüz, M., Kilic, S., & Sarac, F. (2020). Coronaviruses and SARS-CoV-2 *Turkish Journal of Medical Sciences*, 50(9), 549-556. <https://doi.org/10.3906/sag-2004-127>
- Hauptmann, M., & Schaible, U. E. (2016). Linking microbiota and respiratory disease. *FEBS letters*, 590(21), 3721-3738. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12421>
- Hayes, W., & Sahu, S. (2020). The Human Microbiome: History and Future. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques*, 23, 404-411. <https://doi.org/10.18433/jpps31525>
- He, B., Zhang, Y., Xu, L., Yang, W., Yang, F., Feng, Y., ... Feng, Y. (2014). Identification of diverse alphacoronaviruses and genomic characterization of a novel severe acute respiratory syndrome-like coronavirus from bats in China. *Journal of Virology*, 88(12), 7070-7082. <https://doi.org/10.1128/JVI.00631-14>
- Helding, L., Carroll, T. L., Nix, J., Johns, M. M., LeBorgne, W. D., & Meyer, D. (2022). COVID-19 after effects : Concerns for singers. *Journal of Voice*, 36(4), 586-e7. <https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2020.07.032>
- Hernández-Terán, A., Mejía-Nepomuceno, F., Herrera, M. T., Barreto, O., García, E., Castillejos, M., ... Avila-Rios, S. (2021). Dysbiosis and structural disruption of the respiratory microbiota in COVID-19 patients with severe and fatal outcomes. *Scientific Reports*, 11(1), 21297. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00851-0>
- Hewitt, R. J., & Lloyd, C. M. (2021). Regulation of immune responses by the airway epithelial cell landscape. *Nature Reviews Immunology*, 21(6), 347-362. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00477-9>
- Hewitt, R. J., & Molyneaux, P. L. (2017). The respiratory microbiome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Annals of Translational Medicine*, 5(12). <https://doi.org/10.21037/atm.2017.01.56>
- Hilty, M., Burke, C., Pedro, H., Cardenas, P., Bush, A., Bossley, C., ... Pachter, L. (2010). Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One*, 5(1), e8578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008578>

- Hojyo, S., Uchida, M., Tanaka, K., Hasebe, R., Tanaka, Y., Murakami, M., & Hirano, T. (2020). How COVID-19 induces cytokine storm with high mortality. *Inflammation and regeneration*, 40, 1-7. <https://doi.org/10.1186/s41232-020-00146-3>
- Honda, K., & Littman, D. R. (2016). The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature*, 535(7610), 75-84. <https://doi.org/10.1038/nature18848>
- Hooper, L. V., & Gordon, J. I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5519), 1115–1118. <https://doi.org/10.1126/science.1058709>
- Hooper, S. J., Crean, S. J., Lewis, M. A. O., Spratt, D. A., Wade, W. G., & Wilson, M. J. (2006). Immune system modulation and viral persistence in bats : Understanding viral spillover. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(5), 1719-1725. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.5.1719-1725.2006>
- Hoque, M. N., Sarkar, M. M. H., Rahman, M. S., Akter, S., Banu, T. A., Goswami, B., ... Nafisa, T. (2021). SARS-CoV-2 infection reduces human nasopharyngeal commensal microbiome with inclusion of pathobionts. *Scientific Reports*, 11(1), 24042. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03245-4>
- Hsia, C. C., Hyde, D. M., & Weibel, E. R. (2016). Lung structure and the intrinsic challenges of gas exchange. *Comprehensive Physiology*, 6(2), 827. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150028>
- Hu, B., Ge, X., Wang, L.-F., & Shi, Z. (2015). Bat origin of human coronaviruses. *Virology journal*, 12(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0422-1>
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z.-L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 141-154. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet (London, England)*, 395(10223), 497-506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
- Hufnagl, K., Pali-Schöll, I., Roth-Walter, F., & Jensen-Jarolim, E. (2020). Dysbiosis of the gut and lung microbiome has a role in asthma. *Seminars in immunopathology*, 42(1), 75–93. <https://doi.org/10.1007/s00281-019-00775-y>
- Hussell, T., Godlee, A., Salek-Ardakani, S., & Snelgrove, R. J. (2012). Respiratory Viral Infections : Knowledge based therapeutics. *Current Opinion in Immunology*, 24(4), 438-443. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.06.001>
- Ichinohe, T., Pang, I. K., Kumamoto, Y., Peaper, D. R., Ho, J. H., Murray, T. S., & Iwasaki, A. (2011). Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(13), 5354-5359. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019378108>
- ICTV. (2023). International Committee on Taxonomy of Viruses : ICTV. Repéré à <https://ictv.global>
- Iebba, V., Zanotta, N., Campisciano, G., Zerbato, V., Di Bella, S., Cason, C., ... Comar, M. (2021). Profiling of oral microbiota and cytokines in COVID-19 patients. *Frontiers in Microbiology*, 1603. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.671813>
- Illumina. (2023). Illumina sequencing platforms. Repéré à <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms.html>

- Imai, Y., Kuba, K., Rao, S., Huan, Y., Guo, F., Guan, B., ... Penninger, J. M. (2005). Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature*, 436(7047), 112-116. <https://doi.org/10.1038/nature03712>
- Invernizzi, R., Lloyd, C. M., & Molyneaux, P. L. (2020). Respiratory microbiome and epithelial interactions shape immunity in the lungs. *Immunology*, 160(2), 171-182. <https://doi.org/10.1111/imm.13195>
- Ivanov, I. I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L., Shima, T., Karaoz, U., ... Lynch, S. V. (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*, 139(3), 485-498. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.033>
- Jia, H. P., Look, D. C., Shi, L., Hickey, M., Pewe, L., Netland, J., ... McCray, P. B., Jr. (2005). ACE2 receptor expression and severe acute respiratory syndrome coronavirus infection depend on differentiation of human airway epithelia. *Journal of Virology*, 79(23), 14614-14621. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.23.14614-14621.2005>
- Jones, H. E., Harris, K. A., Azizia, M., Bank, L., Carpenter, B., Hartley, J. C., ... Peebles, D. (2009). Differing prevalence and diversity of bacterial species in fetal membranes from very preterm and term labor. *PLoS One*, 4(12), e8205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008205>
- Kaan, A., Kahharova, D., & Zaura, E. (2021). Acquisition and establishment of the oral microbiota. *Periodontology 2000*, 86(1), 123-141. <https://doi.org/10.1111/prd.12366>
- Kampoo, K., Teanpaisan, R., Ledder, R. G., & McBain, A. J. (2014). Oral bacterial communities in individuals with type 2 diabetes who live in southern Thailand. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(2), 662-671. <https://doi.org/10.1128/AEM.02821-13>
- Kilian, M., Chapple, I. L. C., Hannig, M., Marsh, P. D., Meuric, V., Pedersen, A. M. L., ... Zaura, E. (2016). The oral microbiome – an update for oral healthcare professionals. *British Dental Journal*, 221(10), 657-666. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2016.865>
- Kim, J. G., Zhang, A., Rauseo, A. M., Goss, C. W., Mudd, P. A., O'Halloran, J. A., & Wang, L. (2023). The salivary and nasopharyngeal microbiomes are associated with SARS-CoV-2 infection and disease severity. *Journal of Medical Virology*, 95(2), e28445. <https://doi.org/10.1002/jmv.28445>
- King, P. T., Holdsworth, S. R., Freezer, N. J., Villanueva, E., & Holmes, P. W. (2006). Characterisation of the onset and presenting clinical features of adult bronchiectasis. *Respiratory Medicine*, 100(12), 2183-2189. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2006.03.012>
- Kolhe, R., Sahajpal, N. S., Vyavahare, S., Dhanani, A. S., Adusumilli, S., Ananth, S., ... Rojani, A. M. (2021). Alteration in nasopharyngeal microbiota profile in aged patients with COVID-19. *Diagnostics*, 11(9), 1622. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11091622>
- Krishnan, K., Chen, T., & Paster, B. J. (2017). A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Diseases*, 23(3), 276-286. <https://doi.org/10.1111/odi.12509>
- Krismer, B., Liebeke, M., Janek, D., Nega, M., Rautenberg, M., Hornig, G., ... Peschel, A. (2014). Nutrient limitation governs *Staphylococcus aureus* metabolism and niche adaptation in the human nose. *PLoS Pathogens*, 10(1), e1003862-e1003862. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003862>
- Kumar, D., Pandit, R., Sharma, S., Raval, J., Patel, Z., Joshi, M., & Joshi, C. G. (2022). (2022). Nasopharyngeal

- microbiome of COVID-19 patients revealed a distinct bacterial profile in deceased and recovered individuals. *Microbial pathogenesis*, 173(Pt A), 105829. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105829>
- Kumpitsch, C., Koskinen, K., Schöpf, V., & Moissl-Eichinger, C. (2019). The microbiome of the upper respiratory tract in health and disease. *BMC Biology*, 17(1), 87-87. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0703-z>
- La Rosa, G. R. M., Gattuso, G., Pedullà, E., Rapisarda, E., Nicolosi, D., & Salmeri, M. (2020). Association of oral dysbiosis with oral cancer development. *Oncology Letters*, 19(4), 3045-3058. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11441>
- Lamont, R. J., Koo, H., & Hajishengallis, G. (2018). The oral microbiota : Dynamic communities and host interactions. *Nature reviews. Microbiology*, 16(12), 745-759. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0089-x>
- Lansbury, L., Lim, B., Baskaran, V., & Lim, W. S. (2020). Co-infections in people with COVID-19 : A systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection*, 81(2), 266-275. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.05.046>
- Laux, C., Peschel, A., & Krismer, B. (2019). *Staphylococcus aureus* colonization of the human nose and interaction with other microbiome members. *Microbiology Spectrum*, 7(2), 7-2. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0029-2018>
- Lavoie, M.-E., Meloche, J., Boucher-Lafleur, A.-M., Bégin, P., Morin, C., Boulet, L.-P., ... Laprise, C. (2022). Longitudinal follow-up of the asthma status in a French–Canadian cohort. *Scientific Reports*, 12(1), 13789. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17959-6>
- Le Bert, N., Tan, A. T., Kunasegaran, K., Tham, C. Y., Hafezi, M., Chia, A., ... Linster, M. (2020). SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature*, 584(7821), 457-462. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2550-z>
- LeBlanc, J. G., Milani, C., de Giori, G. S., Sesma, F., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2013). Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Current opinion in biotechnology*, 24(2), 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.08.005>
- Lederberg, J., & McCray, A. T. (2001). Ome Sweet Omics—A genealogical treasury of words. *The scientist*, 15(7), 8-8.
- Letko, M., Marzi, A., & Munster, V. (2020). Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nature Microbiology*, 5(4), 562-569. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0688-y>
- Leung, R.-K., Zhou, J.-W., Guan, W., Li, S.-K., Yang, Z.-F., & Tsui, S.-W. (2013). Modulation of potential respiratory pathogens by pH1N1 viral infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(10), 930-935. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12054>
- Ley, R. E., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 124(4), 837-848. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.017>
- Li, H., Wang, J., Wu, L., Luo, J., Liang, X., Xiao, B., & Zhu, Y. (2018). The impacts of delivery mode on infant's oral microflora. *Scientific Reports*, 8(1), 11938. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30397-7>

- Li, J., Quinque, D., Horz, H.-P., Li, M., Rzhetskaya, M., Raff, J. A., ... Stoneking, M. (2014). Comparative analysis of the human saliva microbiome from different climate zones : Alaska, Germany, and Africa. *BMC Microbiology*, 14, 316-316. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0316-1>
- Li, Y., Liu, J., Zhu, Y., Peng, C., Dong, Y., Liu, L., ... Zheng, Y. (2022). Alterations of oral microbiota in Chinese children with viral encephalitis and/or viral meningitis. *Journal of Microbiology*, 60(4), 429-437. <https://doi.org/10.1007/s12275-022-1560-y>
- Lippi, A., Domingues, R., Setz, C., Outeiro, T. F., & Krisko, A. (2020). SARS-CoV-2: At the Crossroad Between Aging and Neurodegeneration. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 35(5), 716–720. <https://doi.org/10.1002/mds.28084>
- Liu, C. M., Price, L. B., Hungate, B. A., Abraham, A. G., Larsen, L. A., Christensen, K., ... Andersen, P. S. (2015). *Staphylococcus aureus* and the ecology of the nasal microbiome. *Science Advances*, 1(5), e1400216-e1400216. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1400216>
- Liu, J., Liu, S., Zhang, Z., Lee, X., Wu, W., Huang, Z., ... Wu, X. (2021). Association between the nasopharyngeal microbiome and metabolome in patients with COVID-19. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 6(3), 135-143. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2021.06.002>
- Lu, H., Li, A., Zhang, T., Ren, Z., He, K., Zhang, H., ... Chen, C. (2017). Disordered oropharyngeal microbial communities in H7N9 patients with or without secondary bacterial lung infection. *Emerging Microbes & Infections*, 6(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.101>
- Lu, Z. (2020). Microbiota research : From history to advances (Vol. 145, p. 01014), EDP Sciences. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202014501014>
- Luks, A. M., Freer, L., Grissom, C. K., McIntosh, S. E., Schoene, R. B., Swenson, E. R., & Hackett, P. H. (2020). COVID-19 Lung Injury is Not High Altitude Pulmonary Edema. *High Altitude Medicine & Biology*, 21(2), 192–193. <https://doi.org/10.1089/ham.2020.0055>
- Lumpuy-Castillo, J., Lorenzo-Almorós, A., Pello-Lázaro, A. M., Sánchez-Ferrer, C., Egado, J., Tuñón, J., ... Lorenzo, Ó. (2020). Cardiovascular Damage in COVID-19: Therapeutic Approaches Targeting the Renin-Angiotensin-Aldosterone System. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6471. <https://doi.org/10.3390/ijms21186471>
- Lynch, S. V. (2014). Viruses and microbiome alterations. *Annals of the American Thoracic Society*, 11(1), S57-S60. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201306-158MG>
- Lynch, S. V., & Pedersen, O. (2016). The human intestinal microbiome in health and disease. *New England Journal of Medicine*, 375(24), 2369-2379. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1600266>
- Mackowiak, P. A. (2013). Recycling Metchnikoff : Probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life. *Frontiers in Public Health*, 1, 52. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2013.00052>
- Malone, B., Urakova, N., Snijder, E. J., & Campbell, E. A. (2022). Structures and functions of coronavirus replication–transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(1), 21-39. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00432-z>
- Man, W. H., de Steenhuijsen Piters, W. A. A., & Bogaert, D. (2017). The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nature reviews. Microbiology*, 15(5), 259–270.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.14>

- Marik, P. E. (2001). Aspiration pneumonitis and aspiration pneumonia. *New England Journal of Medicine*, 344(9), 665-671. <https://doi.org/10.1056/NEJM200103013440908>
- Marsh, R. L., Kaestli, M., Chang, A. B., Binks, M. J., Pope, C. E., Hoffman, L. R., & Smith-Vaughan, H. C. (2016). The microbiota in bronchoalveolar lavage from young children with chronic lung disease includes taxa present in both the oropharynx and nasopharynx. *Microbiome*, 4(1), 37-37. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0182-1>
- Martinez-Medina, M., Aldeguer, X., Gonzalez-Huix, F., Acero, D., & Garcia-Gil, J. L. (2006). Abnormal microbiota composition in the ileocolonic mucosa of Crohn's disease patients as revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 12(12), 1136-1145. <https://doi.org/10.1097/01.mib.0000235828.09305.0c>
- McCullers, J. A. (2006). Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 571-582. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-05>
- McIntosh, K., Dees, J. H., Becker, W. B., Kapikian, A. Z., & Chanock, R. M. (1967). Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 57(4), 933-940. <https://doi.org/10.1073/pnas.57.4.933>
- McNamee, L. A., & Harmsen, A. G. (2006). Both influenza-induced neutrophil dysfunction and neutrophil-independent mechanisms contribute to increased susceptibility to a secondary *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infection and Immunity*, 74(12), 6707-6721. <https://doi.org/10.1128/IAI.00789-06>
- Mendoza-Torres, E., Oyarzún, A., Mondaca-Ruff, D., Azocar, A., Castro, P. F., Jalil, J. E., ... Ocaranza, M. P. (2015). ACE2 and vasoactive peptides: Novel players in cardiovascular/renal remodeling and hypertension. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, 9(4), 217-237. <https://doi.org/10.1177/1753944715597623>
- Menon, T., Gopalakrishnan, S. N., Balasubramanian, R., & Justin, S. R. (2017). Characterisation of the human oral microbiome in patients with coronary artery disease using next-generation sequencing of 16SrRNA amplicons. *Indian journal of medical microbiology*, 35(1), 101-104. https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_16_370
- Merenstein, C., Liang, G., Whiteside, S. A., Cobián-Güemes, A. G., Merlino, M. S., Taylor, L. J., ... Graham-Wooten, J. (2021). Signatures of COVID-19 severity and immune response in the respiratory tract microbiome. *MBio*, 12(4), e01777-21. <https://doi.org/10.1128/mBio.01777-21>
- Mika, M., Mack, I., Korten, I., Qi, W., Aebi, S., Frey, U., ... Hilty, M. (2015). Dynamics of the nasal microbiota in infancy: A prospective cohort study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(4), 905-912.e11. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.12.1909>
- Miller, C. P., Bohnhoff, M., & Rifkind, D. (1957). The effect of an antibiotic on the susceptibility of the mouse's intestinal tract to Salmonella infection. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 68, 51.
- Molyneaux, P. L., Cox, M. J., Willis-Owen, S. A. G., Mallia, P., Russell, K. E., Russell, A.-M., ... Moffatt, M. F. (2014). The role of bacteria in the pathogenesis and progression of idiopathic pulmonary fibrosis.

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 190(8), 906-913.
<https://doi.org/10.1164/rccm.201403-0541OC>

- Montalvan, V., Lee, J., Bueso, T., De Toledo, J., & Rivas, K. (2020). Neurological manifestations of COVID-19 and other coronavirus infections : A systematic review. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 194, 105921-105921. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2020.105921>
- Mosier, J. M., Joshi, R., Hypes, C., Pacheco, G., Valenzuela, T., & Sakles, J. C. (2015). The physiologically difficult airway. *Western Journal of Emergency Medicine*, 16(7), 1109. <https://doi.org/10.5811/westjem.2015.8.27467>
- Mostafa, H. H., Fissel, J. A., Fanelli, B., Bergman, Y., Gniazdowski, V., Dadlani, M., ... Simner, P. J. (2020). Metagenomic next-generation sequencing of nasopharyngeal specimens collected from confirmed and suspect COVID-19 patients. *MBio*, 11(6), e01969-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01969-20>
- Muegge, B. D., Kuczynski, J., Knights, D., Clemente, J. C., González, A., Fontana, L., ... Gordon, J. I. (2011). Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science*, 332(6032), 970-974. <https://doi.org/10.1126/science.1198719>
- Muhairi, S. A., Hosani, F. A., Eltahir, Y. M., Mulla, M. A., Yusof, M. F., Serhan, W. S., ... Abdelazim, A. S. (2016). Epidemiological investigation of Middle East respiratory syndrome coronavirus in dromedary camel farms linked with human infection in Abu Dhabi Emirate, United Arab Emirates. *Virus Genes*, 52(6), 848-854. <https://doi.org/10.1007/s11262-016-1367-1>
- Nardelli, C., Gentile, I., Setaro, M., Di Domenico, C., Pinchera, B., Buonomo, A. R., ... Castaldo, G. (2021). Nasopharyngeal microbiome signature in COVID-19 positive patients : Can we definitively get a role to *Fusobacterium periodonticum*? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 625581. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.625581>
- O'Donnell, R., & Frew, A. (2002). Is there more than one inflammatory phenotype in asthma? *Thorax*, 57(7), 566-568. <https://doi.org/10.1136/thorax.57.7.566>
- Oliveira, L. C. G., Cruz, N. A. N., Ricelli, B., Tedesco-Silva Jr, H., Medina-Pestana, J. O., & Casarini, D. E. (2021). Interactions amongst inflammation, renin-angiotensin-aldosterone and kallikrein-kinin systems : Suggestive approaches for COVID-19 therapy. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 27. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0181>
- Onder, G., Rezza, G., & Brusaferro, S. (2020). Case-fatality rate and characteristics of patients dying in relation to COVID-19 in Italy. *Jama*, 323(18), 1775-1776. 1776. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.4683>
- Pacheco, G. A., Gálvez, N. M., Soto, J. A., Andrade, C. A., & Kalergis, A. M. (2021). Bacterial and viral coinfections with the human respiratory syncytial virus. *Microorganisms*, 9(6), 1293. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061293>
- Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., & Brown, P. O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biology*, 5(7), e177. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050177>
- Parker, D., & Prince, A. (2011). Innate immunity in the respiratory epithelium. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 45(2), 189-201. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2011-0011RT>
- Patwa, A., & Shah, A. (2015). Anatomy and physiology of respiratory system relevant to anaesthesia. *Indian*

journal of anaesthesia, 59(9), 533-541. <https://doi.org/10.4103/0019-5049.165849>

- Pérez-Losada, M., Graham, R. J., Coquillette, M., Jafarey, A., Castro-Nallar, E., Aira, M., ... Mansbach, J. M. (2017). The temporal dynamics of the tracheal microbiome in tracheostomised patients with and without lower respiratory infections. *PloS one*, 12(8), e0182520-e0182520. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182520>
- Pérez-Losada, M., Graham, R. J., Coquillette, M., Jafarey, A., Castro-Nallar, E., Aira, M., ... Mansbach, J. M. (2018). Tracheal Microbiota in Patients With a Tracheostomy Before, During and After an Acute Respiratory Infection. *The Pediatric infectious disease journal*, 37(11), e269–e271. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001952>
- Petrosillo, N., Viceconte, G., Ergonul, O., Ippolito, G., & Petersen, E. (2020). COVID-19, SARS and MERS: are they closely related? *Clinical Microbiology and Infection*, 26(6), 729-734. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.03.026>
- Pettigrew, M. M., Gent, J. F., Revai, K., Patel, J. A., & Chonmaitree, T. (2008). Microbial interactions during upper respiratory tract infections. *Emerging Infectious Diseases*, 14(10), 1584-1591. <https://doi.org/10.3201/eid1410.080119>
- Pichon, M., Lina, B., & Josset, L. (2017). Impact of the respiratory microbiome on host responses to respiratory viral infection. *Vaccines*, 5(4), 40. <https://doi.org/10.3390/vaccines5040040>
- Pickard, J. M., Zeng, M. Y., Caruso, R., & Núñez, G. (2017). Gut microbiota : Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunological Reviews*, 279(1), 70-89. <https://doi.org/10.1111/imr.12567>
- Pittet, L. A., Hall-Stoodley, L., Rutkowski, M. R., & Harmsen, A. G. (2010). Influenza virus infection decreases tracheal mucociliary velocity and clearance of *Streptococcus pneumoniae*. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 42(4), 450-460. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0417OC>
- Plovier, H., Everard, A., Druart, C., Depommier, C., Van Hul, M., Geurts, L., ... Lichtenstein, L. (2017). A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nature Medicine*, 23(1), 107-113. <https://doi.org/10.1038/nm.4236>
- Powers, T., & Noller, H. F. (1991). A functional pseudoknot in 16S ribosomal RNA. *The EMBO journal*, 10(8), 2203-2214. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07756.x>
- Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., ... Wu, M. (2022). *Pseudomonas aeruginosa* : Pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 199. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1>
- Qin, T., Wang, Y., Deng, J., Xu, B., Zhu, X., Wang, J., ... Ren, H. (2022). Super dominant pathobiontic bacteria in the nasopharyngeal microbiota cause secondary bacterial infection in COVID-19 patients. *Microbiology Spectrum*, 10(3), e01956-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01956-21>
- Rahman, M. A., Islam, K., Rahman, S., & Alamin, M. (2021). Neurobiochemical Cross-talk Between COVID-19 and Alzheimer's Disease. *Molecular neurobiology*, 58(3), 1017–1023. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02177-w>

- Ramos, S. G., Rattis, B. A. da C., Ottaviani, G., Celes, M. R. N., & Dias, E. P. (2021). ACE2 Down-Regulation May Act as a Transient Molecular Disease Causing RAAS Dysregulation and Tissue Damage in the Microcirculatory Environment Among COVID-19 Patients. *The American Journal of Pathology*, 191(7), 1154-1164. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2021.04.010>
- Relman, D. A., & Falkow, S. (2001). The meaning and impact of the human genome sequence for microbiology. *Trends in Microbiology*, 9(5), 206-208. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(01\)02041-8](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(01)02041-8)
- Ren, L., Wang, Y., Zhong, J., Li, X., Xiao, Y., Li, J., ... Shen, Z. (2021). Dynamics of the upper respiratory tract microbiota and its association with mortality in COVID-19. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 204(12), 1379-1390. <https://doi.org/10.1164/rccm.202103-0814OC>
- Ren, X., Wen, W., Fan, X., Hou, W., Su, B., Cai, P., ... Zhang, F. (2021). COVID-19 immune features revealed by a large-scale single-cell transcriptome atlas. *Cell*, 184(7), 1895-1913. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.053>
- Rhimi, W., Theelen, B., Boekhout, T., Otranto, D., & Cafarchia, C. (2020). *Malassezia spp.* yeasts of emerging concern in fungemia. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 370. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00370>
- Rogers, G. B., Hoffman, L. R., Carroll, M. P., & Bruce, K. D. (2013). Interpreting infective microbiota : The importance of an ecological perspective. *Trends in microbiology*, 21(6), 271-276. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.03.004>
- Rogers, G. B., Zain, N. M. M., Bruce, K. D., Burr, L. D., Chen, A. C., Rivett, D. W., ... Serisier, D. J. (2014). A Novel Microbiota Stratification System Predicts Future Exacerbations in Bronchiectasis. *Annals of the American Thoracic Society*, 11(4), 496-503. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201310-335OC>
- Rosas-Salazar, C., Kimura, K. S., Shilts, M. H., Strickland, B. A., Freeman, M. H., Wessinger, B. C., ... Turner, J. H. (2021). SARS-CoV-2 infection and viral load are associated with the upper respiratory tract microbiome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 147(4), 1226-1233. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.02.001>
- Rosenberg, E., & Zilber-Rosenberg, I. (2018). The hologenome concept of evolution after 10 years. *Microbiome*, 6(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0457-9>
- Roy, M. G., Livraghi-Butrico, A., Fletcher, A. A., McElwee, M. M., Evans, S. E., Boerner, R. M., ... Evans, C. M. (2014). Muc5b is required for airway defence. *Nature*, 505(7483), 412-416. <https://doi.org/10.1038/nature12807>
- Ruiz, L., Delgado, S., Ruas-Madiedo, P., Sánchez, B., & Margolles, A. (2017). Bifidobacteria and their molecular communication with the immune system. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2345. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02345>
- Safaeyan, F., Nahaei, M. R., Seifi, S. J., Kafil, H. S., & Sadeghi, J. (2015). Quantitative detection of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in patients with new influenza A (H1N1)/2009 and influenza A/2010 virus infection. *GMS Hygiene and Infection Control*, 10. <https://doi.org/10.3205/dgkh000249>
- Samaranayake, L., & Matsubara, V. H. (2017). Normal oral flora and the oral ecosystem. *Dental Clinics*, 61(2), 199-215. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2016.11.002>

- Santacroce, L., Charitos, I. A., Ballini, A., Inchingolo, F., Luperto, P., De Nitto, E., & Topi, S. (2020). The human respiratory system and its microbiome at a glimpse. *Biology*, 9(10), 318. <https://doi.org/10.3390/biology9100318>
- Sattler, S. (2017). The role of the immune system beyond the fight against infection. *The Immunology of Cardiovascular Homeostasis and Pathology*, 3-14. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57613-8_1
- Scanlan, P. D., Shanahan, F., O'Mahony, C., & Marchesi, J. R. (2006). Culture-independent analyses of temporal variation of the dominant fecal microbiota and targeted bacterial subgroups in Crohn's disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(11), 3980-3988. <https://doi.org/10.1128/JCM.00312-06>
- Scheper, G. C., Voorma, H. O., & Thomas, A. A. (1994). Basepairing with 18S ribosomal RNA in internal initiation of translation. *FEBS Letters*, 352(3), 271-275. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00975-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00975-9)
- Schmaier, A. H. (2002). The plasma kallikrein-kinin system counterbalances the renin-angiotensin system. *The Journal of clinical investigation*, 109(8), 1007-1009. <https://doi.org/10.1172/JCI15490>
- Scialo, F., Daniele, A., Amato, F., Pastore, L., Matera, M. G., Cazzola, M., ... Bianco, A. (2020). ACE2 : The Major Cell Entry Receptor for SARS-CoV-2. *Lung*, 198(6), 867-877. <https://doi.org/10.1007/s00408-020-00408-4>
- Shen, Y., Yu, F., Zhang, D., Zou, Q., Xie, M., Chen, X., ... Wang, R. (2022). Dynamic Alterations in the Respiratory Tract Microbiota of Patients with COVID-19 and its Association with Microbiota in the Gut. *Advanced Science*, 9(27), 2200956. <https://doi.org/10.1002/adv.202200956>
- Shi, L., Herrmann, J., Bou Jawde, S., Bates, J. H., Nia, H. T., & Suki, B. (2022). Modeling the influence of gravity and the mechanical properties of elastin and collagen fibers on alveolar and lung pressure-volume curves. *Scientific Reports*, 12(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16650-0>
- Shifman, S., & Darvasi, A. (2001). The value of isolated populations. *Nature Genetics*, 28(4), 309-310. <https://doi.org/10.1038/91060>
- Shilts, M. H., Rosas-Salazar, C., Strickland, B. A., Kimura, K. S., Asad, M., Sehanobish, E., ... Brown, H. M. (2022). Severe COVID-19 is associated with an altered upper respiratory tract microbiome. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 1436. <https://doi.org/10.1038/91060>
- Shinkura, R. (2021). Therapeutic immunoglobulin A antibody for dysbiosis-related diseases. *International Immunology*, 33(12), 787-790. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxab066>
- Sibila, O., Laserna, E., Shoemark, A., Keir, H. R., Finch, S., Rodrigo-Troyano, A., ... Chalmers, J. D. (2019). Airway Bacterial Load and Inhaled Antibiotic Response in Bronchiectasis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 200(1), 33-41. <https://doi.org/10.1164/rccm.201809-1651OC>
- Siegel, S. J., Roche, A. M., & Weiser, J. N. (2014). Influenza promotes pneumococcal growth during coinfection by providing host sialylated substrates as a nutrient source. *Cell host & microbe*, 16(1), 55-67. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.06.005>
- Smith, I., & Wang, L.-F. (2013). Bats and their virome : An important source of emerging viruses capable of infecting humans. *Current Opinion in Virology*, 3(1), 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.11.006>
- Sobiesk, J. L., & Munakomi, S. (2022). Anatomy, Head and Neck, Nasal Concha. In *StatPearls*. StatPearls

Publishing.

- Somsen, G. A., van Rijn, C., Kooij, S., Bem, R. A., & Bonn, D. (2020). Small droplet aerosols in poorly ventilated spaces and SARS-CoV-2 transmission. *The Lancet Respiratory Medicine*, 8(7), 658-659. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30245-9](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30245-9)
- Song, J. W., Hong, S.-B., Lim, C.-M., Koh, Y., & Kim, D. S. (2011). Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: Incidence, risk factors and outcome. *European Respiratory Journal*, 37(2), 356-363. <https://doi.org/10.1183/09031936.00159709>
- Sonnenburg, J. L., & Bäckhed, F. (2016). Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature*, 535(7610), 56-64. <https://doi.org/10.1038/nature18846>
- South, A. M., Diz, D. I., & Chappell, M. C. (2020). COVID-19, ACE2, and the cardiovascular consequences. *American journal of physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 318(5), H1084-H1090. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00217.2020>
- Stearns, J. C., Davidson, C. J., McKeon, S., Whelan, F. J., Fontes, M. E., Schryvers, A. B., ... Surette, M. G. (2015). Culture and molecular-based profiles show shifts in bacterial communities of the upper respiratory tract that occur with age. *The ISME Journal*, 9(5), 1268-1268. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.49>
- Stenmark, K. R., Frid, M. G., Gerasimovskaya, E., Zhang, H., McCarthy, M. K., Thurman, J. M., & Morrison, T. E. (2021). Mechanisms of SARS-CoV-2-induced lung vascular disease: Potential role of complement. *Pulmonary Circulation*, 11(2), 20458940211015799. <https://doi.org/10.1177/20458940211015799>
- Sura, T., Gering, V., Cammann, C., Hammerschmidt, S., Maaß, S., Seifert, U., & Becher, D. (2022). *Streptococcus pneumoniae* and Influenza A Virus Co-Infection Induces Altered Polyubiquitination in A549 Cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 817532. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.817532>
- Sze, M. A., Abbasi, M., Hogg, J. C., & Sin, D. D. (2014). A comparison between droplet digital and quantitative PCR in the analysis of bacterial 16S load in lung tissue samples from control and COPD GOLD 2. *PLoS One*, 9(10), e110351-e110351. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110351>
- Tan, L. K., Eccersley, L. R., & Sriskandan, S. (2014). Current views of haemolytic streptococcal pathogenesis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 27(2), 155-164. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000047>
- Tashiro, M., Ciborowski, P., Reinacher, M., Pulverer, G., Klenk, H.-D., & Rott, R. (1987). Synergistic role of staphylococcal proteases in the induction of influenza virus pathogenicity. *Virology*, 157(2), 421-430. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(87\)90284-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(87)90284-4)
- Thomas, S. (2020). The structure of the membrane protein of SARS-CoV-2 resembles the sugar transporter SemiSWEET. *Pathogens and Immunity*, 5(1), 342. <https://doi.org/10.20411/pai.v5i1.377>
- Tremblay K & Rousseau S. (2021, 19 mai). The Biobanque québécoise de la COVID-19 (BQC19)—A cohort to prospectively study the clinical and biological determinants of COVID-19 clinical trajectories. *PLoS One*. 2021 May 19;16(5):e0245031. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245031>
- Troyer, E. A., Kohn, J. N., & Hong, S. (2020). Are we facing a crashing wave of neuropsychiatric sequelae of

COVID-19 ? Neuropsychiatric symptoms and potential immunologic mechanisms. *Brain, Behavior, and Immunity*, 87, 34-39. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.04.027>

- Turnbaugh, P. J., Quince, C., Faith, J. J., McHardy, A. C., Yatsunen, T., Niazi, F., ... Knight, R. (2010). Organismal, genetic, and transcriptional variation in the deeply sequenced gut microbiomes of identical twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(16), 7503-7508. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002355107>
- Valenti, P., & Antonini, G. (2005). Lactoferrin : An important host defence against microbial and viral attack. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 2576-2587. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5372-0>
- Vangay, P., Ward, T., Gerber, J. S., & Knights, D. (2015). Antibiotics, pediatric dysbiosis, and disease. *Cell host & microbe*, 17(5), 553-564. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.006>
- Vassilara, F., Spyridaki, A., Pothitos, G., Deliveliotou, A., & Papadopoulos, A. (2018). A rare case of human coronavirus 229E associated with acute respiratory distress syndrome in a healthy adult. *Case Reports in Infectious Diseases*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6796839>
- Veillon, A., & Zuber, A. (1898). Recherches sur quelques microbes strictement anaérobies et leur rôle en pathologie. *Arch Med Exp*, 10, 517-545.
- Ventero, M. P., Cuadrat, R. R., Vidal, I., Andrade, B. G., Molina-Pardines, C., Haro-Moreno, J. M., ... Silveira, C. B. (2021). (2021). Nasopharyngeal Microbial Communities of Patients Infected With SARS-CoV-2 That Developed COVID-19. *Frontiers in Microbiology*, 12, 637430. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.637430>
- Ventero, M. P., Moreno-Perez, O., Molina-Pardines, C., Paytuví-Gallart, A., Boix, V., Escibano, I., ... Sánchez-Martínez, R. (2022). Nasopharyngeal microbiota as an early severity biomarker in COVID-19 hospitalised patients. *Journal of Infection*, 84(3), 329-336. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.12.030>
- Verberkmoes, N. C., Russell, A. L., Shah, M., Godzik, A., Rosenquist, M., Halfvarson, J., ... Hettich, R. L. (2009). Shotgun metaproteomics of the human distal gut microbiota. *The ISME Journal*, 3(2), 179-189. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.108>
- Verkaik, N., Nguyen, D., De Vogel, C., Moll, H., Verbrugh, H., Jaddoe, V., ... Buijs-Offerman, R. (2011). *Streptococcus pneumoniae* exposure is associated with human metapneumovirus seroconversion and increased susceptibility to in vitro HMPV infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(12), 1840-1844. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03480.x>
- Verma, D., Garg, P. K., & Dubey, A. K. (2018). Insights into the human oral microbiome. *Archives of Microbiology*, 200(4), 525-540. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1505-3>
- Vliagoftis, H., Kouranos, V. D., Betsi, G. I., & Falagas, M. E. (2008). Probiotics for the treatment of allergic rhinitis and asthma : Systematic review of randomized controlled trials. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 101(6), 570-579. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)60219-0](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)60219-0)
- Vu, H. T. T., Yoshida, L. M., Suzuki, M., Nguyen, H. A. T., Nguyen, C. D. L., Nguyen, A. T. T., ... Vu, T. D. (2011). Association between nasopharyngeal load of *Streptococcus pneumoniae*, viral coinfection, and radiologically confirmed pneumonia in Vietnamese children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 30(1), 11-18. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3181f111a2>

- Wagner Mackenzie, B., Chang, K., Zoing, M., Jain, R., Hoggard, M., Biswas, K., ... Taylor, M. W. (2019). Longitudinal study of the bacterial and fungal microbiota in the human sinuses reveals seasonal and annual changes in diversity. *Scientific Reports*, 9(1), 17416. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53975-9>
- Wang, J. H., Kwon, H. J., & Jang, Y. J. (2009). Rhinovirus enhances various bacterial adhesions to nasal epithelial cells simultaneously. *The Laryngoscope*, 119(7), 1406-1411. <https://doi.org/10.1002/lary.20498>
- Wang, L.-F., & Anderson, D. E. (2019). Viruses in bats and potential spillover to animals and humans. *Current Opinion in Virology*, 34, 79-89. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.12.007>
- Wang, W.-L., Xu, S.-Y., Ren, Z.-G., Tao, L., Jiang, J.-W., & Zheng, S.-S. (2015). Application of metagenomics in the human gut microbiome. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 21(3), 803. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i3.803>
- Weibel, E. R. (2017). Lung morphometry : The link between structure and function. *Cell and Tissue Research*, 367(3), 413-426. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2541-4>
- Whelan, F. J., Verschoor, C. P., Stearns, J. C., Rossi, L., Luinstra, K., Loeb, M., ... Bowdish, D. M. (2014). The loss of topography in the microbial communities of the upper respiratory tract in the elderly. *Annals of the American Thoracic Society*, 11(4), 513-521. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201310-351OC>
- WHO. (2003, 31 décembre). Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003. <https://www.who.int/publications/m/item/summary-of-probable-sars-cases-with-onset-of-illness-from-1-november-2002-to-31-july-2003>
- Wilson, B. C., Butler, É. M., Grigg, C. P., Derraik, J. G., Chiavaroli, V., Walker, N., ... Vatanen, T. (2021). Oral administration of maternal vaginal microbes at birth to restore gut microbiome development in infants born by caesarean section : A pilot randomised placebo-controlled trial. *EBioMedicine*, 69, 103443. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103443>
- Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain : The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11), 5088-5090. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088>
- World Health Organization. (2022, 2 novembre). WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. <https://covid19.who.int>
- Wu, D., Hou, C., Li, Y., Zhao, Z., Liu, J., Lu, X., ... Xin, Y. (2014). Analysis of the bacterial community in chronic obstructive pulmonary disease sputum samples by denaturing gradient gel electrophoresis and real-time PCR. *BMC Pulmonary Medicine*, 14, 179-179. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-14-179>
- Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y.-M., Wang, W., Song, Z.-G., ... Zhang, Y.-Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 579(7798), 265-269. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
- Wypych, T. P., Wickramasinghe, L. C., & Marsland, B. J. (2019). The influence of the microbiome on respiratory health. *Nature Immunology*, 20(10), 1279-1290. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0451-9>
- Yesudhas, D., Srivastava, A., & Gromiha, M. M. (2021). COVID-19 outbreak : History, mechanism, transmission,

structural studies and therapeutics. *Infection*, 49, 199-213. <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01516-2>

- Yu, G., Phillips, S., Gail, M. H., Goedert, J. J., Humphrys, M. S., Ravel, J., ... Caporaso, N. E. (2017). The effect of cigarette smoking on the oral and nasal microbiota. *Microbiome*, 5(1), 3-3. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0226-6>
- Yusof, M. F., Eltahir, Y. M., Serhan, W. S., Hashem, F. M., Elsayed, E. A., Marzoug, B. A., ... Al Muhairi, S. S. (2015). Prevalence of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) in dromedary camels in Abu Dhabi emirate, United Arab Emirates. *Virus Genes*, 50(3), 509-513. <https://doi.org/10.1007/s11262-015-1174-0>
- Zanetta, P., Squarzanti, D. F., Sorrentino, R., Rolla, R., Aluffi Valletti, P., Garzaro, M., ... Azzimonti, B. (2021). Oral microbiota and vitamin D impact on oropharyngeal squamous cell carcinogenesis: A narrative literature review. *Critical Reviews in Microbiology*, 47(2), 224-239. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1872487>
- Zaneveld, J. R., McMinds, R., & Vega Thurber, R. (2017). Stress and stability: Applying the Anna Karenina principle to animal microbiomes. *Nature Microbiology*, 2(9), 1-8. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.121>
- Zanza, C., Romenskaya, T., Manetti, A. C., Franceschi, F., La Russa, R., Bertozzi, G., ... Longhitano, Y. (2022). Cytokine storm in COVID-19: Immunopathogenesis and therapy. *Medicina*, 58(2), 144. <https://doi.org/10.3390/medicina58020144>
- Zaura, E., Keijsers, B. J. F., Huse, S. M., & Crielaard, W. (2009). Defining the healthy « core microbiome » of oral microbial communities. *BMC Microbiology*, 9, 259-259. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-259>
- Zhang, H., Fu, W., & Xu, Z. (2015). Re-epithelialization: A key element in tracheal tissue engineering. *Regenerative medicine*, 10(8), 1005-1023. <https://doi.org/10.2217/rme.15.68>
- Zhang, X. S., & Duchaine, C. (2020). SARS-CoV-2 and health care worker protection in low-risk settings: A review of modes of transmission and a novel airborne model involving inhalable particles. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(1), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/CMR.00184-20>
- Zhang, Y., D'Souza, G., Fakhry, C., Bigelow, E. O., Usyk, M., Burk, R. D., & Zhao, N. (2022). Oral Human Papillomavirus Associated With Differences in Oral Microbiota Beta Diversity and Microbiota Abundance. *The Journal of Infectious Diseases*, 226(6), 1098-1108. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiac010>
- Zou, X., Chen, K., Zou, J., Han, P., Hao, J., & Han, Z. (2020). Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Frontiers of Medicine*, 14(2), 185-192. <https://doi.org/10.1007/s11684-020-0754-0>
- Zuo, T., Wu, X., Wen, W., & Lan, P. (2021). Gut microbiome alterations in COVID-19. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 19(5), 679-688. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2021.09.004>

CERTIFICATION ÉTHIQUE

Ce mémoire a fait l'objet d'une certification éthique. Le numéro du certificat est IDs: 2022-388, 2021-026.

ANNEXE 1

Supplementary Information File

Bacterial biomarkers of the oropharyngeal and oral cavity during SARS-CoV-2 infection

William Bourumeau, Karine Tremblay, Luigi Bouchard, Guillaume Jourdan, Catherine Girard, Catherine Laprise

Supplementary Figures

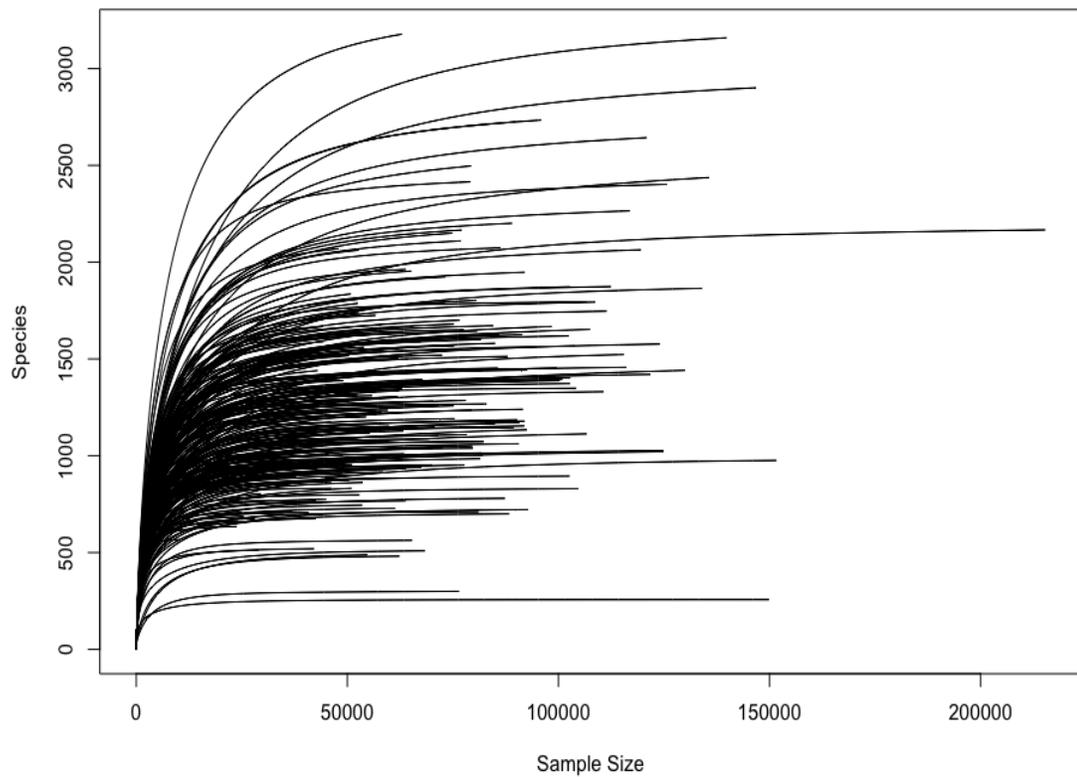


Figure 8. Multiple rarefaction curves

Rarefaction curves showing samples of the positive test (PT) and negative test (NT) groups using the `rarecurve()` function on R from `vegan` package (version 2.6.2) has been realized from steps of 50. Saturation is close for all our samples at around 60,000 reads. As a very small minority of samples had less than 60k reads, no rarefaction was applied to retain the maximum of information per sample.

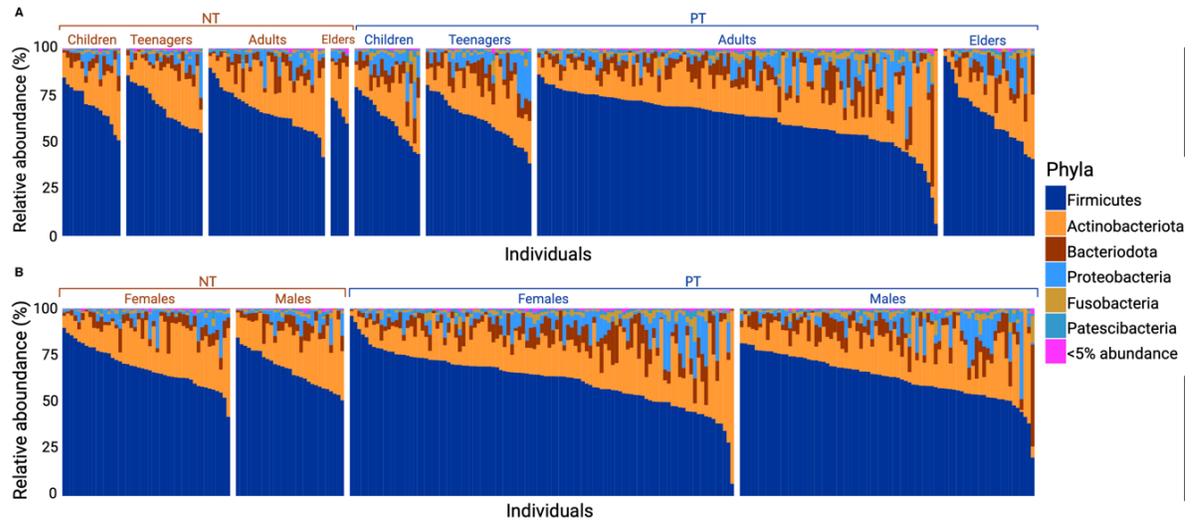


Figure 9. Barplot of relative abundance of phyla in samples of the positive test and negative test groups by sex or age category

This graph shows the relative abundance of phyla present in each sample. **(A)** shows the most abundant phyla among: NT children, NT teenagers, NT adults, NT elders, PT children, PT teenagers, PT adults, PT elders. **(B)** shows the most abundant phyla among: NT Female, NT Males, PT Females, PT Males. Phyla representing less than 5% of all samples were grouped into the "<5% abundance" group.

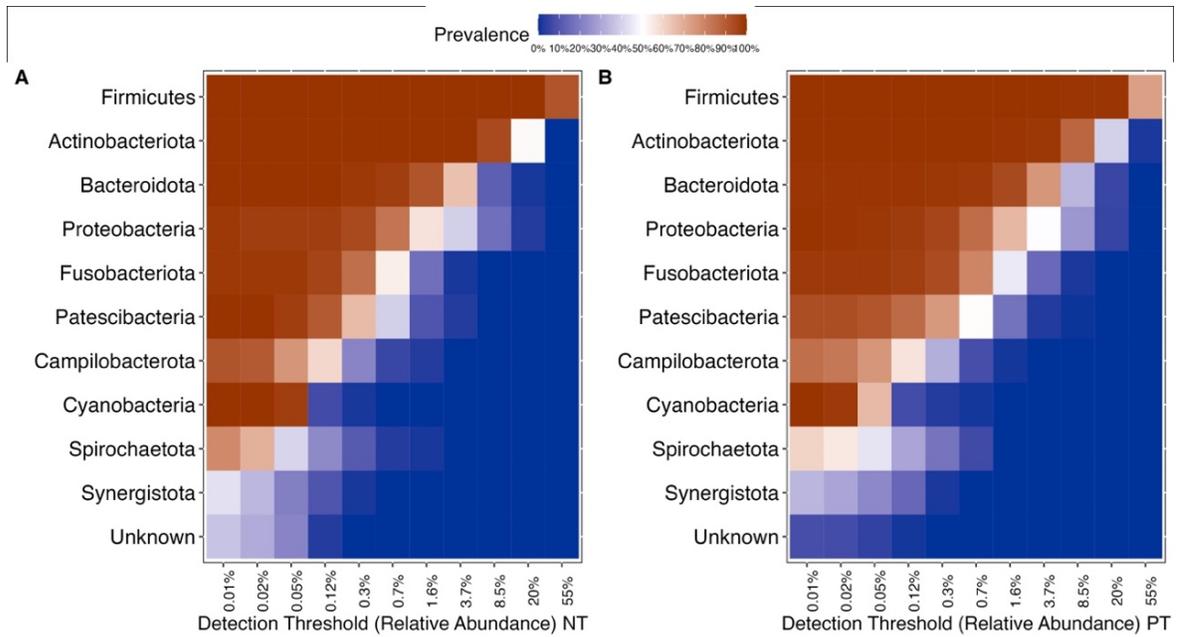


Figure 10. Heatmap of the most abundant phyla

The heatmap allows us to analyze and visualize the multidimensional data in samples of the negative test (NT) and positive test (PT) groups. The detection threshold of the relative abundance is on the abscissa and the genera on the ordinate. Color shows the prevalence of each phyla in terms of relative abundance. Color intensity shows the percentage in a sample, referring to the prevalence color key.

Supplementary Tables

Table 5. Data measured after extraction of gargal DNA, measured at Qubit™ using the Invitrogen™ Qubit™ 1X dsDNA Broad Range (BR) protocol (ThermoFischer Scientific.)

Covid	Sample ID	Original sample conc, (ng/μL)	260/280	Covid	Sample ID	Original sample conc, (ng/μL)	260/280
COVID -	1	28,3	1,89	COVID +	1	0,708	1,55
COVID -	2	4,2	2,21	COVID +	2	2,56	1,59
COVID -	3	5,96	2,45	COVID +	3	13,2	1,95
COVID -	4	0,1	1,59	COVID +	4	3,54	1,74
COVID -	5	14,9	1,83	COVID +	4	2,45	1,94
COVID -	6	0,692	1,89	COVID +	5	3,87	1,95
COVID -	7	15,2	1,84	COVID +	6	0,1	4,56
COVID -	8	Out of range	1,27	COVID +	7	9,08	1,89
COVID -	9	4,68	1,18	COVID +	8	18,4	1,86
COVID -	10	Out of range	1,93	COVID +	9	0,708	1,41
COVID -	11	0,596	0,4	COVID +	10	4,72	1,95
COVID -	12	Out of range	3,4	COVID +	11	3,04	1,53
COVID -	13	12,8	1,81	COVID +	12	15,2	1,79
COVID -	14	Out of range	1,61	COVID +	13	0,7	1,44
COVID -	15	Out of range	0,51	COVID +	14	10,2	1,7
COVID -	16	0,54	0,29	COVID +	15	0,776	1,35
COVID -	17	Out of range	1,6	COVID +	16	0,672	1,41
COVID -	18	Out of range	1,19	COVID +	17	31,8	1,79
COVID -	19	Out of range	1,17	COVID +	18	2,91	1,73
COVID -	20	0,58	1,52	COVID +	19	50,8	1,81
COVID -	21	Out of range	1,58	COVID +	20	2,44	2,21
COVID -	22	0,532	1,13	COVID +	21	13,2	1,89
COVID -	23	0,84	2,69	COVID +	22	0,564	2,58

COVID -	24	1,78	1,94	COVID +	23	0,424	0,93
COVID -	25	4,6	1,75	COVID +	24	5,28	1,81
COVID -	26	Out of range	1,06	COVID +	25	2,76	1,87
COVID -	27	Out of range	3,36	COVID +	26	7,4	1,96
COVID -	28	Out of range	0,59	COVID +	27	4,6	1,74
COVID -	29	Out of range	0,74	COVID +	28	0,588	2,57
COVID -	30	Out of range	0,93	COVID +	29	3,78	2,31
COVID -	31	Out of range	1	COVID +	30	9,64	2,2
COVID -	32	Out of range	1,41	COVID +	31	Out of range	2,39
COVID -	33	Out of range	1,38	COVID +	32	4	2,07
COVID -	34	Out of range	78,39	COVID +	33	3,38	2,14
COVID -	35	0,496	1,36	COVID +	34	5,68	1,88
COVID -	36	Out of range	4,82	COVID +	35	47,2	1,91
COVID -	37	0,4	3,42	COVID +	36	12,2	1,98
COVID -	38	Out of range	-3,92	COVID +	37	6,2	1,9
COVID -	39	Out of range	1,23	COVID +	38	1,59	2,19
COVID -	40	Out of range	1,11	COVID +	39	1,94	1,84
COVID -	41	10,5	2,14	COVID +	40	0,884	1,4
COVID -	42	Out of range	49,79	COVID +	41	2,91	1,73
COVID -	43	Out of range	14,97	COVID +	42	6,6	1,78
COVID -	44	Out of range	12,89	COVID +	43	16,9	1,8
COVID -	45	0,448	-5,07	COVID +	44	1,18	1,7
COVID -	46	2,55	3,57	COVID +	45	10,1	1,91
COVID -	47	Out of range	-6,64	COVID +	46	1,4	1,5
COVID -	48	Out of range	-1,25	COVID +	47	2,63	1,84
COVID -	49	Out of range	-3,22	COVID +	48	2,54	2,03
COVID -	50	Out of range	-1	COVID +	49	34,9	1,87
COVID -	51	Out of range	1,05	COVID +	50	25,2	1,87

COVID -	52	Out of range	-0,26	COVID +	51	54,4	1,85
COVID -	53	7,08	2,02	COVID +	52	2,62	1,93
COVID -	54	Out of range	0,93	COVID +	53	2,2	1,79
COVID -	55	0,784	3,99	COVID +	54	1,93	2,49
COVID -	56	Out of range	3,31	COVID +	55	1,32	2,38
COVID -	57	1,07	1,66	COVID +	56	2,71	1,51
COVID -	58	0,428	1,76	COVID +	57	1,92	1,65
COVID -	59	2,12	1,64	COVID +	58	2,45	2,08
COVID -	60	0,604	2,12	COVID +	59	11,4	1,82
COVID -	61	6,48	1,92	COVID +	60	6,6	1,9
COVID -	62	Out of range	1,84	COVID +	61	1,68	1,82
COVID -	63	1,22	2,93	COVID +	62	0,812	2,29
COVID -	64	8,8	1,82	COVID +	63	1,42	2,07
COVID -	65	1,16	3,73	COVID +	64	Out of range	1,77
COVID -	66	2,21	1,8	COVID +	65	Out of range	3,28
COVID -	67	0,976	1,76	COVID +	66	3,27	1,75
COVID -	68	Out of range	2,03	COVID +	67	4,08	2,56
COVID -	69	3,87	2,05	COVID +	68	16,7	1,91
COVID -	70	0,404	1,52	COVID +	69	2,14	1,98
COVID -	71	0,424	1,15	COVID +	70	1,34	2,64
COVID -	72	0,432	1,67	COVID +	71	0,552	1,95
COVID -	73	Out of range	2,39	COVID +	72	8,24	1,81
COVID -	74	0,844	1,37	COVID +	73	0,796	1,62
COVID -	75	Out of range	1,84	COVID +	74	17,3	1,85
COVID -	76	0,996	1,59	COVID +	75	1,14	1,55
COVID -	77	3,6	1,12	COVID +	76	1,55	1,68
COVID -	78	8,2	1,46	COVID +	77	1,42	1,85
COVID -	79	3,1	1,29	COVID +	78	4,44	2

COVID -	80	20	1,54	COVID +	79	3,16	1,5
COVID -	80	3,5	1,36	COVID +	80	2,29	1,8
COVID -	82	2,8	1,5	COVID +	81	10,7	1,64
COVID -	83	3	1,81	COVID +	82	11	1,99
COVID -	84	2,2	1,65	COVID +	83	5,2	1,62
COVID -	85	5,5	2	COVID +	84	0,868	1,61
COVID -	86	2,5	2,13	COVID +	85	4,16	2,08
COVID -	87	5	1,96	COVID +	86	0,824	1,54
COVID -	88	3,94	1,5	COVID +	87	2,26	1,73
COVID -	89	3,27	1,95	COVID +	88	6,08	2,4
COVID -	90	5,12	1,93	COVID +	89	3,37	2,1
COVID -	91	1,56	2,72	COVID +	90	4,28	1,76
COVID -	92	1,29	1,6	COVID +	91	3,87	2,05
COVID -	93	Out of range	1,41	COVID +	92	0,716	1,88
COVID -	94	0,788	1,31	COVID +	93	8,92	1,68
COVID -	95	0,596	3,18	COVID +	94	7,64	1,84
COVID -	96	0,612	1,42	COVID +	95	13,3	2,02
COVID -	97	2,34	1,8	COVID +	96	1,79	1,93
COVID -	98	0,52	1,31	COVID +	97	3,04	2,09
COVID -	99	0,728	1,46	COVID +	98	14,4	1,84
COVID -	100	7,4	2,08	COVID +	99	1,88	1,97
				COVID +	100	0,764	2,44
				COVID +	101	10,5	1,94
				COVID +	102	11,5	1,87
				COVID +	103	5,08	1,68
				COVID +	104	0,768	2,02
				COVID +	105	1,46	2,9
				COVID +	106	3,94	1,87

COVID +	107	Out of range	2,58
COVID +	108	13	1,94
COVID +	109	7,92	1,8
COVID +	110	3,17	1,9
COVID +	111	4,2	2,24
COVID +	112	5,44	1,84
COVID +	113	0,644	1,75
COVID +	114	1,02	1,56
COVID +	115	5,96	1,86
COVID +	116	46,4	1,84
COVID +	117	4,6	1,96
COVID +	118	6,08	1,74
COVID +	119	Out of range	1,48
COVID +	120	11,7	2,01
COVID +	121	9,12	1,9
COVID +	122	11,7	1,81
COVID +	123	10,6	2,04
COVID +	124	15,1	1,95
COVID +	125	4	2,12
COVID +	126	3,42	2,33
COVID +	127	2,86	3
COVID +	128	1,2	3,27
COVID +	129	19	1,98
COVID +	130	0,452	2,02
COVID +	131	8,6	2,06
COVID +	132	3,65	1,72
COVID +	133	3,72	1,74
COVID +	134	15,5	1,86

COVID +	135	17,1	1,93
COVID +	136	7,52	2,09
COVID +	137	0,992	1,7
COVID +	138	8,92	1,89
COVID +	139	1,16	1,72
COVID +	140	Out of range	2,04
COVID +	141	6,4	1,89
COVID +	142	32,4	1,82
COVID +	143	6,32	1,93
COVID +	144	10,6	1,92
COVID +	145	4,32	2,36
COVID +	146	23,2	1,92
COVID +	147	0,596	2,93
COVID +	148	13,8	1,86
COVID +	149	2,47	2,01
COVID +	150	38,2	1,88
COVID +	151	6	1,75
COVID +	152	6,88	1,86
COVID +	153	1,93	1,58
COVID +	154	1,38	3,66
COVID +	155	1,27	2,17
COVID +	156	4,84	2,24
COVID +	157	2,64	3,04
COVID +	158	0,848	-0,71
COVID +	159	Out of range	1,72
COVID +	160	4,36	2,28
COVID +	161	1,54	1,57
COVID +	162	0,668	4,82

COVID +	163	15	1,9
COVID +	164	1,23	2,82
COVID +	165	15,9	1,96
COVID +	166	3,82	2,36
COVID +	167	1,71	14,95
COVID +	168	6,28	2,36
COVID +	169	31,2	1,97
COVID +	170	3,02	3,45
COVID +	171	9,32	2,08
COVID +	172	2,74	3,3
COVID +	173	1,89	2,5
COVID +	174	11,5	1,87
COVID +	175	38,6	1,89
COVID +	176	2,29	1,59
COVID +	177	12,4	1,87
COVID +	178	4,84	1,96
COVID +	179	1,37	19,1
COVID +	180	4,64	1,82
COVID +	181	5,32	2,09
COVID +	182	5,88	1,74
COVID +	183	49,6	1,84
COVID +	184	24,3	1,84
COVID +	185	5,88	1,81
COVID +	186	38,3	1,82
COVID +	187	8,4	2,03
COVID +	188	Out of range	1,58
COVID +	189	6,6	2,32
COVID +	190	2,32	1,69

COVID +	191	13,5	1,89
COVID +	192	17,4	1,89
COVID +	193	4,28	1,95
COVID +	194	4,12	2,27
COVID +	195	10,3	2
COVID +	196	26,2	1,92
COVID +	197	9,4	2,01
COVID +	198	15,4	2,05
COVID +	199	2,37	2,2
COVID +	200	0,86	2,14

Table 6. Sequencing results and number of remaining sequences with each step of data processing from the DADA2 pipeline

Covid	Sample ID	DADA2 pipeline					
		input	filtered	denoisedF ^(a)	denoisedR ^(b)	merged ^(c)	nonchim ^(d)
COVID -	1	172420	170539	169401	169808	168706	63583
COVID -	10	263549	260460	259348	259714	258639	101214
COVID -	11	257894	255268	254251	254431	253446	93021
COVID -	12	258107	255408	254412	254669	253699	88405
COVID -	13	317997	314214	312764	313421	312043	114845
COVID -	14	315143	311633	309963	310548	308931	123352
COVID -	15	342225	338573	337723	337936	337104	125835
COVID -	16	47275	46444	45356	46110	45057	20275
COVID -	17	308485	304892	303861	303994	302988	105183
COVID -	18	143005	141194	140427	140564	139818	64499
COVID -	19	260311	257058	255824	256305	255097	108113
COVID -	2	182912	180905	179690	180157	178970	74302
COVID -	20	182266	180262	179107	179581	178452	64235
COVID -	21	309307	305833	305018	304709	303922	153906
COVID -	22	239432	236604	235329	235968	234719	93885
COVID -	24	202541	200194	199213	199443	198503	73637
COVID -	25	123252	121695	120393	121060	119800	51159
COVID -	27	253642	250555	249638	249883	249001	87979
COVID -	28	134245	132778	132012	132432	131690	49657
COVID -	29	350193	346571	344946	345558	343964	136018
COVID -	3	180054	177985	177152	177345	176539	65274
COVID -	30	166233	164411	162789	163450	161856	67593
COVID -	31	256299	253222	251994	252326	251136	92610
COVID -	32	204615	202459	202018	202064	201661	69661

COVID -	33	233615	229799	228737	229139	228105	93498
COVID -	34	224070	221476	220525	220881	219948	80997
COVID -	35	229846	227337	226253	226189	225139	82379
COVID -	36	335815	331951	330032	330730	328873	130053
COVID -	37	259396	256334	255278	255447	254419	77494
COVID -	38	267266	264497	262981	263451	261962	111088
COVID -	39	136860	135343	134193	134508	133375	40043
COVID -	4	269754	266893	265856	265778	264779	92632
COVID -	40	300308	296874	295665	295957	294771	109976
COVID -	41	192348	190395	189246	189681	188564	76538
COVID -	42	172764	170738	169699	170088	169082	61823
COVID -	43	246190	242826	241758	242267	241232	93686
COVID -	44	223219	220505	219627	219641	218786	85927
COVID -	45	216651	213485	212514	212644	211699	73931
COVID -	46	174923	172905	171931	172330	171384	76530
COVID -	47	197285	195074	194237	194585	193776	82370
COVID -	48	185275	183104	182305	182537	181760	68730
COVID -	5	293497	290110	289162	289602	288681	125943
COVID -	51	143477	141624	140755	141118	140273	54335
COVID -	52	143407	141290	140644	140536	139932	51630
COVID -	53	276528	273509	271993	272398	270934	98497
COVID -	54	143797	142144	141273	141385	140561	54614
COVID -	55	178067	176170	174854	175275	173985	63863
COVID -	56	161250	158853	158129	158363	157674	59641
COVID -	57	127295	125735	124637	124985	123921	47087
COVID -	58	64062	62942	62224	62601	61913	25502
COVID -	59	180448	178503	177255	177846	176624	57562
COVID -	6	244628	242052	240970	241088	240035	83097

COVID -	60	133375	131765	130903	131114	130282	40940
COVID -	61	219541	217039	215761	216102	214881	84846
COVID -	62	246320	242276	241396	241460	240605	90647
COVID -	65	218657	216365	215448	215727	214832	70709
COVID -	66	144267	142484	141836	142034	141422	65069
COVID -	67	156738	155049	154164	154621	153761	51048
COVID -	68	178658	176529	176059	176173	175729	64751
COVID -	69	203064	200744	199308	199904	198515	69805
COVID -	7	278105	274919	273777	274108	273021	106501
COVID -	70	187126	184961	183875	184573	183515	68603
COVID -	72	250678	247922	246546	246870	245555	88247
COVID -	73	152976	151208	150242	150306	149382	56318
COVID -	74	290609	286996	286399	286370	285798	106756
COVID -	75	431984	427212	425464	425592	423885	138737
COVID -	76	269479	266464	265415	265520	264497	103168
COVID -	77	254758	252111	250442	250874	249253	91181
COVID -	78	208859	206494	205374	205742	204645	82892
COVID -	79	167829	166003	165078	165571	164679	72485
COVID -	8	309952	306577	305531	305857	304851	113628
COVID -	80	215850	213461	212472	212814	211847	80289
COVID -	81	237036	234401	233322	233546	232502	102209
COVID -	9	271849	268898	267632	268171	266941	104911
COVID +	1	399365	395771	393947	394484	392739	133432
COVID +	10	114500	113569	112843	113272	112558	53881
COVID +	100	96676	95849	95368	95508	95036	29784
COVID +	101	121209	120136	119137	119432	118460	42606
COVID +	102	106209	105243	104642	104695	104137	38929
COVID +	103	147613	146246	146010	146083	145868	82221

COVID +	104	176909	175356	174469	174747	173870	62703
COVID +	105	107281	106329	105548	105680	104909	33156
COVID +	106	217918	215901	214838	215355	214305	66920
COVID +	107	181400	179761	179190	179399	178851	90179
COVID +	108	129544	128386	127248	127750	126644	49509
COVID +	109	112254	111231	110493	110826	110102	38343
COVID +	11	111879	110956	110004	110547	109622	55915
COVID +	110	127444	126288	125447	125829	125002	43875
COVID +	112	164702	163312	162769	162733	162197	43358
COVID +	113	144996	143799	143063	143094	142372	47248
COVID +	114	163851	162417	161439	161466	160507	54472
COVID +	115	371821	368393	366020	366830	364498	142785
COVID +	116	123966	122884	122064	122366	121559	51542
COVID +	117	119291	118175	117566	117749	117168	50906
COVID +	118	125538	124462	123905	124259	123715	48436
COVID +	119	117313	116245	116106	116196	116064	63045
COVID +	12	197735	195982	194660	195233	193951	78553
COVID +	120	155365	154076	153431	153466	152838	51360
COVID +	121	134765	133506	132953	133040	132516	46650
COVID +	122	164475	163032	162151	162365	161508	53850
COVID +	123	198779	196979	196471	196681	196194	106145
COVID +	124	195877	194142	193402	193415	192695	78303
COVID +	125	226862	224907	223747	224058	222907	84462
COVID +	126	134583	133384	132331	132730	131694	43747
COVID +	127	141462	140251	139364	139430	138567	47384
COVID +	128	148849	147537	146703	146754	145955	51934
COVID +	129	116593	115514	115001	114972	114470	32554
COVID +	13	154695	153421	151809	152635	151068	55301

COVID +	131	184419	182703	181548	181469	180335	53435
COVID +	132	147081	145739	144373	144913	143573	45063
COVID +	133	270929	268475	267146	267615	266315	124336
COVID +	134	331180	328213	327057	327299	326177	116488
COVID +	135	430960	427131	425097	426004	423998	149999
COVID +	137	166334	164914	164273	164291	163671	54325
COVID +	138	120071	119014	118413	118486	117901	40875
COVID +	139	198436	196653	195713	195973	195048	71522
COVID +	14	97383	96533	95917	96242	95648	36350
COVID +	140	176539	174877	174171	174273	173584	61610
COVID +	141	160501	158967	158135	158423	157612	63154
COVID +	142	193136	191324	190094	190506	189307	74966
COVID +	143	149479	148189	147628	147635	147086	55982
COVID +	144	153822	152426	151481	151865	150942	69479
COVID +	145	174449	172770	171796	171940	171006	52278
COVID +	147	158393	156941	156051	156083	155212	51947
COVID +	148	184415	182784	181837	182085	181149	56934
COVID +	149	178023	176449	175808	175591	174962	65939
COVID +	15	202653	200928	199765	200327	199193	67530
COVID +	150	118160	117081	116023	116187	115197	49150
COVID +	151	125259	124092	123156	123300	122396	55025
COVID +	152	158618	157224	156693	156646	156120	52814
COVID +	153	219393	217365	216325	216679	215656	72654
COVID +	154	176977	175409	174664	174968	174234	63452
COVID +	155	182136	180608	180013	180298	179715	65698
COVID +	156	193284	191536	190784	190680	189942	51514
COVID +	157	178632	177042	175596	176037	174623	76191
COVID +	158	235310	233275	232505	232187	231430	87028

COVID +	16	164213	162858	161554	162143	160893	81915
COVID +	160	52396	51852	51242	51623	51021	27086
COVID +	161	164334	162757	162316	162346	161933	82147
COVID +	164	180827	179324	177568	178202	176547	61590
COVID +	165	283193	280744	278314	279747	277399	86589
COVID +	166	138820	137504	135904	136769	135217	61987
COVID +	167	120755	119695	118556	119137	118031	41362
COVID +	168	144288	142941	141535	142127	140751	55970
COVID +	169	119867	118797	117565	118242	117048	50122
COVID +	17	205017	203375	201670	202427	200777	88415
COVID +	170	142587	141397	139913	140778	139324	51181
COVID +	171	69839	69143	68535	68900	68304	29583
COVID +	173	104303	103375	101724	102524	100917	44787
COVID +	174	89322	88456	87817	87978	87383	29182
COVID +	175	65686	65072	63928	64652	63541	25114
COVID +	176	143862	142730	141634	142079	141011	50575
COVID +	177	370244	366673	366165	365985	365539	154961
COVID +	178	309361	306659	305443	305819	304610	99957
COVID +	179	218633	216648	214987	215450	213827	65395
COVID +	18	125022	123944	123034	123566	122683	48357
COVID +	180	245587	243455	242257	242357	241175	92862
COVID +	181	207281	205409	203936	204457	203025	55716
COVID +	183	579887	574724	572985	573259	571586	221193
COVID +	184	226763	224779	223665	224326	223232	76429
COVID +	185	237319	234967	233993	234114	233185	113879
COVID +	186	185395	183808	182746	183218	182174	76550
COVID +	187	246973	244673	244070	244223	243638	106901
COVID +	188	245036	242921	241754	242139	240994	87848

COVID +	189	345224	341833	340156	340788	339154	120445
COVID +	19	94797	94015	93261	93525	92795	36657
COVID +	190	215145	213156	211661	212117	210647	83441
COVID +	191	206485	204529	203351	203729	202593	74390
COVID +	192	267979	265572	263913	264597	262984	95111
COVID +	2	121789	120737	119755	120178	119225	44130
COVID +	20	76070	75464	74763	75133	74445	25591
COVID +	21	191867	190126	189269	189418	188611	83109
COVID +	22	197054	195355	194085	194557	193329	70022
COVID +	23	110233	109303	108571	109051	108346	43858
COVID +	24	187889	186294	183944	185336	183017	66946
COVID +	25	176937	175273	174220	174582	173563	72417
COVID +	26	95466	94618	93228	94021	92664	40835
COVID +	27	206846	204937	203920	204024	203048	80512
COVID +	28	75084	74317	73589	73986	73279	26946
COVID +	29	231629	229624	228154	228885	227454	118370
COVID +	3	274429	272002	270041	270751	268857	121440
COVID +	30	123351	122242	120640	121595	120030	57346
COVID +	31	92809	92046	91609	91734	91318	41386
COVID +	32	84462	83741	83087	83357	82725	45462
COVID +	33	144774	143403	142399	142775	141794	43231
COVID +	34	255705	253527	251813	252589	250919	104557
COVID +	35	155095	153686	151867	152748	150983	60367
COVID +	36	105197	104335	103585	103869	103142	46929
COVID +	37	111594	110618	109494	110225	109146	52784
COVID +	38	195616	193942	193520	193474	193078	88729
COVID +	39	150931	149623	148233	148544	147206	58292
COVID +	4	188941	187280	186140	186553	185455	91316

COVID +	40	118522	117506	116734	117077	116337	50275
COVID +	41	198923	197269	196375	196445	195574	82823
COVID +	42	139225	137962	137041	137294	136401	53744
COVID +	43	188981	187231	185599	185910	184341	79096
COVID +	44	171461	169968	169299	169508	168866	84461
COVID +	45	175506	174013	173124	173567	172703	62305
COVID +	46	188043	186416	185738	186061	185404	82435
COVID +	47	209935	208360	206721	207632	206042	77599
COVID +	48	175756	174255	173417	173835	173037	84088
COVID +	49	216811	214877	213772	214183	213106	94675
COVID +	5	245346	243321	242268	242815	241782	125984
COVID +	50	150423	149165	148017	148496	147403	57536
COVID +	51	185662	184087	182293	183320	181595	79778
COVID +	52	27117	26625	25952	26314	25676	11172
COVID +	53	100982	100209	99501	99731	99037	31023
COVID +	54	110305	109306	108569	108729	108027	47264
COVID +	55	155364	154033	152784	153412	152193	51076
COVID +	56	177516	176050	175078	175579	174630	68595
COVID +	57	127792	126634	125236	125955	124596	57685
COVID +	58	199092	197536	196650	197187	196320	92968
COVID +	6	144607	143319	141831	142683	141229	47084
COVID +	60	175685	174325	173059	173459	172214	53958
COVID +	61	94966	94128	92832	93661	92409	41098
COVID +	62	145455	144118	143049	143398	142370	64982
COVID +	63	192905	183438	181082	182185	180013	81673
COVID +	64	168603	167171	166296	166717	165863	53892
COVID +	65	228448	226633	225490	225873	224775	88143
COVID +	66	90047	89195	88092	88707	87642	46908

COVID +	67	171568	170112	169173	169448	168531	62595
COVID +	68	90699	89957	89173	89603	88852	43728
COVID +	69	141341	139900	138959	139314	138403	59877
COVID +	7	173783	172349	171360	171578	170623	53974
COVID +	70	160087	158618	158070	158265	157723	67125
COVID +	71	316706	314122	311847	312938	310705	114371
COVID +	72	116608	115653	114625	115184	114178	46413
COVID +	73	87589	86765	85761	86208	85247	36333
COVID +	74	166749	165257	163884	164385	163090	74820
COVID +	75	247878	245630	243967	244665	243039	106142
COVID +	76	166320	164887	163579	163978	162704	62881
COVID +	77	150624	149420	148108	148925	147637	48050
COVID +	78	144313	142931	141819	142480	141406	60607
COVID +	79	109207	108235	106855	107820	106486	40326
COVID +	8	180137	178666	177280	177761	176421	79746
COVID +	80	144989	143515	142964	143079	142552	70753
COVID +	81	57599	57028	56151	56555	55741	22540
COVID +	82	222045	220088	218750	218680	217375	61408
COVID +	83	172043	170601	169283	169355	168061	54295
COVID +	84	217131	215274	213958	214402	213112	53389
COVID +	85	176413	174838	173679	174022	172873	52991
COVID +	86	175984	174437	173231	173553	172368	53366
COVID +	87	293234	290585	288883	289109	287433	91833
COVID +	88	136096	134870	134098	134326	133572	52530
COVID +	89	189917	188285	187397	187543	186681	58511
COVID +	9	139647	138429	137301	137851	136745	43897
COVID +	90	108089	107209	106266	106662	105729	29279
COVID +	91	199074	197171	195690	196314	194879	67419

COVID +	92	136048	134956	134413	134428	133901	57276
COVID +	93	134377	133141	132610	132552	132035	51449
COVID +	94	85302	84531	84157	84214	83854	37403
COVID +	95	124871	123747	123250	123268	122782	44950
COVID +	96	130925	129745	128977	129058	128306	51802
COVID +	97	113598	112539	111746	111889	111118	45622
COVID +	98	117010	115929	115051	115311	114473	48119
COVID +	99	123184	122050	121353	121412	120734	35152

(a)denoisedF: number of reads remaining for Forward (F) files after the modeling and sequencing error correction (denoising). (b)denoisedR: number of reads remaining for Reverse (R) files after the modeling and sequencing error correction (denoising). (c)merged: number of reads remaining after merging the Forward and Reverse pairs to create a complete sequence. (d)nonchim: final number of reads after elimination of chimeras created during PCR DNA amplification.).