



**HAL**  
open science

# Étude moléculaire du gène G complet du virus respiratoire syncytial humain (HRSV) groupe A circulant en Normandie : quinze ans d'évolution

Justine Moriceau

► **To cite this version:**

Justine Moriceau. Étude moléculaire du gène G complet du virus respiratoire syncytial humain (HRSV) groupe A circulant en Normandie : quinze ans d'évolution. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-02439147

**HAL Id: dumas-02439147**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02439147>**

Submitted on 14 Jan 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES

Préparé au sein de l'Université de Caen Normandie

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

**Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Pharmacie**

**Étude moléculaire du gène G complet du virus respiratoire syncytial humain (HRSV) groupe A circulant en Normandie : Quinze ans d'évolution**

Présenté par  
**Justine MORICEAU**

**Soutenu publiquement le 25 juin 2019  
devant le jury composé de**

M. Jean-Christophe GIARD	Professeur des universités, Bactériologie, Virologie, UFR Santé, Faculté des Sciences Pharmaceutiques	Président du jury
Mme Julia DINA	MCU-PH, Laboratoire de Virologie, CHU de Caen	Examineur
Mme Stéphanie GOUARIN	PH, Laboratoire de Virologie, CHU de Caen	Examineur
Mme Marie GUEUDIN	PH, Laboratoire de Virologie, CHU de Rouen	Examineur





LISTE DES ENSEIGNANTS – CHERCHEURS

**Directeur de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques**

Professeur Michel BOULOUARD

**Assesseurs**

Professeur Pascale SCHUMANN-BARD

Professeur Anne-Sophie VOISIN-CHIRET

**Directrice administrative et Directrice administrative adjointe**

Madame Sarah CHEMTOB

Madame Alexandra HOUARD

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

<b>BOULOUARD Michel</b>	Physiologie, Pharmacologie
<b>BUREAU Ronan</b>	Biophysique, Chémoinformatique
<b>COLLOT Valérie</b>	Pharmacognosie
<b>DALLEMAGNE Patrick</b>	Chimie médicinale
<b>DAUPHIN François</b>	Physiologie, Pharmacologie
<b>DELEPEE Raphaël</b>	Chimie analytique
<b>FABIS Frédéric</b>	Chimie organique
<b>FRERET Thomas</b>	Physiologie, Pharmacologie
<b>GARON David</b>	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
<b>GAUDUCHON Pascal</b> Eméritat jusqu'au 31/08/2019	Biologie cellulaire
<b>GIARD Jean-Christophe</b>	Bactériologie, Virologie
<b>MALZERT-FREON Aurélie</b>	Pharmacie galénique
<b>RAULT Sylvain</b> Eméritat jusqu'au 31/08/2019	Chimie thérapeutique
<b>ROCHAIS Christophe</b>	Chimie organique
<b>SCHUMANN-BARD Pascale</b>	Physiologie, Pharmacologie
<b>SICHEL François</b>	Toxicologie
<b>SOPKOVA Jana</b>	Biophysique, Drug design
<b>VOISIN-CHIRET Anne-Sophie</b>	Chimie médicinale



## Faculté des Sciences Pharmaceutiques

### MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

**ANDRE Véronique – HDR**

Biochimie, Toxicologie

**BOUET Valentine – HDR**

Physiologie, Pharmacologie

**CAILLY Thomas – HDR**

Chimie bio-inorganique, Chimie organique

**DENOYELLE Christophe – HDR**

Biologie cellulaire et moléculaire, Biochimie,

Cancérologie

**DHALLUIN Anne**

Bactériologie, Virologie, Immunologie

**ELDIN de PECOULAS Philippe – HDR**

Parasitologie, Mycologie médicale

**GROO Anne-Claire**

Pharmacie galénique

**KIEFFER Charline**

Chimie médicinale

**KRIEGER Sophie** (Praticien hospitalier)

Biologie clinique

**LAPORTE-WOJCIK Catherine**

Chimie bio-inorganique

**LEBAILLY Pierre – HDR**

Santé publique

**LECHEVREL Mathilde – HDR**

Toxicologie

**LEGER Marianne**

Physiologie, Pharmacologie

**LEPAILLEUR Alban – HDR**

Modélisation moléculaire

**N'DIAYE Monique**

Parasitologie, Mycologie médicale,

Biochimie clinique

**PAIZANIS Eleni**

Physiologie, Pharmacologie

**PEREIRA-ROSENFELD Maria de Fatima**

Chimie organique et thérapeutique

**POTTIER Ivannah**

Chimie et toxicologie analytiques

**PREVOST Virginie – HDR**

Chimie analytique, Nutrition, Education  
thérapeutique du patient

**QUINTIN Jérôme**

Pharmacognosie

**RIOULT Jean-Philippe**

Botanique, Mycologie, Biotechnologies

**SINCE Marc**

Chimie analytique

**VILLEDIEU Marie**

Biologie et thérapies innovantes des  
cancers

### PROFESSEUR AGREGE (PRAG)

**PRICOT Sophie**

Anglais



**PERSONNEL ASSOCIE A TEMPS PARTIEL (PAST)**

**SAINT-LORANT Guillaume**

Pharmacie clinique

**SEDILLO Patrick**

Pharmacie officinale

**RICHARD Estelle**

Pharmacie officinale

**Enseignants titulaires du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**



# **Remerciements**

## **À Mme le Docteur Julia Dina**

Je te remercie très chaleureusement d'avoir accepté de me confier ce travail, de m'avoir encadrée, écoutée et soutenue pendant ces quelques mois. Merci pour tout le temps que tu m'as accordé, y compris les weekends relecture et corrections... Merci de m'avoir accompagnée dans cette expérience européenne inoubliable au congrès de l'ESCV 2018 à Athènes.

## **À M. le Professeur Jean-Christophe Giard**

Merci de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse.

## **À Mme le Docteur Stéphanie Gouarin**

Merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Merci pour ta disponibilité et tes conseils au quotidien, c'est un plaisir de travailler avec toi.

## **À Mme le Docteur Marie Gueudin**

Merci d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse et d'avoir fait le déplacement depuis Rouen.

## **À Mme le Professeur Astrid Vabret**

Merci de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans votre service. Merci pour toutes les connaissances que vous m'avez transmises pendant mes stages en virologie.

## **À Justine Hamel**

Merci de m'avoir formée pour toutes les manip réalisées dans le cadre de ce travail. Merci pour ta disponibilité, tes réponses à mes questions, tes conseils...

## **À toute l'équipe du laboratoire de virologie**

Merci pour votre accueil durant mes stages au laboratoire. Merci tout particulièrement à Mme le Docteur Cécile Schanen et M. le Docteur Clément Lier.

## **Aux Biologistes et techniciens des différents laboratoires du CHU de Caen, avec qui j'ai travaillé dans le cadre de mon internat,**

Je vous remercie pour tous vos conseils et les connaissances que vous avez su me transmettre pendant ces 4 années.



## **Aux Biologistes et techniciens du laboratoire de biologie médicale du Centre Hospitalier Public du Cotentin**

Merci pour ce semestre inoubliable à Cherbourg, pour votre accueil chaleureux, votre gentillesse, vos conseils, la qualité de la formation que vous m'avez donnée.

## **À mes cointernes**

Merci à tous les cointernes avec qui j'ai partagé un ou plusieurs semestres, et plus particulièrement à Margaux avec qui l'aventure HRSV a commencé...

## **À Claire**

Avec qui je n'ai pas partagé de semestre mais qui est devenue une amie très chère...

## **À mes copains pharmaciens, et ceux en voie de le devenir...**

Merci à tous pour ces moments inoubliables, sur les bancs de la fac ou aux quatre coins de la France...

## **À Caro**

Ma binôme de fac, et future virologue, bientôt 10 ans d'amitié, et ce n'est pas fini !!

## **À mes amies d'enfance Hélène & Aurore**

Merci pour votre amitié depuis ces nombreuses années, malgré la distance et les différents chemins que nous avons pris ...

## **À mes parents, Christine & Philippe**

Merci de m'avoir permis de faire les études que je souhaitais, de m'avoir soutenue et encouragée, de m'avoir fait confiance pendant toutes ces années. C'est grâce à vous si j'en suis là aujourd'hui.

## **À ma sœur, Chloé**

Merci pour ton soutien, ton écoute et tous les bons moments passés ensemble. Ce sera ton tour dans quelques années et je serai là pour toi. Profite bien de ton internat, je suis fière de toi.

## **À toute ma famille, ma grand-mère, Thérèse, mes oncles, tantes et cousin(e)s**

Merci à tous pour vos encouragements et votre soutien.

## **À mes grands- parents, Henri, Marie-Anne & Jean**

Vous n'êtes plus parmi nous aujourd'hui, mais j'espère que de là haut vous êtes fiers de moi...

**À Thomas**

Que de chemin parcouru depuis bientôt 8 ans, et ce n'est que le début...

**À Mathis**

Mon petit rayon de soleil. C'est un bonheur de te voir grandir tous les jours.



# Sommaire

<b>Liste des Abréviations</b> .....	<b>1</b>
<b>Liste des Figures</b> .....	<b>2</b>
<b>Liste des Tableaux</b> .....	<b>4</b>
<b>Liste des Annexes</b> .....	<b>5</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>7</b>
<b>2. Généralités sur le Virus Respiratoire Syncytial</b> .....	<b>8</b>
2.1. UN PEU D'HISTOIRE .....	8
2.2. VIROLOGIE .....	8
2.2.1. Classification .....	8
2.2.2. Structure du virus et génome .....	9
2.2.3. Protéines virales .....	12
2.2.3.1. Glycoprotéine d'attachement G .....	13
2.2.3.2. Protéine de fusion F .....	15
2.2.3.3. Petite protéine hydrophobe SH .....	16
2.2.3.4. Protéine de matrice M .....	16
2.2.3.5. Protéines non-structurales NS1 et NS2 .....	16
2.2.3.6. Nucléoprotéine N .....	17
2.2.3.7. Polymérase L .....	17
2.2.3.8. Phosphoprotéine P .....	17
2.2.3.9. Facteur de transcription M2-1 .....	18
2.2.3.10. Protéine régulatrice M2-2 .....	18
2.2.4. Cycle de réplication viral .....	18
2.2.4.1. Attachement et pénétration du virus dans la cellule hôte .....	18
2.2.4.2. Transcription, traduction et réplication .....	19
2.2.4.3. Assemblage du virus et bourgeonnement .....	19
2.2.5. Sous-groupes antigéniques et diversité .....	21
2.3. PATHOGENESE .....	22

2.4.	MANIFESTATIONS CLINIQUES .....	23
2.5.	DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE .....	24
2.6.	EPIDEMIOLOGIE .....	25
2.7.	TRAITEMENTS/VACCINATION .....	27
2.7.1.	Thérapies curatives .....	27
2.7.1.1.	Inhibiteurs de fusion .....	27
2.7.1.2.	Inhibiteurs de la polymérase .....	28
2.7.1.3.	Autres .....	29
2.7.2.	Thérapies préventives .....	29
2.7.2.1.	Vaccins .....	29
2.7.2.2.	Anticorps monoclonaux .....	30
<b>3.</b>	<b>Objectifs de l'étude .....</b>	<b>32</b>
<b>4.</b>	<b>Matériels et Méthodes .....</b>	<b>32</b>
4.1.	SELECTION DES ECHANTILLONS .....	32
4.2.	EXTRACTION.....	33
4.3.	DETECTION DES HRSV-A .....	33
4.3.1.	Organisation de prise en charge des échantillons respiratoires au laboratoire.....	33
4.3.2.	Détermination du sous-groupe antigénique .....	36
4.4.	AMPLIFICATION DU GENE G COMPLET .....	38
4.4.1.	Choix des amorces .....	38
4.4.2.	Amplification.....	40
4.4.3.	Contrôle de l'amplification .....	40
4.5.	SEQUENÇAGE.....	41
4.5.1.	Purification des produits d'amplification .....	41
4.5.2.	Réaction de marquage .....	41
4.5.3.	Purification des produits de marquage.....	42
4.6.	ANALYSE DES SEQUENCES OBTENUES ET PHYLOGENIE.....	42

<b>5. Résultats et discussion .....</b>	<b>44</b>
5.1. EPIDEMIOLOGIE DES INFECTIONS A HRSV EN NORMANDIE DE 2011 A 2018 .....	44
5.1.1. Résultats .....	44
5.1.2. Discussion .....	48
5.2. SELECTION DES ECHANTILLONS ET SEQUENÇAGE.....	49
5.2.1. Résultats .....	49
5.2.2. Discussion .....	52
5.3. ANALYSE DES SEQUENCES OBTENUES ET PHYLOGENIE.....	53
5.3.1. Résultats .....	53
5.3.2. État des lieux dans la littérature .....	62
5.3.3. Discussion .....	64
<b>6. Conclusion .....</b>	<b>66</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>67</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>77</b>



# **Liste des Abréviations**

Aa : Acide aminé

Ac : Anticorps

Ag : Antigène

AMM : autorisation de mise sur le marché

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

dNTP : désoxyriboNucléotide Tri-Phosphate

GAGs : Glycosaminoglycanes

HIV : Virus de l'Immunodéficience Humaine

HRSV : Virus Respiratoire Syncytial Humain

HSV : Herpes Simplex Virus

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

Nt : Nucléotide

Pb : paires de bases

RT-PCR : Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction

SIL : Système Informatique du Laboratoire

TLR : Toll Like Receptor

Tm : Température de dénaturation

VHB : Virus de l'Hépatite B



## Liste des Figures

Figure 1. Arbre phylogénétique des virus appartenant à la famille des <i>Pneumoviridae</i> <sup>10</sup> .....	9
Figure 2. Image en microscopie électronique des structures virales filamenteuses à la surface de cellules infectées par le HRSV <sup>12</sup> .....	10
Figure 3. Image par coloration négative en microscopie électronique du bourgeonnement de virions de HRSV à la surface de cellules infectées <sup>12</sup> .....	10
Figure 4. Représentation schématique d'une particule virale de HRSV <sup>12</sup> .....	11
Figure 5. Organisation du génome du HRSV (d'après Rima B. & al. <sup>10</sup> ) .....	11
Figure 6. Représentation schématique de la structure primaire de la protéine G du HRSV.....	14
Figure 7. Représentation spatiale de la Glycoprotéine G du HRSV (d'après Melero J.A. & al <sup>18</sup> ) .....	14
Figure 8. La protéine de fusion F du HRSV (d'après Collins PL. & al. <sup>19</sup> ).....	15
Figure 9. Cycle de réplication des <i>Pneumoviridae</i> (d'après Schildgen V. & al. <sup>51</sup> ) .....	20
Figure 10. Prise en charge des échantillons respiratoires de pédiatrie au CHU de Caen .....	34
Figure 11. Prise en charge des échantillons respiratoires des adultes au CHU de Caen .....	35
Figure 12. Schématisation de la réaction de RT-PCR en temps réel par méthode Taqman <sup>®</sup> .....	37
Figure 13. Représentation du positionnement des couples d'amorces sur la séquence de référence JX015491.1 publiée sur GenBank <sup>91</sup> .....	39
Figure 14. Nombre de HRSV isolés chaque semaine, par saison épidémique, de 2011 à 2018.....	44
Figure 15. Distribution des échantillons respiratoires par catégorie d'âge .....	46

Figure 16. Représentation sous forme de secteur de la répartition de l'âge des patients chez qui un HRSV a été isolé .....	47
Figure 17. Pourcentage d'échantillons positifs pour le HRSV par catégorie d'âge....	47
Figure 18. Exemple d'électrophorèse de produits amplifiés avec le couple B et le couple G .....	50
Figure 19. Situation des séquences obtenues pour l'analyse du gène G avec le logiciel Sequencher. ....	51
Figure 20. Arbre phylogénétique construit à partir de 50 séquences de références .	54
Figure 21. Exemple d'alignement sur le logiciel BioEdit version 7.6.2, de 8 souches de HRSV-A .....	55
Figure 22. Arbre phylogénétique construit à partir des 18 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2003-2004 et des 50 séquences de référence.....	56
Figure 23. Arbre phylogénétique construit à partir des 26 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2011-2012 et des 50 séquences de référence.....	58
Figure 24. Evolution des génotypes de HRSV-A circulant en Normandie entre 2003 et 2017 .....	59
Figure 25. Représentation de la variabilité en acides aminés au sein de la région HRV2 des souches ON1 isolées en Normandie de 2011 à 2017. Représentation réalisée avec le logiciel AliView.....	60
Figure 26. Analyse phylogénétique réalisée par une méthode de maximum de vraisemblance « approchée » à l'aide du logiciel FastTree après alignement avec le logiciel AliView incluant les HRSV-A de l'étude et les 50 souches de références.....	61
Figure 27. Phylogénie des HRSV-A de 1940 à 2013, d'après Trento & al <sup>98</sup> .....	63
Figure 28. Distribution des génotypes circulants entre 1956 et 2013 d'après Trento & al. <sup>98</sup> .....	64

# Liste des Tableaux

Tableau 1. Les différentes protéines du HRSV <sup>15,20</sup> .....	12
Tableau 2. Amorces et sondes utilisées pour la détermination du sous-groupe antigénique des HRSV par RT-PCR en temps réel.....	38
Tableau 3. Caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification du gène G complet .....	39
Tableau 4. Nombre d'échantillons respiratoires reçus au laboratoire par an (du 01/09 au 31/08) et pourcentage d'échantillons positifs pour le HRSV .....	45
Tableau 5. Répartition des échantillons inclus, séquencés et nombre d'échecs d'amplification, dont amplification partielle du gène G, par saison épidémique .	49
Tableau 6. Distribution des génotypes circulant en Normandie de l'hiver 2003 à 2017 .....	57

## Liste des Annexes

Annexe 1. Arbre phylogénétique construit à partir des 17 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2004-2005 et des 50 séquences de référence .....	77
Annexe 2. Arbre phylogénétique construit à partir des 9 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2005-2006 et des 50 séquences de référence .....	78
Annexe 3. Arbre phylogénétique construit à partir des 11 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2006-2007 et des 50 séquences de référence .....	79
Annexe 4. Arbre phylogénétique construit à partir des 19 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2007-2008 et des 50 séquences de référence .....	80
Annexe 5. Arbre phylogénétique construit à partir des 10 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2008-2009 et des 50 séquences de référence .....	81
Annexe 6. Arbre phylogénétique construit à partir des 8 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2009-2010 et des 50 séquences de référence .....	82
Annexe 7. Arbre phylogénétique construit à partir des 4 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2010-2011 et des 50 séquences de référence .....	83
Annexe 8. Arbre phylogénétique construit à partir des 9 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2012-2013 et des 50 séquences de référence .....	84
Annexe 9. Arbre phylogénétique construit à partir des 45 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2013-2014 et des 50 séquences de référence .....	85

Annexe 10. Arbre phylogénétique construit à partir des 30 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2014-2015 et des 50 séquences de référence .....	86
Annexe 11. Arbre phylogénétique construit à partir des 31 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2015-2016 et des 50 séquences de référence .....	87
Annexe 12. Arbre phylogénétique construit à partir des 32 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2016-2017 et des 50 séquences de référence .....	88
Annexe 13. Arbre phylogénétique construit à partir des 28 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2017-2018 et des 50 séquences de référence .....	89

# **1. Introduction**

Le Virus Respiratoire Syncytial (HRSV) humain est l'un des agents le plus fréquemment impliqué dans les infections respiratoires basses aigues en pédiatrie. C'est l'un des motifs d'admission majeur aux urgences pédiatriques pendant la saison hivernale dans les pays développés. D'après une méta analyse, 33,1 millions d'épisodes d'infections respiratoires basses aigues dues au HRSV ont eu lieu chez des enfants de moins de 5 ans en 2015<sup>1</sup>. Les infections liées au HRSV sont également fréquentes chez les personnes âgées et chez les adultes à risques (particulièrement les immunodéprimés)<sup>2</sup>.

Il existe deux sous-groupes antigéniques, les HRSV-A et les HRSV-B, parmi lesquels on retrouve une grande diversité de génotypes. Il s'agit d'un virus à ARN, qui subit de fréquentes modifications génétiques. L'élaboration d'un vaccin est actuellement en cours, ainsi que la recherche et le développement d'un traitement antiviral efficace<sup>3</sup>.

L'épidémiologie moléculaire du HRSV est donc indispensable pour avoir des informations sur les génotypes circulants et l'évolution du virus.

## 2. Généralités sur le Virus Respiratoire Syncytial

### 2.1. Un peu d'histoire ...

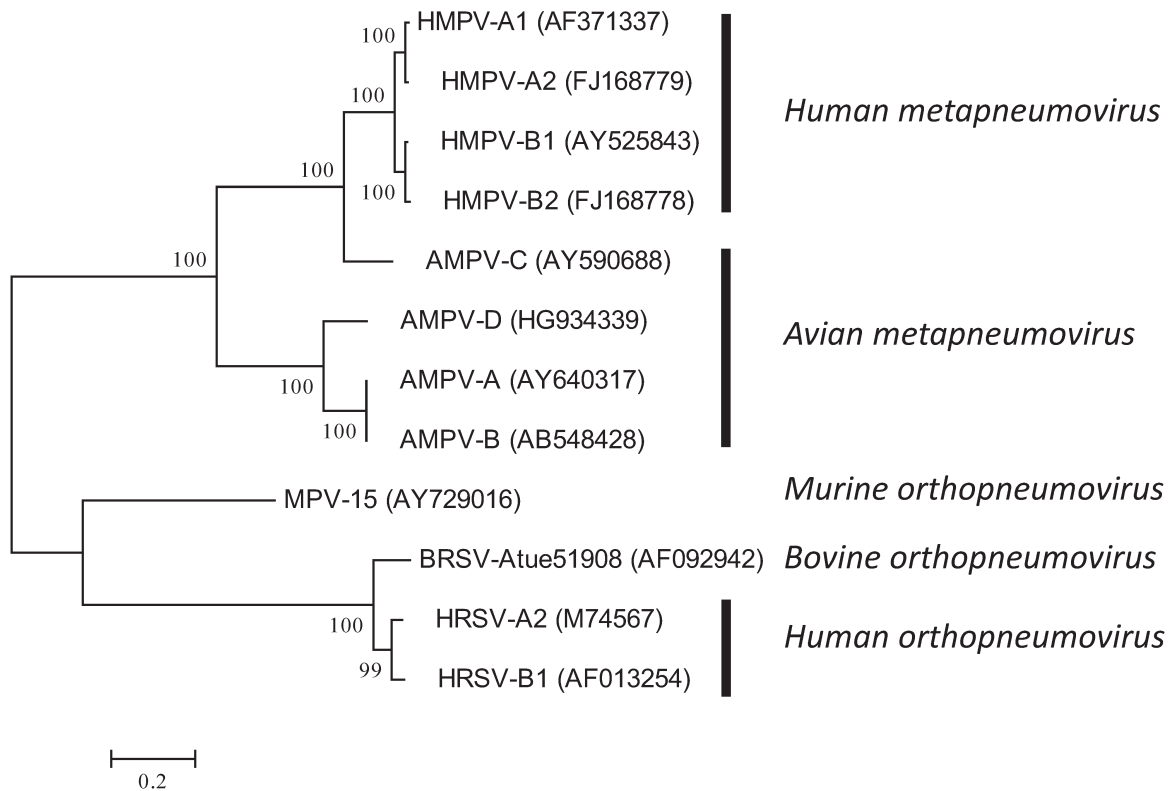
Le HRSV a été découvert chez un chimpanzé ayant une infection respiratoire en 1955<sup>4</sup>. Il avait alors été appelé le Coryza du Chimpanzé. Il a été isolé quelques temps plus tard, en 1957, chez 2 enfants ayant une infection respiratoire<sup>5</sup>. On l'a nommé Virus Respiratoire Syncytial du fait de son tropisme pour le système respiratoire et du syncytium caractéristique en culture cellulaire. Il est rapidement devenu l'agent le plus fréquemment isolé dans les infections respiratoires basses aiguës des nourrissons et des jeunes enfants grâce à la mise en place de diagnostic rapide par immunofluorescence<sup>6,7</sup>. Le HRSV est aujourd'hui une des principales causes d'infection respiratoire basse aiguë au niveau mondial, nécessitant des millions d'hospitalisation chaque hiver et entraînant de nombreux décès, particulièrement chez les nourrissons de moins de 6 mois<sup>1,8</sup>.

### 2.2. Virologie

#### 2.2.1. Classification

Le HRSV est classé dans la famille des *Pneumoviridae* au sein de l'ordre des *Mononegavirales*<sup>9</sup>. Cette famille a été créée lors de la revue de la classification par l'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) en 2016. Auparavant le HRSV appartenait à la famille des *Paramyxoviridae*<sup>10</sup>.

La famille des *Pneumoviridae* est composée de 2 genres, les *Metapneumovirus* dont les espèces peuvent infecter des mammifères et des oiseaux et les *Orthopneumovirus* qui n'infectent que des mammifères. Deux espèces ont un tropisme limité à l'homme, le métapneumovirus humain (hMPV) et les orthopneumovirus humains comprenant les virus respiratoires syncytiaux. (voir **Figure 1.**)



**Figure 1. Arbre phylogénétique des virus appartenant à la famille des *Pneumoviridae*<sup>10</sup>**

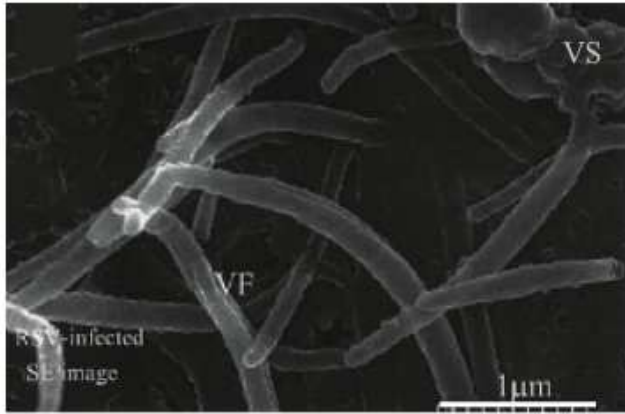
D'après la nouvelle classification, la famille des *Pneumoviridae* comprend 5 genres dont 2 pathogènes chez l'homme, *Human metapneumovirus* et *Human orthopneumovirus*. Le virus respiratoire syncytial appartient au genre *orthopneumovirus*. Les deux sous-groupes antigéniques sont représentés, les HRSV-A2 et HRSV-B1.

## 2.2.2. Structure du virus et génome

Les caractéristiques structurales des HRSV sont communes aux *Paramyxoviridae* et aux *Pneumoviridae*. Ce sont des virus à ARN non segmenté, simple brin, de polarité négative. La réplication et la transcription ont lieu dans le cytoplasme de leur cellule hôte. Les virions sont enveloppés et leur nucléocapside est hélicoïdale<sup>11</sup>. Le génome du HRSV (de 15 à 20 kb environ) code pour 11 protéines.

Le HRSV est un virus pléomorphe, observable en microscopie électronique sous une forme sphérique ou bien filamenteuse. Sa taille varie de 100 à 350 nm de diamètre pour la forme sphérique, les filaments peuvent mesurer jusqu'à 10 µm de long<sup>12,13</sup>. (voir **Figure 2.**)

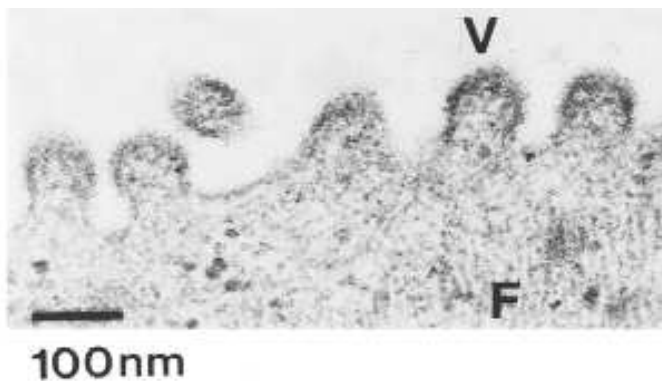




**Figure 2. Image en microscopie électronique des structures virales filamenteuses à la surface de cellules infectées par le HRSV<sup>12</sup>**

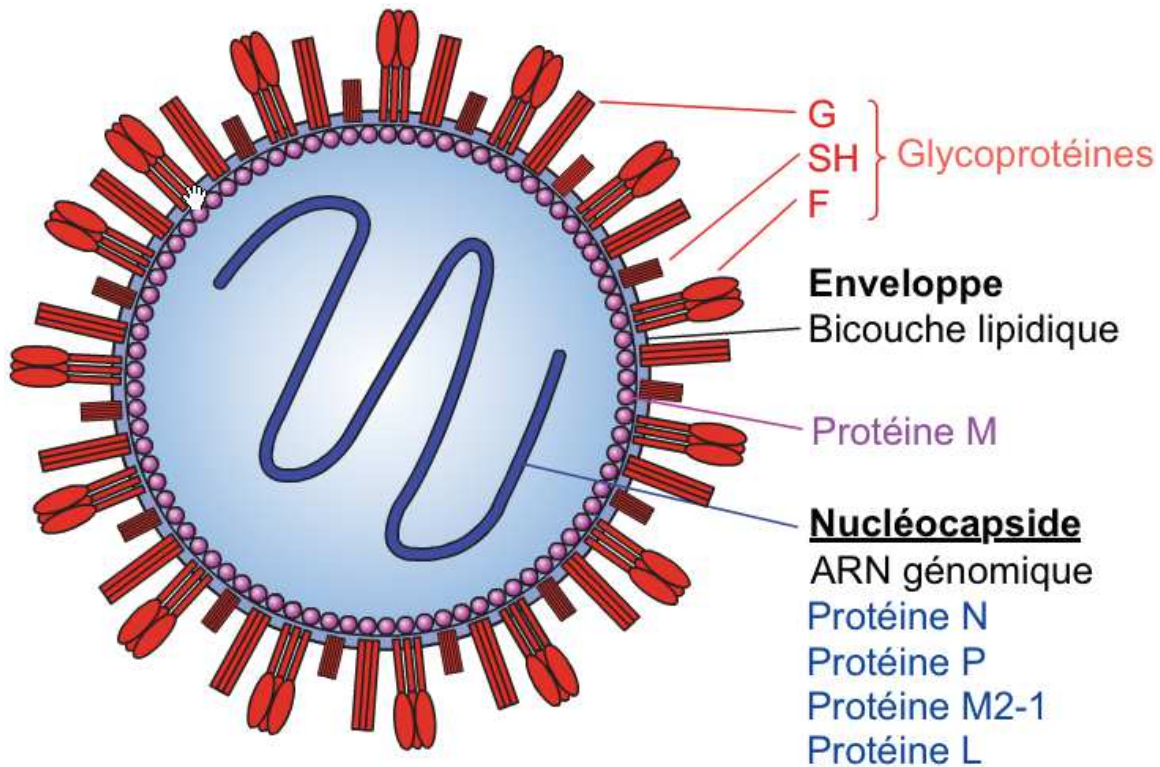
Les particules virales à la surface des cellules infectées sont sous forme sphérique (VS) de diamètre variable ou de façon prédominante sous forme filamenteuse (VF).

L'enveloppe du virus, qui provient de la membrane cytoplasmique de la cellule hôte lors du bourgeonnement, est de nature lipidique (voir **Figure 3.**). Trois protéines y sont encrées : la protéine G (glycoprotéine d'attachement), la protéine F (protéine de fusion) et la protéine SH (petite protéine hydrophobe). La protéine de matrice M forme une couche structurée située entre l'enveloppe et la nucléocapside. (voir **Figure 4.**)



**Figure 3. Image par coloration négative en microscopie électronique du bourgeonnement de virions de HRSV à la surface de cellules infectées<sup>12</sup>**

Le bourgeonnement d'une particule virale est indiqué par la lettre V et les structures filamenteuses cytoplasmiques correspondant aux nucléocapsides par la lettre F.

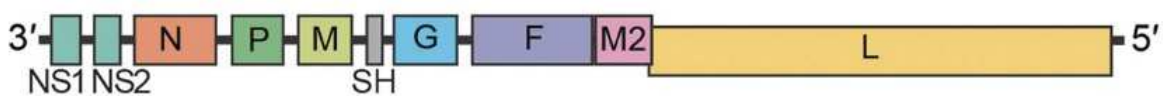


**Figure 4. Représentation schématique d'une particule virale de HRSV<sup>12</sup>**

Trois protéines sont présentes à la surface du virus, la glycoprotéine G, la protéine de fusion F et une petite protéine hydrophobe SH. L'ARN viral associé aux protéines intervenant dans la réplication, N, P, M2-1 et L, forment la nucléocapside. La protéine M forme une couche structurée sous l'enveloppe.

L'ARN génomique viral, monocaténaire, non segmenté et de polarité négative, est constitué d'environ 15 000 nucléotides<sup>12,14</sup>. Il contient 10 gènes, débute en 3' par une région extragénique « leader » et se termine en 5' par une région « trailer »<sup>15</sup> (voir **Figure 5**). Il est encapsidé par la nucléoprotéine N en une structure hélicoïdale qui sert de matrice au complexe de réplication virale<sup>16</sup>. Ce dernier est formé par la protéine L (polymérase virale), ainsi que son cofacteur la protéine P (phosphoprotéine) et des protéines M2-1 et M2-2. L'ensemble des 4 protéines N, L, P, M2-1 constitue la ribonucléocapside.

***Orthopneumovirus*** – human respiratory syncytial virus A2 (15 222 nt)



**Figure 5. Organisation du génome du HRSV (d'après Rima B. & al.<sup>10</sup>)**

Les gènes sont représentés par les rectangles colorés (dont la largeur est proportionnelle à la longueur du gène). Les régions intergéniques correspondent au trait noir qui les relie.

### 2.2.3. Protéines virales

Le génome du HRSV code pour 11 protéines virales (voir **Tableau 1.**). Le gène M2 possède deux cadres de lecture, et code donc pour 2 protéines : M2-1 et M2-2.

Les 3 protéines d'enveloppe (G, F et SH) sont les plus étudiées car elles sont les cibles potentielles de traitements antiviraux et de vaccins<sup>17,18</sup>.

Les glycoprotéines F et G sont les seuls Ag viraux capables d'induire la synthèse d'Ac neutralisants<sup>19</sup>.

**Tableau 1. Les différentes protéines du HRSV<sup>15,20</sup>**

Nom	Taille : - du gène : nucléotides (nt) - de la protéine : acides aminés (aa)	Fonction
G	922 nt, 298 aa	Glycoprotéine d'attachement du virus à sa cellule hôte. Participe à l'échappement au système immunitaire de l'hôte.
F	1903 nt, 574 aa	Fusion de l'enveloppe virale avec l'enveloppe cytoplasmique.
SH	410 nt, 64 aa	Petite protéine hydrophobe Son rôle reste mal connu. Elle interviendrait dans la survie du HRSV et inhiberait l'apoptose <sup>17</sup> .
M	957 nt, 256 aa	Matrice Rôle dans l'assemblage, la maturation et le bourgeonnement des virions.
NS1	532 nt, 139 aa	Protéines non structurales 1 et 2 Modulation de la réponse immunitaire de l'hôte à l'infection par antagonisme des interférons $\alpha$ et $\beta$
NS2	502 nt, 124 aa	
N	1205 nt, 391 aa	Nucléoprotéine Encapsidation de l'ARN génomique.
L	6578 nt, 2165 aa	ARN polymérase ARN dépendante Sous unité majeure de la polymérase, contient les domaines catalytiques.
P	890 nt, 241 aa	Phosphoprotéine Cofacteur de l'ARN polymérase.
M2	961 nt M2-1 : 194 aa M2-2 : 90 aa	Facteur de transcription. Régulation du switch entre les fonctions de réplication et de transcription de l'ARN polymérase.

### 2.2.3.1. Glycoprotéine d'attachement G

La glycoprotéine G est synthétisée à partir du gène G sous deux formes : une forme transmembranaire, Gm, d'environ 298 acides aminés et une forme soluble Gs, plus courte (environ 65 acides aminés de moins)<sup>17</sup>.

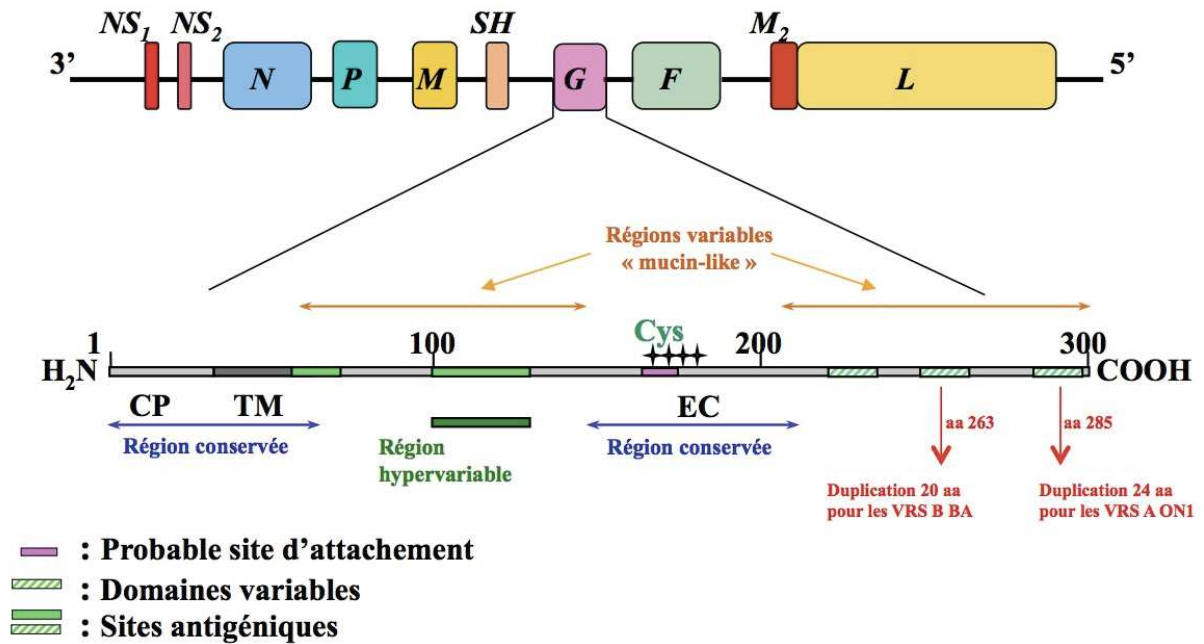
La forme Gm est une protéine transmembranaire de type II (la partie C-terminale est extracellulaire), elle est incorporée dans l'enveloppe des virions sous une forme tétramérique<sup>21</sup>. La portion cytoplasmique N-terminale correspond aux acides aminés 1 à 37, la région transmembranaire s'étend des acides aminés 38 à 68 et la partie C-terminale (acides aminés 68 à 298) est extracellulaire (voir **Figure 6**).

La forme Gs est sécrétée à partir des cellules infectées. Sa traduction débute au niveau du deuxième codon AUG (codon 48) de l'ARNm du gène G<sup>22</sup> et la protéine Gs est obtenue par clivage après le résidu 65<sup>18</sup>. Elle ne possède pas la région cytoplasmique N-terminale, ni le domaine transmembranaire et correspond donc à l'ectodomaine de la protéine G. Son rôle n'est pas encore complètement défini, bien qu'il ait été décrit qu'elle diminuerait l'activité antivirale des macrophages pulmonaires et du complément et agirait comme un leurre auprès des anticorps anti-HRSV afin que le virus échappe au système immunitaire de l'hôte infecté<sup>23,24</sup>.

L'ectodomaine de la protéine G est composé de deux régions hautement glycosylées « mucin-like » (très riches en résidus sérine, thréonine et proline qui sont caractéristiques des mucines) qui entourent une courte région centrale. La séquence des domaines « mucin-like » est très variable, d'où leur nom de « régions hypervariables ». Ainsi, la protéine G est la plus variable des protéines du HRSV, c'est pourquoi elle a été très étudiée et est à l'origine des études d'épidémiologie moléculaire et d'évolution des HRSV. La majorité d'entre elles sont jusqu'à présents basées sur la deuxième région hypervariable.

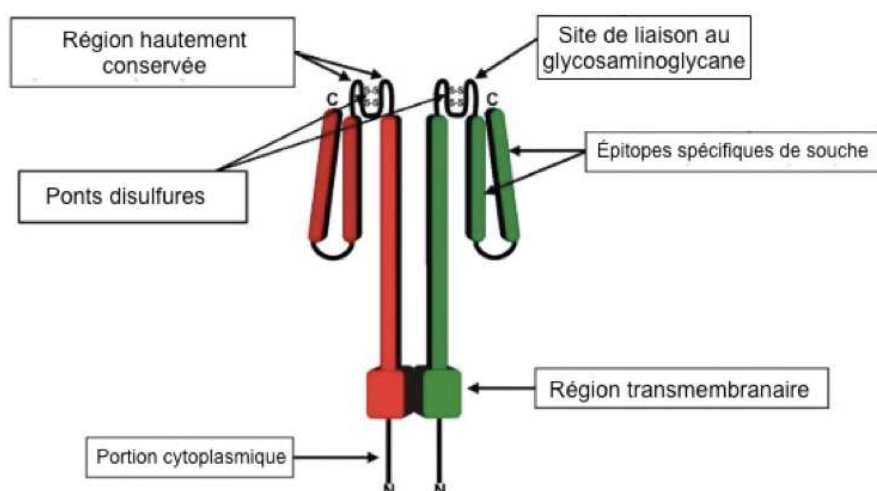
La région centrale est composée d'une partie hautement conservée : une séquence de 13 acides aminés (164 à 176) qui est strictement conservée, ainsi que 4 résidus cystéine (173, 176, 182 et 186) présents dans toutes les souches de HRSV, qui sont à l'origine de 2 ponts disulfures<sup>18</sup>. Cette conformation tridimensionnelle forme le site de liaison de la protéine G (voir **Figure 7**). L'un des principaux récepteurs du HRSV, présent à la surface des ses cellules hôtes, est un glycosaminoglycane (GAG) : l'héparane sulfate<sup>25</sup>. On trouve également dans la région centrale un motif CX3C qui

imite une chimiokine, la fractalkine et se lie à son récepteur spécifique CX3CR1, ce qui réduirait la réponse immunitaire cellulaire de l'hôte<sup>26,27</sup>.



**Figure 6. Représentation schématique de la structure primaire de la protéine G du HRSV**

La protéine G est composée de deux régions hypervariables et deux régions conservées. La région hypervariable située en région C-terminale est utilisée aujourd'hui pour définir les différents génotypes. Les duplications rapportées pour les sous-groupes A et B sont identifiées sur ce schéma. CP : région cytoplasmique ; TM : région transmembranaire ; EC : Région extracytoplasmique.



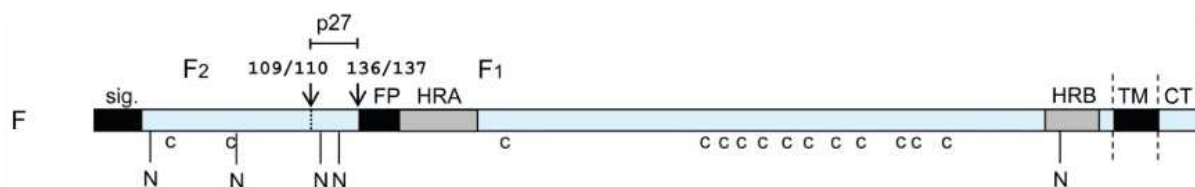
**Figure 7. Représentation spatiale de la Glycoprotéine G du HRSV (d'après Melero J.A. & al<sup>18</sup>)**

Les différentes régions de la protéine G sont indiquées : les régions cytoplasmique et transmembranaire et les sites antigéniques situés sur la région extracytoplasmique.

### 2.2.3.2. Protéine de fusion F

La rôle principal de la protéine F est d'assurer la fusion entre l'enveloppe du virus et la membrane de la cellule hôte. C'est une protéine transmembranaire de type I. Elle est également présente à la surface des cellules infectées et est à l'origine de la formation de syncytia, caractéristique du HRSV, en entraînant la fusion entre des cellules voisines<sup>15</sup>.

Elle est tout d'abord synthétisée en un précurseur inactif F0 de 574 acides aminés à partir du gène F. Trois monomères F0 s'assemblent en un homotrimère. Lorsque ce trimère passe dans l'appareil de Golgi, les trois monomères sont clivés par une protéase en deux endroits. Il en résulte 3 fragments par monomère, F1 (un peptide de 50 kDa en partie C-terminale), F2 (un peptide de 20 kDa en partie N-terminale) et un petit peptide de 27 acides aminés (de 109 à 136) qui est éliminé. F1 et F2 sont reliés par deux ponts disulfures. Ce trimère est assemblé dans l'enveloppe du virus en un état métastable, appelé pré-fusion. Pendant la fusion avec la membrane de la cellule hôte, la protéine F change de conformation en une structure stable, appelée post-fusion (voir **Figure 8**).



**Figure 8. La protéine de fusion F du HRSV (d'après Collins PL. & al.<sup>19</sup>)**

Les rectangles noirs correspondent aux régions hydrophobes. Les sites de clivage sont indiqués par une flèche. Les résidus cystéine conservés entre les différents géotypes sont indiqués par la lettre (c). Les sites de N-glycosylation sont indiqués par la lettre N sous un trait vertical.

sig. : peptide signal (non présent dans la protéine mature), p27 : peptide de 27 Aa (non présent dans la protéine mature), FP : peptide de fusion (initie la fusion en s'ancrant dans la membrane de la cellule cible), TM : région transmembranaire, CT : queue cytoplasmique

Les régions HRA et HRB (*heptad-repeat A et B*) sont impliquées dans le changement conformationnel de la protéine F lors de la fusion.

Contrairement à la protéine G, la protéine F est hautement conservée entre les différents géotypes de HRSV avec plus de 90% d'homologie entre les séquences

en acides aminés. Elle est donc une cible privilégiée étudiée pour la mise au point d'un vaccin contre le HRSV.

Il a également été montré que la protéine F possède la capacité de jouer le rôle de protéine d'attachement par liaison à des glycosaminoglycanes<sup>17,18</sup>.

#### 2.2.3.3. Petite protéine hydrophobe SH

Cette protéine transmembranaire est de petite taille (64 acides aminés). La partie N-terminale est ancrée dans la membrane et la partie C-terminale est extracellulaire. La protéine SH augmente la perméabilité membranaire. Elle s'assemble en pentamères<sup>28</sup> formant des pores ayant une activité de canal à perméabilité cationique pH-dépendante. La fonction de SH n'est pas encore clairement définie mais il semblerait qu'elle appartienne à la classe des viroporines, ayant un rôle dans le bourgeonnement et dans l'apoptose<sup>29,30</sup>.

#### 2.2.3.4. Protéine de matrice M

Cette protéine de 256 amino-acides, non glycosylée, forme une matrice tapissant la surface interne des virions. Elle joue un rôle dans l'assemblage des particules virales et lors du bourgeonnement<sup>31,32</sup>. Elle pourrait avoir d'autres rôles dans le cycle cellulaire, comme un effet inhibiteur sur la polymérase virale<sup>33</sup>.

#### 2.2.3.5. Protéines non-structurales NS1 et NS2

Ce sont de petites protéines de 139 amino-acides pour NS1 et de 124 pour NS2. Elles s'assemblent entre-elles pour former des complexes hétérogènes<sup>34</sup>. NS1 est principalement localisée au niveau nucléaire tandis que NS2 se trouve majoritairement dans les mitochondries. NS1 est aussi retrouvée dans les mitochondries lorsqu'elle est complexée avec NS2<sup>35</sup>. Elles sont impliquées dans la perturbation de la réponse immunitaire en interférant avec la synthèse d'interféron beta (IFN- $\beta$ ), ainsi qu'en perturbant les voies de signalisation IFN de type I et IFN de type III<sup>36,37</sup>. NS1 et NS2 sont également capables d'inhiber l'apoptose, permettant aux cellules infectées de survivre plus longtemps<sup>38</sup>.

#### 2.2.3.6. Nucléoprotéine N

Cette protéine de 391 acides aminés encapside l'ARN viral, afin de le stabiliser et de le protéger. Le complexe formé par l'ARN et la protéine N a une structure hélicoïdale. Chaque tour comporte en moyenne 10 monomères de N, chacun lié à 7 nucléotides d'ARN<sup>16</sup>. La conformation tridimensionnelle du complexe ARN-protéine N facilite l'accès de la polymérase à l'ARN lors de la transcription et de la réplication<sup>39</sup>. En outre, N possède un domaine de liaison à la protéine P au niveau d'une poche hydrophobe de son domaine N-terminal, permettant l'interaction du complexe polymérase viral et de la ribonucléocapside lors de la réplication et de la transcription<sup>40</sup>.

#### 2.2.3.7. Polymérase L

Cette protéine s'associe aux protéines P et M2-1 pour former le complexe polymérase viral. C'est la plus grosse protéine du HRSV, elle comporte 2165 acides aminés. La protéine L est l'unité catalytique du complexe, elle possède une activité polymérase ARN-dépendante. Elle est également impliquée dans la polyadénylation des ARNm viraux et dans la mise en place de la coiffe<sup>41</sup>.

#### 2.2.3.8. Phosphoprotéine P

La phosphoprotéine du HRSV mesure 241 acides aminés et elle est un cofacteur indispensable de la polymérase. Elle coordonne les protéines de la nucléocapside et du complexe polymérase viral. Elle s'organise en homotétramères à partir d'une région centrale multimérisée<sup>42,43</sup>. En se liant au complexe ARN-Nucléocapside au niveau C-terminal, ainsi qu'à L et M2-1, elle met en présence tous les acteurs nécessaires à l'initiation de la transcription et de la réplication virale<sup>44</sup>. La partie N-terminale de la protéine P soluble se lie aux monomères de N libres et les adresse vers les brins d'ARN viraux néosynthétisés lors de la réplication, afin d'éviter que les monomères de N s'auto-agrègent où se lient à de l'ARN non viral<sup>45</sup>.



#### 2.2.3.9. Facteur de transcription M2-1

La protéine M2-1, mesurant 196 acides aminés, est synthétisée à partir du premier cadre de lecture du gène M2. Elle est présente sous forme phosphorylée et non phosphorylée<sup>46</sup>, et s'organise en homotétramères via un domaine d'oligomérisation<sup>47</sup>. Elle joue un rôle essentiel lors de la transcription virale. En son absence, la polymérase interrompt prématurément la transcription des gènes viraux, synthétisant des ARNm tronqués<sup>48,49</sup>.

#### 2.2.3.10. Protéine régulatrice M2-2

Cette petite protéine de 90 acides aminés, correspond au deuxième cadre de lecture du gène M2. Elle oriente l'activité de la polymérase virale vers la réplication de l'ARN génomique plutôt que vers la transcription en ARNm<sup>50</sup>.

### 2.2.4. Cycle de réplication viral

Le cycle de réplication du HRSV se déroule entièrement dans le cytoplasme de la cellule hôte. (voir **Figure 9**.)

#### 2.2.4.1. Attachement et pénétration du virus dans la cellule hôte

Le cycle de réplication du HRSV débute par l'attachement du virus à sa cellule hôte. Il s'agit principalement des cellules ciliées de l'épithélium respiratoire. L'attachement du HRSV dépend de la protéine G, qui interagit avec des GAGs, notamment l'héparane sulfate, présents à la surface des cellules cibles. Il a également été montré que la protéine F du HRSV jouait un rôle dans cette étape et pouvait pallier à une inefficacité de la protéine G<sup>18</sup>. Cependant sa fonction principale est de permettre la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de la cellule hôte. Le mécanisme de fusion des membranes virales et cellulaire implique un changement de conformation de la protéine de fusion, qui passe d'un état de pré-fusion instable à un état de post fusion stable. L'enveloppe virale est alors intégrée à la membrane cellulaire, permettant une libération de la nucléocapside dans le cytoplasme.

#### 2.2.4.2. Transcription, traduction et réplication

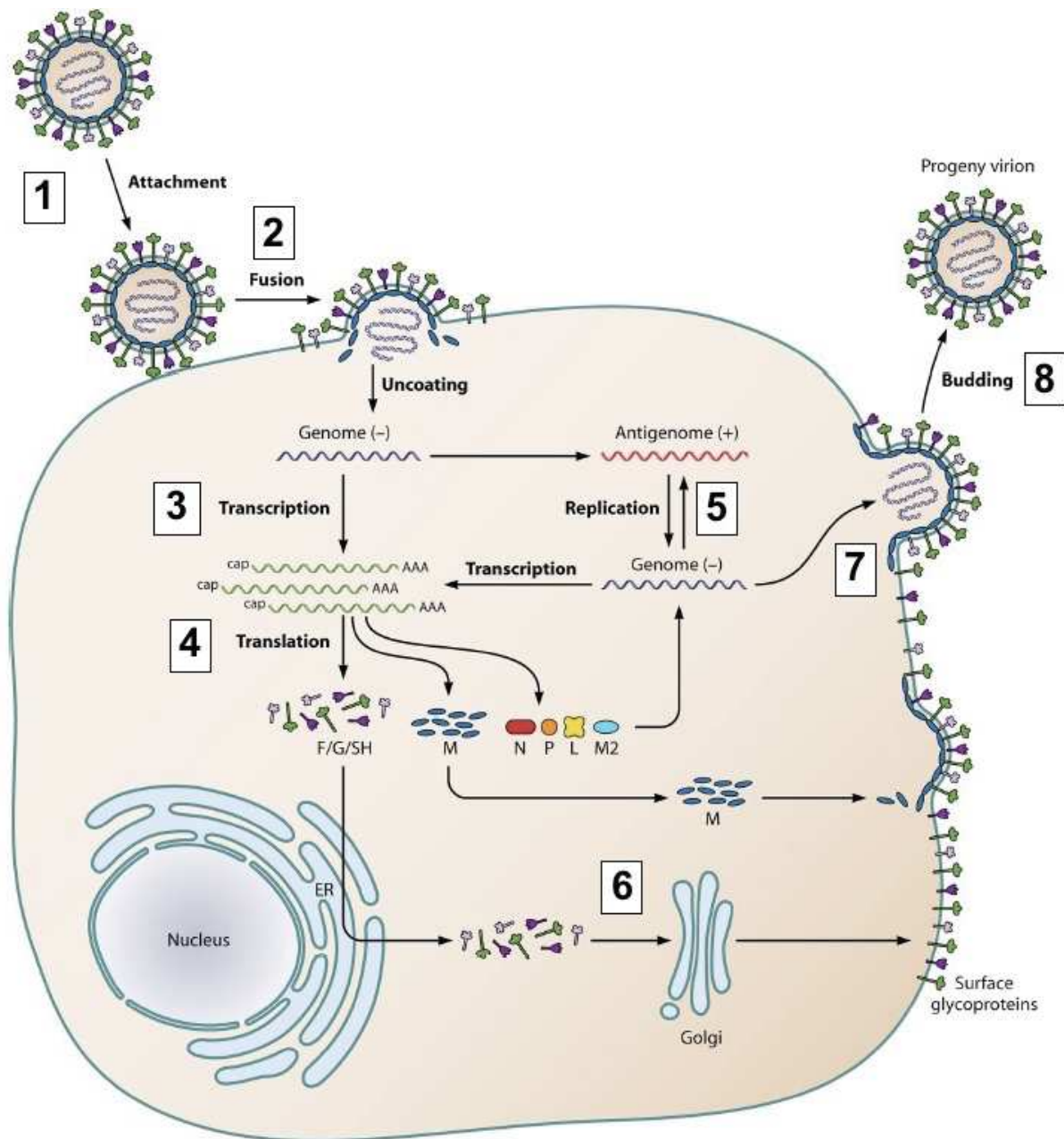
La transcription peut ensuite débiter dans le cytoplasme de la cellule hôte. L'ARN génomique viral, encapsidé et de polarité négative, est transcrit en ARN messager coiffé et polyadénylé, par la protéine L (ARN polymérase-ARN dépendante). Les protéines N, P, M2-1 participent aussi à la transcription. L'ARN viral sert également de matrice à la synthèse d'un antigénome complet, de polarité positive, qui est à son tour répliqué en ARN génomiques. La protéine M2-2 permet la régulation des fonctions de transcription et de réplication<sup>26</sup>.

Les différents ARNm sont ensuite traduits en protéines virales. Les protéines N, P, L et M2-1 vont aller s'associer avec les ARN viraux néo-synthétisés pour former la ribonucléocapside. Les protéines d'enveloppe F, G et SH, qui nécessitent une maturation pour être fonctionnelles (glycosylation et clivages), vont passer par le réticulum endoplasmique cellulaire et l'appareil de Golgi, avant de rejoindre la membrane cytoplasmique dans laquelle elles sont intégrées.

#### 2.2.4.3. Assemblage du virus et bourgeonnement

L'assemblage des virions a lieu au niveau du pôle apical des cellules polarisées<sup>26</sup>. La composition de la membrane cellulaire à cet endroit correspond à celle de la future enveloppe virale (présence des 3 glycoprotéines transmembranaires et de la protéine M qui forme une couche sous la membrane plasmique). L'assemblage est coordonné par la protéine M, qui a la capacité d'interagir avec les protéines d'enveloppe via leurs queues cytoplasmiques et de diriger la nucléocapside sur le lieu de l'assemblage, en association avec le cytosquelette cellulaire et les filaments d'actine<sup>52</sup>.

La libération des virions par bourgeonnement implique le système endosomique cellulaire<sup>53</sup>.



**Figure 9. Cycle de répliation des *Pneumoviridae* (d'après Schildgen V. & al.<sup>51</sup>)**

On observe sur ce schéma les 8 étapes du cycle de répliation du HRSV :

- 1 : Attachement à la cellule hôte
- 2 : Fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire et libération de la nucléocapside dans le cytoplasme de la cellule hôte
- 3 : Transcription de l'ARN viral de polarité négative en ARN messagers viraux coiffés et polyadénylés
- 4 : Traduction
- 5 : Réplication à partir de l'ARN viral qui sert également de matrice pour la synthèse d'un antigénome
- 6 : Maturation des protéines d'enveloppe via le réticulum endoplasmique (ER) et l'appareil de Golgi
- 7 : Assemblage des particules virales
- 8 : Bourgeonnement et libération des virions

### 2.2.5. Sous-groupes antigéniques et diversité

La variabilité au sein de l'espèce des virus respiratoires syncytiaux est importante, du fait du taux élevé de substitutions nucléotidiques lors de la transcription, caractéristique des virus à ARN. La variation antigénique entre différentes souches de HRSV a été étudiée en utilisant des anticorps (Ac) monoclonaux dirigés contre différentes protéines du virus. Il n'existe qu'un sérotype<sup>54</sup> de HRSV avec deux sous-groupes antigéniques, les HRSV-A et les HRSV-B<sup>55</sup>. Il est estimé que la divergence entre ces deux groupes a eu lieu il y a environ 350 ans<sup>56</sup>. Les études moléculaires de la séquence de la glycoprotéine G ont confirmé cette hypothèse<sup>57</sup> et ont permis l'identification de différents génotypes. La variabilité au sein d'un sous-groupe est élevée car le taux de substitutions nucléotidiques dans le gène G du HRSV est estimé à  $1,83 \cdot 10^{-3}$  par site et par an<sup>58</sup>.

D'après la littérature, on compte aujourd'hui, 13 génotypes de HRSV-A : GA1 à GA7<sup>57,59</sup>, SAA1<sup>60</sup>, NA1 à NA4<sup>61,62</sup>, et le dernier génotype identifié, ON1<sup>63</sup> comportant une insertion de 72 nucléotides dans la région C-terminale du gène G ; ainsi que 28 génotypes de HRSV-B (BA1-BA13, GB1-GB5, SAB1-SAB4, URU1-2, CB1, BA-C, CB-B, et THB)<sup>64</sup>. Le génotype majoritaire des HRSV-B circulants dans le monde actuellement est le génotype BA, qui comporte une duplication de 60 nucléotides dans la région C-terminale du gène G.

## 2.3. Pathogénèse

La contamination a lieu par voie nasale, par inhalation d'aérosols provenant d'un sujet infecté (générés par la toux ou des éternuements) ou bien par contact direct avec des objets souillés (jouets utilisés par des jeunes enfants en collectivité). Le HRSV peut survivre plus de 24h sur une surface non poreuse<sup>65</sup>. La période d'incubation, pendant laquelle le virus se réplique au niveau du nasopharynx, dure 4 à 5 jours. Dans la majorité des cas (particulièrement chez l'adulte), l'infection est restreinte dans le système respiratoire supérieur, avec des signes cliniques non spécifiques : rhinorrhée, toux, et parfois une fièvre peu élevée. La diffusion du virus vers le tractus respiratoire inférieur, principalement par aspiration des sécrétions infectées, dure 1 à 3 jours. Environ 40% des nourrissons infectés par le HRSV ont une atteinte des voies aériennes inférieures<sup>66</sup>. Les principales cellules cibles du HRSV sont les cellules ciliées et les pneumocytes de type 1 des alvéoles<sup>15</sup>. La multiplication du virus dans les cellules épithéliales respiratoires entraîne une nécrose cellulaire et une destruction du système ciliaire. Cela active la réponse inflammatoire, crée un œdème et entraîne l'infiltration de polynucléaires, de macrophages et de lymphocytes. La production de mucus est augmentée. L'accumulation de débris cellulaires et de mucus dans la lumière des bronchioles et des alvéoles entraîne une obstruction bronchiolaire<sup>67</sup>, voire un collapsus alvéolaire. L'immaturation du système respiratoire des nourrissons accentue cette obstruction, les rendant plus susceptibles de développer une bronchiolite<sup>66</sup>. La guérison survient généralement en quelques jours, mais la clairance du virus peut prendre 2 à 3 semaines.

Le tropisme du HRSV est essentiellement pulmonaire et restreint aux cellules superficielles de l'épithélium respiratoire. Le virus n'atteint pas les cellules basales de l'épithélium respiratoire. Il n'a jamais été mis en évidence de virémie lors d'une bronchiolite à HRSV. Cependant, chez l'immunodéprimé, le virus peut être retrouvé dans d'autres organes (rein, cœur, foie)<sup>66</sup>.

La réponse immunitaire de l'hôte, en particulier la libération de cytokines, joue un rôle majeur dans la pathogénèse et la sévérité clinique de l'infection<sup>68</sup>. Il a été montré que le taux de cytokines libérées (interleukines (IL) IL-6, IL-8, Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$ , chimiokines) était corrélé à la sévérité de l'infection<sup>69</sup>.

## 2.4. Manifestations cliniques

La clinique de l'infection à HRSV dépend de l'âge du patient et de son statut immunitaire. L'infection débute par une atteinte nasale qui peut ensuite s'étendre aux sinus, à l'oreille moyenne et au tractus respiratoire inférieur. La bronchiolite est une infection virale respiratoire épidémique saisonnière du nourrisson de moins de 2 ans et correspond généralement au premier épisode d'infection par le HRSV.

Le tableau clinique classique de la bronchiolite associe une toux, une dyspnée obstructive avec polypnée, un tirage intercostal, un *wheezing* (sifflement) ou bien la présence de râles sibilants ou crépitants, au décours immédiat d'un épisode de rhinopharyngite. Une fièvre modérée est présente dans 50% des cas. Généralement, on observe également une diminution de l'appétit. Chez les nourrissons de moins de 2 mois, l'apnée peut être la seule manifestation clinique<sup>66,67,70</sup>.

L'infection à HRSV du jeune enfant peut être grave et nécessite dans 1 à 2% des cas une hospitalisation pour insuffisance respiratoire grave. Des facteurs favorisant les formes graves ont été identifiés. Un des principaux facteurs prédictifs d'infection grave est l'âge, les enfants de moins de 6 mois étant significativement plus souvent hospitalisés. Les autres facteurs de risque identifiés sont la prématurité (surtout si la naissance a lieu avant 30 semaines de grossesse), le sexe masculin, la présence de frères et sœurs, l'association à une pathologie sous-jacente (bronchodysplasie, cardiopathie...), le tabagisme passif, un milieu social défavorisé. L'allaitement maternel serait au contraire un facteur protecteur<sup>71</sup>.

La bronchiolite à HRSV peut se compliquer d'une surinfection bactérienne (pneumonie, otite...). Le pourcentage de coinfection par une bactérie est de plus de 40% chez les nourrissons ayant une bronchiolite sévère<sup>3,72</sup>.

Les réinfections sont fréquentes, même au cours du même épisode épidémique. La clinique des ces réinfections est normalement moins bruyante, toux et rhinorrhée étant les manifestations les plus courantes. La répétition des épisodes obstructifs avec *wheezing*, doit faire évoquer le diagnostic d'asthme du nourrisson (à partir de 3 épisodes avant 2 ans)<sup>73</sup>.

## 2.5. Diagnostic biologique

Le diagnostic virologique de l'infection par le HRSV n'est pas systématiquement recommandé et doit être réalisé en fonction du contexte clinique et épidémique. Le type de prélèvement à réaliser pour rechercher la présence du HRSV est un écouvillonnage ou une aspiration nasopharyngée. Le virus peut également être recherché dans un liquide de lavage broncho-alvéolaire ou une aspiration bronchique. L'isolement du virus par culture cellulaire a été pendant longtemps la méthode de référence, mais n'est plus recommandé actuellement.

Deux approches sont actuellement utilisées : la recherche d'antigènes viraux et la recherche de l'ARN viral<sup>7,67,70</sup>.

### **Recherche d'antigènes viraux :**

Elle peut être réalisée par immunofluorescence ou par immunochromatographie. Dans le premier cas, les cellules présentes dans l'échantillon sont étalées sur une lame. Les antigènes viraux sont détectés grâce à des anticorps monoclonaux marqués par un fluorochrome. Cette technique, rapide et très spécifique est de moins en moins utilisée du fait de son manque de sensibilité. La technique immunochromatographique est aujourd'hui très répandue, du fait de sa rapidité (lecture du résultat en 15 minutes), de sa facilité d'utilisation (lecture automatisée) et parce qu'elle est réalisable « au lit du patient », dans les services de soins équipés d'automates. Cette technique est utilisée principalement par les services de pédiatrie (la sensibilité du test est moindre chez l'adulte), pour faciliter le tri des enfants à hospitaliser et à isoler en période épidémique.

### **Recherche de l'ARN viral :**

Les techniques de biologie moléculaire sont de plus en plus utilisées, particulièrement depuis le développement de PCR en temps réel et la possibilité d'effectuer une recherche simultanée d'un panel de pathogènes (multiplexage). Plusieurs industriels proposent en effet des automates permettant la réalisation d'une RT-PCR multiplexe en moins de 2h (extraction comprise). Les avantages de ces techniques sont la sensibilité (meilleure que pour les techniques immunochromatographiques), la simplicité d'utilisation, la rapidité d'obtention des résultats. Le principal inconvénient est leur coût qui est très élevé.

## 2.6. Epidémiologie

Le HRSV est responsable d'infections respiratoires aiguës basses et peut toucher des individus de tout âge. C'est l'agent étiologique viral le plus souvent responsable de ce type d'infection chez l'enfant. C'est le deuxième pathogène le plus souvent responsable d'un décès suite à une infection respiratoire basse après le Pneumocoque<sup>74</sup>, au niveau mondial. La primo-infection survient dans la grande majorité des cas avant 5 ans et une fois sur deux avant 1 an<sup>6</sup>. Les réinfections sont très fréquentes, tout au long de la vie. En effet, l'immunité secondaire à la primo-infection n'est que partielle. Il a été montré que le risque de réinfection chez l'enfant est inversement proportionnel au titre d'Ac anti-HRSV circulants. La sécrétion locale d'Ac anti-HRSV (des IgA) est particulièrement efficace, mais elle décroît rapidement dans le temps<sup>3</sup>. Le titre d'IgG circulants décroît plus lentement mais la nature de l'épithélium respiratoire en fait un site difficile d'accès pour ces anticorps. Un taux élevé d'Ac sériques est donc nécessaire pour conférer une immunité au niveau du tractus respiratoire. Le fait que le HRSV possède des protéines capables de moduler la réponse immunitaire de l'hôte (les protéines NS1 et NS2, la protéine G via son motif fractalkine CX3C, etc.) participe également à son échappement au système immunitaire de l'hôte<sup>19</sup>.

Les individus les plus à risque de développer une infection grave sont les enfants, particulièrement les nourrissons de moins de 6 mois, les personnes âgées et les sujets immunodéprimés. D'après une méta-analyse de 2015, l'incidence (par an et pour 1000 habitants) des infections respiratoires basses aiguës dues au HRSV chez les enfants de moins de 5 ans est de 35,6 dans les pays industrialisés et de 50,8 dans les pays en développement. Chez les enfants de moins de 6 mois, l'incidence est de 66,1 et 82,5 respectivement dans ces deux catégories. Le taux d'hospitalisation le plus élevé concerne la catégorie des nourrissons de moins de 6 mois et il est de 27,1 par an et pour 1000 nourrissons dans les pays industrialisés<sup>1</sup>. Les cas de décès chez les enfants de moins de 5 ans ont été estimés à 118 200 en 2015 par cette même étude, mais ce chiffre est controversé car une autre méta-analyse de 2015 rapporte 36 400 décès attribuables au HRSV<sup>8</sup>. Ces deux études se rejoignent sur le fait que la grande majorité des décès a lieu dans les pays en voie de développement (99% d'après Simões & al.<sup>75</sup>). Dans les pays industrialisés, le taux de mortalité suite à une bronchiolite serait compris entre 0,002% et 0,2% chez le



nourrisson de moins d'un an<sup>71</sup>. Il n'existe que très peu d'études concernant les infections dues au HRSV chez les personnes âgées. Il a cependant été montré que le HRSV était responsable d'une augmentation de la mortalité chez les personnes de plus de 65 ans<sup>19</sup>. Une étude espagnole a mis en évidence que le HRSV était responsable de 8% de syndromes pseudo grippaux (le virus Influenza a été retrouvé dans 9% des cas) dans un groupe de 1200 patients inclus. L'âge, le recours à une hospitalisation et la mortalité étaient significativement plus élevés dans le groupe des patients ayant une infection due au HRSV<sup>76</sup>.

Dans les régions tempérées de l'hémisphère Nord, les infections à HRSV évoluent sous forme d'épidémies annuelles, pendant les saisons automne-hiver. Les premiers cas apparaissent généralement au cours du mois d'octobre ou en novembre. L'acmé de l'épidémie est en décembre ou janvier et les derniers cas surviennent généralement en avril. Dans les régions tropicales, le HRSV circule principalement pendant la saison des pluies. Le réservoir du HRSV hors période épidémique n'a pas encore été clairement élucidé, mais il s'agirait probablement d'un réservoir humain<sup>3</sup>. Il a été mis en évidence qu'au cours d'une épidémie, seulement un petit nombre de génotypes circule et qu'ils sont remplacés par des génotypes différents lors de l'épidémie suivante. Ce glissement d'un génotype à l'autre serait favorable pour le virus, en lui permettant d'échapper à l'immunité acquise par son hôte<sup>57,77</sup>.

Les deux sous-groupes antigéniques HRSV-A et HRSV-B co-circulent au cours de la plupart des épidémies mais généralement un groupe prédomine par rapport à l'autre<sup>78</sup>. On a tout d'abord pensé que cela permettait au virus d'échapper à l'immunité acquise par ses hôtes, mais il a été montré que les réinfections par un virus d'un sous-groupe antigénique différent ne sont pas plus fréquentes qu'avec un virus du même sous-groupe. Il existe en effet de nombreux variants au sein de chaque sous-groupe.

Aucun lien entre le groupe antigénique ou le génotype et la gravité clinique de l'infection n'a été mis en évidence pour le moment.

## 2.7. Traitements/vaccination

### 2.7.1. Thérapies curatives

Actuellement, très peu de thérapies à visée curative anti-HRSV sont disponibles sur le marché.

La seule molécule ayant une autorisation de mise sur le marché (AMM) utilisée dans le traitement des infections à HRSV est la ribavirine. C'est un analogue nucléosidique de synthèse, utilisé dans le traitement d'infections virales, efficace contre les virus à ADN et à ARN. Elle a également un effet immuno-modulateur, par stimulation des lymphocytes T auxiliaires (producteurs d'interférons, de cytokines ou d'interleukines). Elle a été utilisée en aérosol pour traiter des infections sévères à HRSV, mais son utilisation est maintenant réduite à des cas particuliers (les patients transplantés principalement) du fait de sa toxicité importante et d'une balance bénéfice/risque peu favorable<sup>75</sup>.

Le traitement des infections à HRSV est donc aujourd'hui principalement symptomatique (oxygénothérapie, hydratation)<sup>79</sup>. Devant l'ampleur et la gravité potentielle des infections à HRSV il est indispensable de mettre au point des traitements antiviraux efficaces et peu toxiques.

#### 2.7.1.1. Inhibiteurs de fusion

Plusieurs molécules permettant d'inhiber l'entrée du virus dans la cellule hôte sont actuellement en phase de développement.

ALX-0171 correspond à des fragments d'Ac, sous forme de nanoparticules administrées par inhalation, dirigés contre la forme pré-fusion de la protéine F. Ce traitement, capable de neutraliser le HRSV *in vitro*, a montré des résultats favorables lors des premières phases de tests cliniques<sup>80</sup>.

GS-5806 (Présatovir) est une molécule administrée par voie orale qui a la capacité d'inhiber la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire. Elle a d'abord été testée avec succès chez des adultes sains chez qui elle a montré sa capacité à diminuer la réplication virale et à limiter la sécrétion de mucus. Les tests ont été

poursuivis dans la population pédiatrique, chez les patients immunodéprimés et âgés, mais les résultats ne sont pas encore publiés.

Les composés VP-14637 and JNJ-2408068 sont de puissants inhibiteurs de fusion par un mécanisme d'action similaire au niveau des régions *heptad-repeat* de la protéine F (régions impliquées dans le changement conformationnel de F au moment de la fusion)<sup>81</sup>. Les études cliniques n'ont pas été poursuivies pour des raisons de toxicité.

JNJ64041575 (Lumicitabine) est un autre inhibiteur de fusion en phase test dans la population pédiatrique, dont les premiers résultats chez l'adulte sain sont encourageants<sup>80</sup>.

#### 2.7.1.2. Inhibiteurs de la polymérase

L'inhibition de la polymérase virale permet le blocage de la synthèse d'ARN viral.

La polymérase virale est l'une des cibles principales des traitements antiviraux. De nombreux inhibiteurs de polymérases sont disponibles sur le marché pour traiter les infections à HIV, VHB, HSV ...

ALS-008176 (prodrogue du composé ALS-008112), est un analogue nucléosidique de la cytidine, terminateur de chaîne. Il est phosphorylé une première fois au niveau plasmatique et son métabolite va rejoindre différentes cibles cellulaires, dont les cellules de l'épithélium respiratoire, où il sera à nouveau phosphorylé en un métabolite actif tri-phosphaté. Après avoir démontré son efficacité *in vitro*, ce composé est actuellement testé en phases cliniques<sup>82</sup>.

BI-D est un inhibiteur non nucléosidique de la polymérase. Il agit en bloquant la fonction de coiffage de la polymérase, ce qui entraîne la synthèse de transcrits avortés (<50 nt) non coiffés. Il n'y a pas d'essais cliniques en cours concernant cette molécule, mais ce mécanisme d'action est prometteur pour de futures molécules antivirales.

AZ-27 est un autre inhibiteur non nucléosidique capable de bloquer à la fois la transcription et la réplication en modifiant la capacité de l'ARN polymérase à adopter la structure conformationnelle lui permettant d'initier la synthèse de l'ARN<sup>83</sup>.

### 2.7.1.3. Autres

D'autres molécules ayant pour cible les protéines N, P, SH et M2-1 sont également en cours de développement<sup>82</sup>.

## 2.7.2. Thérapies préventives

### 2.7.2.1. Vaccins

L'épidémiologie des infections à HRSV a permis d'identifier plusieurs populations cibles d'une vaccination anti-HRSV: les nourrissons de moins de 6 mois, les enfants de plus de 6 mois, les femmes enceintes, les personnes âgées. Les nourrissons de moins de 6 mois correspondent à la population qui devrait être la plus bénéficiaire d'une vaccination efficace étant donné que c'est le groupe ayant le plus souvent une infection grave. Cependant, leur système immunitaire immature et la présence d'Ac maternel circulant dans leur sérum sont deux facteurs pouvant diminuer leur réponse immunitaire à une vaccination. La vaccination des enfants après 6 mois est plus efficace car leur système immunitaire est plus mature. Cette population est moins concernée par les bronchiolites graves, mais les enfants en bas âges sont très souvent en contact avec des nourrissons (à la crèche ou dans la fratrie). Les vacciner pourrait entraîner une diminution de la circulation du virus dans ces populations. La vaccination des femmes enceintes pourrait permettre aux nourrissons de naître avec un taux élevé d'Ac circulants qui les protégerait durant leurs premiers mois de vie<sup>84</sup>.

Depuis de nombreuses années le développement d'un vaccin efficace contre le HRSV est en cours, mais pour le moment, aucun des vaccins testés n'a d'AMM.

Dans les années 1960, un vaccin anti-HRSV a été développé à partir de virus inactivés par le formol. Son utilisation s'est révélée inefficace et même dangereuse car les nourrissons vaccinés ont présenté des infections plus graves que les témoins non vaccinés (80% ont nécessité une hospitalisation contre 5% dans le groupe témoin)<sup>85</sup>. Des études ont montré que la vaccination par un virus inactivé par le formol ne permettait pas une stimulation suffisante du TLR des lymphocytes B, entraînant la production d'Ac de faible affinité pour le virus, avec un faible pouvoir

protecteur. Lors d'une infection future, les Ac circulants n'étaient donc pas en mesure de neutraliser le HRSV et la réaction immunitaire était modifiée avec une activation préférentielle de la voie des Lymphocytes Th2, prédisposant à une expression plus sévère de la maladie<sup>86</sup>.

D'autres vaccins vivants atténués ont été testés (sans retrouver la toxicité du vaccin inactivé par le formol). La vaccination à partir de mutants atténués adaptés au froid était prometteuse<sup>87</sup>, mais a finalement été arrêtée après des essais cliniques qui ont montré une immunogénicité insuffisante chez le jeune enfant<sup>84</sup>. Actuellement, la recherche s'oriente vers des vaccins contenant des mutants obtenus par génétique inverse, permettant de sélectionner les mutations souhaitées<sup>88</sup>. De nombreux essais cliniques avec divers mutants au niveau des gènes SH, N1 et N2, M2-2 sont en cours<sup>84</sup>. Cependant, une des principales interrogations concernant ce type de vaccin est le risque de réversion vers un phénotype sauvage.

Une alternative plus sûre est donc l'utilisation de vaccins sous unitaires préparés à partir de fractions virales. Il s'agit soit d'ADN plasmidique codant pour des antigènes viraux induisant la synthèse d'Ac neutralisants, tels que les glycoprotéines G et F, soit directement de protéines recombinantes. Plusieurs vaccins de ce type sont en cours d'essais cliniques.

Un nouveau type de vaccin est également en cours de développement : un nanovaccin. Le vaccin est encapsulé dans un polymère qui permet un relargage prolongé ainsi qu'une libération ciblée. Des essais prometteurs sont en cours avec une protéine F recombinante encapsulée dans une nanoparticule<sup>89</sup>.

#### 2.7.2.2. Anticorps monoclonaux

Le Palivizumab (Synagis®) est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre un épitope conservé de la protéine F. L'administration prophylactique de cet anticorps monoclonal est conseillée chez les nourrissons ayant des facteurs de risque (cardiopathie congénitale, bronchodysplasie, prématurité). Il nécessite des injections répétées tout au long de la période épidémique et son coût est élevé<sup>82</sup>.

Un autre anticorps monoclonal humanisé, le Motavizumab, un dérivé du Palivizumab dont il diffère de 13 acides aminés, a été testé. Son affinité pour la protéine F est

nettement supérieure, ce qui accroît son potentiel neutralisant *in vitro*. Les études *in vivo* n'ont cependant pas montré de différence d'efficacité entre les 2 molécules et la présence d'effets indésirables cutanés avec le Motavizumab ont conduit à l'abandon de cet Ac monoclonal<sup>79</sup>.

### **3. Objectifs de l'étude**

L'objectif de ce travail était d'étudier l'épidémiologie moléculaire des HRSV-A circulant en Normandie de 2003 à 2018, à partir du gène G complet. De nombreuses études d'épidémiologie des HRSV sont basées sur l'analyse de la séquence de la deuxième région hypervariable du gène G. Depuis quelques années et le développement du séquençage haut débit, cette méthode de classification est remise en cause<sup>14</sup>. Il a été montré qu'une classification à partir de la séquence du gène G complet serait plus discriminante<sup>90</sup>.

Il s'agit de la première étude épidémiologique française des HRSV-A basée sur la séquence complète du gène G.

### **4. Matériels et Méthodes**

#### **4.1. Sélection des échantillons**

Des échantillons positifs pour le HRSV-A collectés pendant 15 saisons hivernales, de 2003 à 2018, ont été inclus dans cette étude rétrospective. Pour chaque saison, l'objectif était d'obtenir une trentaine de virus séquencés. Les échantillons étaient inclus de façon aléatoire, de manière à avoir une répartition homogène sur chaque période hivernale.

La recherche de HRSV était faite à visée diagnostique dans le cadre d'une symptomatologie d'infection respiratoire, lors d'une consultation aux urgences ou au cours d'une hospitalisation. Les échantillons provenaient du CHU de Caen ou des hôpitaux d'Argentan, de Flers, de St Lô, d'Alençon et de Bayeux.

Les échantillons sur lesquels d'autres virus que les HRSV-A étaient co-détectés n'ont pas été inclus.

Les données sur les analyses de recherche de virus respiratoires depuis l'hiver 2011-2012 disponibles sur le système informatique du laboratoire (SIL) de virologie (TD\_NexLab) ont été extraites afin d'étudier l'épidémiologie des infections à HRSV dans la population ayant consulté au CHU de Caen.

## 4.2. Extraction

L'extraction des acides nucléiques viraux a été réalisée sur les échantillons de 2010 à 2018, de manière automatisée, sur QIASymphony<sup>®</sup>-Qiagen. Le kit utilisé était le DSP Virus/Pathogen Mini Kit, version 1. Le protocole d'élution était le Pathogen→Complex 200\_V6\_DSP-respi. Le rapport d'élution était de 2,7 : 110µL d'extrait obtenus à partir de 300µL d'échantillon.

Pour les échantillons plus anciens, l'extraction de l'ARN du HRSV avait été effectuée dans le cadre d'études précédentes, à partir d'une aliquote de surnageant de culture, soit de manière rapide, soit de manière automatisée. Le protocole rapide comprend une centrifugation du surnageant de culture avec le tapis cellulaire afin d'obtenir un culot cellulaire, le lavage avec du PBS (phosphate buffered saline), suivi d'une remise en suspension dans de l'eau DEPC (diéthyl-pyrocabonate) puis chauffage à 100°C pendant 5 minutes pour libérer les ARN. L'extraction automatisée avait été effectuée sur BioRobot M48<sup>®</sup>, avec le kit MagAttract Viral RNA M48 Qiagen<sup>®</sup>, selon les recommandations du fabricant.

L'ensemble des extraits ont été conservés à -20°C.

## 4.3. Détection des HRSV-A

### 4.3.1. Organisation de prise en charge des échantillons respiratoires au laboratoire

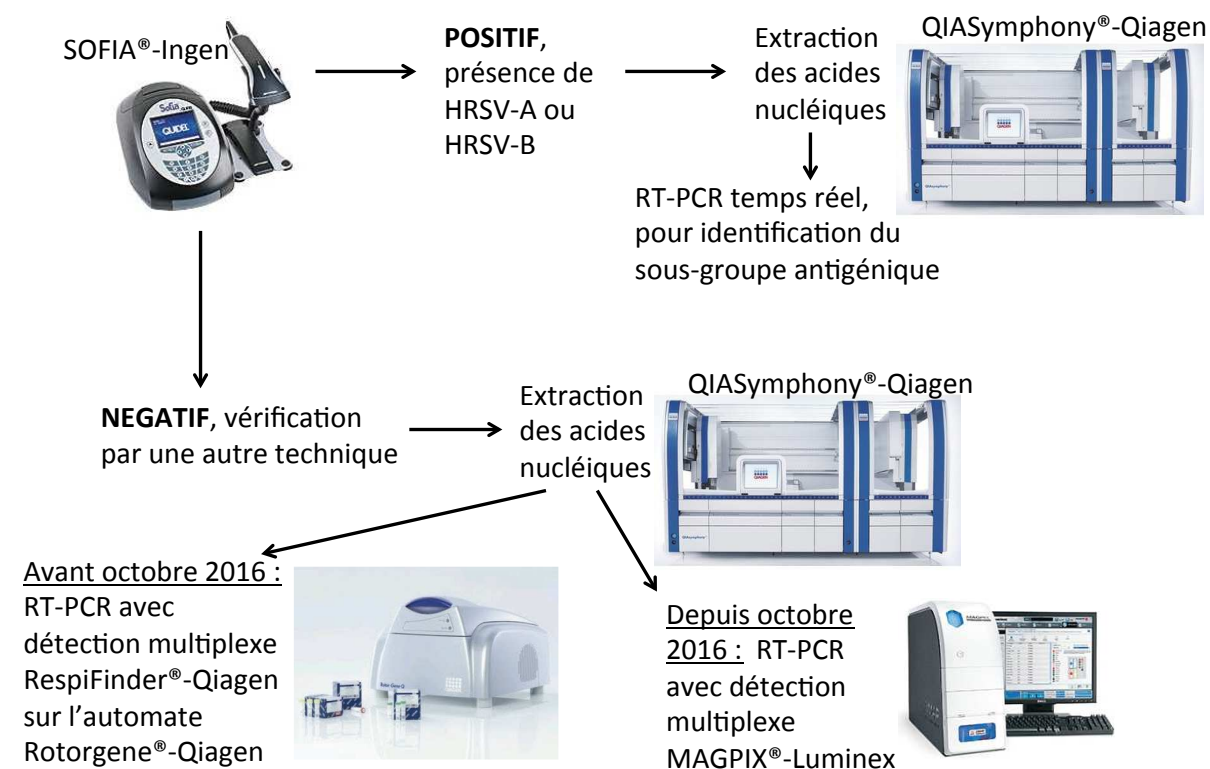
Depuis 2013, le service des urgences pédiatriques du CHU est équipé d'un automate, le Sofia<sup>®</sup>-InGen, qui permet la détection des HRSV-A et B (sans distinction du sous-groupe antigénique) en biologie délocalisée, selon une méthode immunochromatographique, sur des prélèvements nasopharyngés. Les échantillons négatifs sont ensuite contrôlés au laboratoire par une technique plus sensible de biologie moléculaire, et permettant un screening plus large des pathogènes respiratoires : la RT-PCR avec détection multiplexe. Cette technique est réalisée sur un extrait d'acides nucléiques, obtenu par la technique décrite dans le paragraphe 4.2.



De 2011 à octobre 2016, cette recherche était réalisée par la technique RespiFinder®-Qiagen qui pouvait détecter 18 virus, dont les 2 sous-groupes antigéniques du HRSV (A et B) et 4 bactéries.

Depuis octobre 2016, c'est la technologie MAGPIX®-Luminex qui est utilisée. Elle permet la détection de 19 virus (dont les HRSV- A et les HRSV-B) et 2 bactéries (voir Figure 10.)

## Echantillons pédiatriques, depuis 2011



**Figure 10. Prise en charge des échantillons respiratoires de pédiatrie au CHU de Caen**

Aux urgences pédiatriques, recherche de HRSV pendant la saison épidémique par méthode immunochromatographique, sur un automate mis à disposition dans le service (Sofia®-InGen).

Les échantillons négatifs par cette méthode sont pris en charge au laboratoire, par une méthode permettant la recherche d'un panel de pathogènes respiratoires par biologie moléculaire, RespiFinder® de Qiagen avant octobre 2016 et MAGPIX® de Luminex depuis octobre 2016. Dans le cadre de notre étude, les échantillons positifs ont été extraits puis leur sous-groupe antigénique a été déterminé par RT-PCR en temps réel (voir paragraphe 4.3.2).

Depuis octobre 2016, les échantillons provenant des services autres que la pédiatrie sont analysés sur l'automate ePlex®-GenMark, qui ne nécessite pas d'extraction préalable et qui permet la détection de 20 virus (dont les HRSV-A et les HRSV-B) et 3 bactéries. Auparavant cette recherche était réalisée par la technique RespiFinder®-Qiagen (**voir Figure 11.**).

## Autres échantillons

### Avant octobre 2016 :

Extraction des acides nucléiques  
Avec le kit DSP Virus/Pathogen Mini Kit,  
version 1, sur l'automate  
QIASymphony®-Qiagen



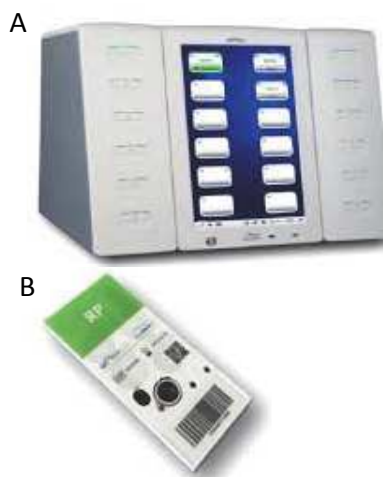
RT-PCR avec détection multiplexe  
RespiFinder®-Qiagen sur l'automate  
Rotorgene®-Qiagen



### Depuis octobre 2016 :

RT-PCR avec détection multiplexe  
ePlex®-GenMark

Dépôt de l'échantillon directement  
dans la cassette d'analyse (B), sans  
extraction au préalable. Insertion de  
la cassette dans l'analyseur (A).



### **Figure 11. Prise en charge des échantillons respiratoires des adultes au CHU de Caen**

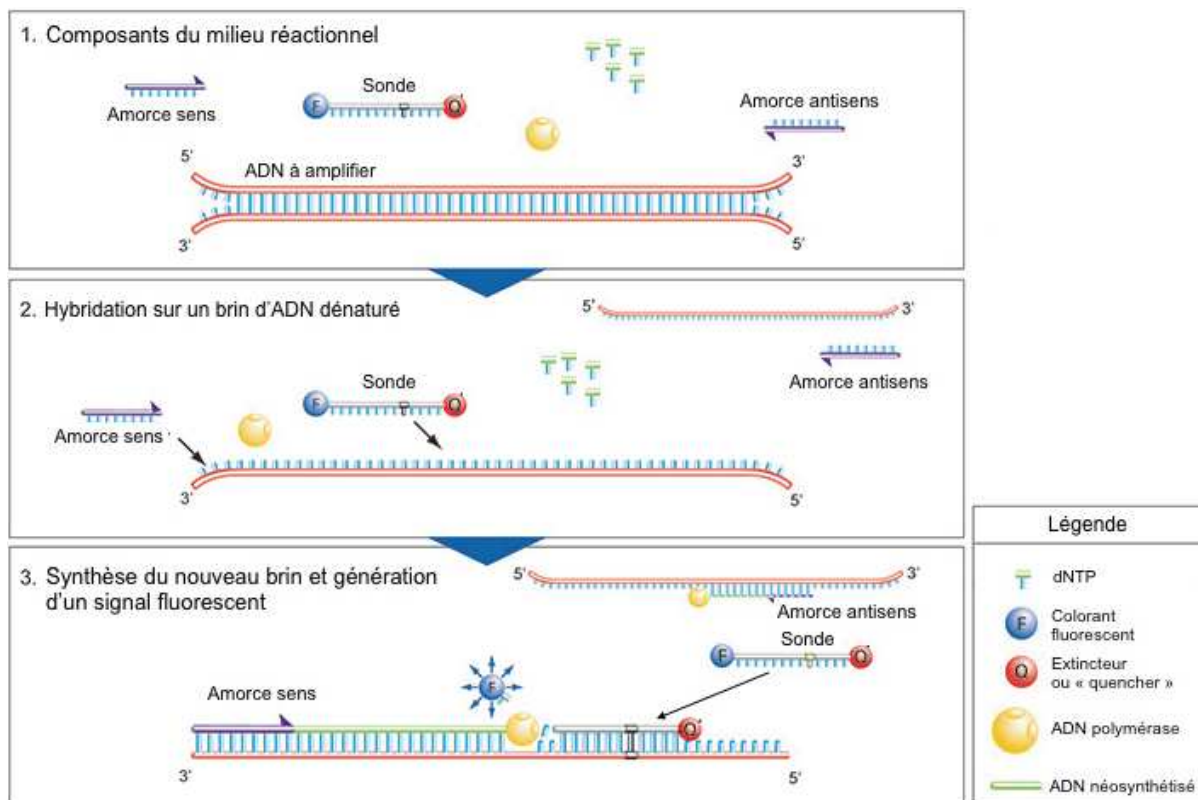
Avant octobre 2016, les échantillons respiratoires des services autres que la pédiatrie étaient pris en charge par la technique RespiFinder®-Qiagen, après extraction selon le protocole décrit au paragraphe 4.2. Depuis octobre 2016, c'est la technique ePlex®-GenMark qui est utilisée. Elle ne nécessite pas d'extraction préalable, l'échantillon est directement introduit dans une cassette unitaire.

Avant 2011 les HRSV étaient mis en évidence par culture cellulaire ou par immunofluorescence.

#### 4.3.2. Détermination du sous-groupe antigénique

Le typage des HRSV a été réalisé sur tous les échantillons antérieurs à 2011 et sur les échantillons prélevés en pédiatrie positifs pour le HRSV sur l'automate Sofia®-InGen depuis 2011.

La technique utilisée était une RT-PCR en temps réel par un système utilisant une sonde d'hybridation Taqman®, permettant une identification du sous-groupe antigénique, ainsi qu'une quantification relative du virus par détermination du Ct (cycle threshold ou cycle seuil). La méthode Taqman® consiste en l'utilisation d'une sonde marquée par un colorant fluorescent à l'extrémité 5' et un « quencher » ou extincteur à l'extrémité 3'. Le quencher inhibe la fluorescence du colorant tant que celui-ci est fixé à la sonde. Lors de la phase d'hybridation, les amorces et la sonde se fixent sur les séquences d'ADN complémentaires. L'ADN polymérase est une enzyme qui possède deux fonctionnalités. Elle synthétise un brin complémentaire de l'extrémité 5' vers 3' à partir d'une matrice. Elle a également une activité exonucléasique lui permettant de cliver des nucléotides. Lorsque l'ADN polymérase, en synthétisant un nouveau brin d'ADN, atteint une sonde TaqMan®, le colorant fluorescent est libéré par clivage (voir **Figure 12.**). La fluorescence émise est mesurée au cours du temps. Le Ct correspond au nombre de cycles d'amplification nécessaires pour que la fluorescence émise par la sonde dépasse un seuil de positivité défini.



**Figure 12. Schématisation de la réaction de RT-PCR en temps réel par méthode Taqman®**

Le milieu réactionnel (1.) se compose de l'ADN à amplifier, d'un couple d'amorce sens et antisens et d'une sonde complémentaires de la séquence nucléotidique à amplifier, d'une enzyme et de dNTP. La sonde contient à une extrémité un colorant fluorescent et à l'autre extrémité un « quencheur » ou extincteur, qui inhibe la fluorescence tant que le colorant est lié à la sonde. Les amorces et la sonde s'hybrident par complémentarité sur un brin d'ADN dénaturé (2.). La synthèse du nouveau brin est effectuée par l'enzyme ADN polymérase. Lorsque celle-ci atteint une sonde fixée sur le brin d'ADN à amplifier, le colorant fluorescent situé à l'extrémité de la sonde est détaché par une nucléase (3.). À chaque cycle de PCR, d'autres molécules du colorant fluorescent sont libérées, ce qui entraîne une augmentation de l'intensité de fluorescence proportionnelle à la quantité d'amplicons synthétisée.

Le mélange réactionnel était préparé avec le kit commercial Superscript III Platinum® One-step Quantitative RT-PCR System de Thermofisher®. Les amorces et les sondes utilisées sont originales et ciblent une région conservée du gène N spécifique des HRSV-A et des HRSV-B (voir **Tableau 2.**).

Le mélange réactionnel contenait : 1,2 µL d'eau pour PCR, 12,5 µL de tampon 2X, 0,3 µL de MgSO<sub>4</sub>, 1 µL de chaque amorce, 0,5 µL de chaque sonde, 1 µL d'enzyme Superscript, 5µL d'extrait.

Dans chaque série, un témoin positif et un témoin négatif ont été inclus. Le témoin positif pour le HRSV-A était un surnageant de culture de référence HRSV-A2 (souche ATCC VR1302) dilué au 1/100. Le témoin positif pour le HRSV-B était un surnageant de culture de la souche de référence B1wt (ATCC) dilué au 1/1000.

**Tableau 2. Amorces et sondes utilisées pour la détermination du sous-groupe antigénique des HRSV par RT-PCR en temps réel**

Noms des amorces et des sondes	Séquences nucléotidiques 5'-3'	Taille (nt)	Tm (°C)
<u>Amorces HRSV-A :</u>			
VRSAN-Fw	CAT CCA GCA AAT ACA CCA TCC A	22	66,6
VRSAN-Rv	TTC TGC ACA TCA TAA TTA GGA GTA TCA A	28	64,3
<u>Sonde HRSV-A :</u>			
VRSAN probe	(6FAM) CGG AGC ACA GGA GAT (BHQ1)	15	55
<u>Amorces HRSV-B :</u>			
VRsBN-Fw	AAT ACA GCC AAA TCT AAC CAA CTT TAC A	28	64,3
VRsBN-Rv	GAC AAG GAA GCA TGC AAT AAA	21	61,6
<u>Sonde HRSV-B :</u>			
VRsBN probe	(Hex) CAC TAT TCC TTA CTA AAG ATG TC (BHQ1)	23	53,1

L'amplification a été réalisée sur l'automate SmartCycler®-Cepheid selon le programme suivant : 50°C pendant 15 minutes, 95°C pendant 3 minutes, puis 45 cycles : 95°C pendant 15 secondes, 60°C pendant 40 secondes, puis 40°C pendant 40 secondes.

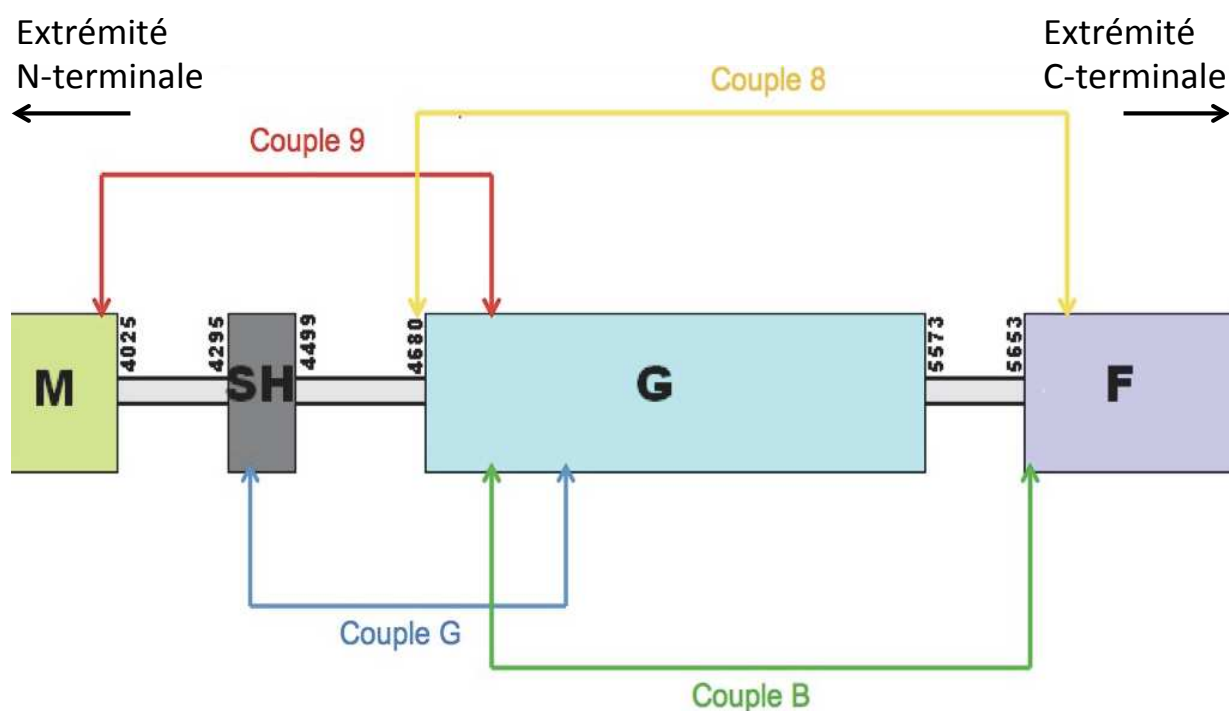
## 4.4. Amplification du gène G complet

### 4.4.1. Choix des amorces

Le gène G ayant une taille comprise entre 900 et 1000 Nt environ selon le génotype, a été amplifié en 2 parties afin de pouvoir obtenir une séquence complète. Au moins deux couples d'amorces étaient donc nécessaires et devaient permettre d'obtenir des produits d'amplification se chevauchant sur une centaine de nucléotides afin d'obtenir un seul contig après séquençage. De nombreux couples d'amorces ont été testés. Parmi ceux-là quatre couples nous permettaient d'obtenir un signal d'amplification spécifique et ont été retenus pour l'étude (voir **Tableau 3.**). Deux d'entre eux permettaient l'amplification de la partie N-terminale (couples 9 et G) et les deux autres couples amplifient la partie C-terminale du gène G (couples 8 et B) (voir **Figure 13.**).

**Tableau 3. Caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification du gène G complet**

Couples	Nom des amorces sens et anti-sens	Position (Nt) sur la souche de référence JX015491.1 après alignement	Séquence nucléotidique 5'-3'	Taille de l'amorce	Tm (°C)	Taille du fragment amplifié
8	RSVpreG4625Fw RSVF5686Rv	4666 5747	GGG CAA ATG CAA MCA TGT CCA A AAT TCT TCA GTG ATG TTT TGA	22 21	70,5 56,3	1081
9	RSVM4040Fw RSVG49000 Rv	3975 4837	AAT TGG AAG CAY ACA GCT ACA CG GAR GTT GAG ATT ATC ATT GCC A	23 22	64 57,8	862
B	RSVG4776Fw RSVF5603Rv	4817 5663	GGC AAT GAT AAT CTC AAC GGC AAC TCC ATT GTT ATT TG	21 23	52,5 59,5	846
G	RSVSH4323Fw RSVG4930Rv	4323 4941	TCT CAA GCA AAT TCT GGC CT GGT TTG TGT TCT TGA TCT GG	20 20	63,8 59,6	618



**Figure 13. Représentation du positionnement des couples d'amorces sur la séquence de référence JX015491.1 publiée sur GenBank<sup>91</sup>**

Les gènes sont représentés par des rectangles de couleur avec leur nom à l'intérieur, les nucléotides de début et de fin du gène sont mentionnés de chaque côté du rectangle. Les régions intergéniques sont représentées par les deux traits noirs. Le schéma n'est pas à l'échelle.

Les amorces sont représentées par les flèches et le fragment amplifié par chaque couple est représenté par un trait horizontal de couleur (le code couleur utilisé est le même que dans le Tableau 3.)

Les couples B et 9 avaient été utilisés lors d'études précédentes au laboratoire. Le couple 8 est issu d'une publication<sup>92</sup>. Les séquences des amorces du couple G ont été définies pour compléter le début du gène G. Ces amorces ont été choisies dans deux régions conservées déterminées à partir d'un alignement de 15 génomes complets de souches de références publiées dans GenBank. Les couples B et G étaient utilisés en première intention. Lorsque l'un d'entre eux ou les deux ne fonctionnaient pas, les couples 8 et/ou 9 étaient testés.

#### 4.4.2. Amplification

La technique utilisée était une RT-PCR classique, en point final, sur le Thermocycler GeneAmp® PCR System 2700-Applied Biosystems. Le protocole d'amplification était le suivant : 50°C pendant 30 minutes, 94°C pendant 15 minutes, puis 40 cycles : 94°C pendant 30 secondes, 55°C pendant 30 secondes, 72°C pendant 1 minute ; puis 72°C pendant 10 minutes.

Le kit utilisé était le kit Qiagen® One Step RT-PCR. Le mélange réactionnel de 20 µL contenait : 12 µL d'eau pour PCR, 5 µL de tampon 5X, 1 µL de désoxyriboNucléotide Tri-Phosphate (dNTP), 0,5 µL de chaque amorce, 1 µL de Taq-polymérase, 5 µL d'extrait.

Le témoin positif utilisé était un surnageant de culture d'une souche de référence HRSV-A2 (souche ATCC VR1302) dilué au 1/100.

Les amplicons étaient conservés à +4°C jusqu'au séquençage.

#### 4.4.3. Contrôle de l'amplification

Le contrôle de l'amplification était réalisé par électrophorèse sur un gel d'agarose additionné de GelRed®-Biotium, un agent intercalant de l'ADN. Le gel était préparé à partir d'une solution à 1,67% d'agarose (2g d'agarose dans 120 mL de tampon TBE 10X), chauffée 2 minutes au micro-onde. Après ajout de 8 µL d'agent intercalant GelRed®, la solution était coulée dans une plaque de moulage puis laissée à refroidir minimum une heure à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Le protocole de dépôt était le suivant : mélanger 2  $\mu\text{L}$  de Bleu de Bromophénol avec 5  $\mu\text{L}$  d'amplicon et les déposer au fond d'un puits. Pour estimer la taille des amplicons, déposer au début de chaque rangée de puits le mélange suivant : 1  $\mu\text{L}$  de marqueur de taille Invitrogen® DNA Ladder 100pb, 2  $\mu\text{L}$  de Bleu de Bromophénol et 5  $\mu\text{L}$  d'eau.

La révélation était effectuée par UV sur l'automate ChemiDoc™ XRS+ System-BioRad, après une migration de 45 minutes à 110V.

## 4.5. Séquençage

Le séquençage des produits d'amplification a été réalisé par la méthode de Sanger.

Les amplicons ont d'abord été purifiés, puis une réaction de marquage a été réalisée. Les produits de marquage ont été purifiés avant d'être déposés sur le séquenceur Applied 3500® -ThermoFisher Scientific.

### 4.5.1. Purification des produits d'amplification

Le mélange enzymatique Illustra ExoProStar™ 1-step -GE Healthcare Lifescience, combinant une exonucléase I et une phosphatase alcaline, a été utilisé pour purifier les amplicons. Il permet l'élimination des amorces et des dNTP en excès. Le mélange réactionnel comportait 2 $\mu\text{L}$  d'ExoProStar™ et 5 $\mu\text{L}$  d'amplicon. La réaction de purification a été réalisée sur le Thermocycler GeneAmp® PCR System 2700 - Applied Biosystems selon le programme suivant : 37°C pendant 15 minutes puis 80°C pendant 15 minutes.

### 4.5.2. Réaction de marquage

Le kit BigDye Terminator® version 1.1 -ThermoFisher Scientific était utilisé pour réaliser la réaction de marquage. Le mélange réactionnel contenait : 13  $\mu\text{L}$  d'eau pour PCR, 2  $\mu\text{L}$  du « ready reaction mix » fourni dans le kit, 3  $\mu\text{L}$  de tampon de séquençage 5X et 1  $\mu\text{L}$  d'amorce (*forward* ou *reverse*), soit 19  $\mu\text{L}$  auxquels était ajouté 1 $\mu\text{L}$  d'amplicon purifié. La réaction était réalisée sur le Thermocycler GeneAmp® PCR System 2700 -Applied Biosystems selon le programme suivant :



96° pendant 1 minute, puis 30 cycles comprenant une étape à 96°C pendant 10 secondes, une 2<sup>ème</sup> étape à 60°C pendant 5 secondes et une dernière étape à 60°C pendant 4 minutes.

#### 4.5.3. Purification des produits de marquage

Les produits de marquage étaient ensuite purifiés avec la résine Sephadex™G-50 Superfine -Sigma Aldrich. Elle permet de désaler les échantillons et d'éliminer les nucléotides non incorporés et les amorces en excès. La limite d'exclusion de la résine est d'environ 20 nucléotides. La résine était préparée extemporanément, en distribuant 500 µL d'une solution de Sephadex™ à 5% en deux fois, dans chaque puits d'une plaque 96 puits MultiScreen®-HV. Après chacun des dépôts, la plaque était centrifugée à 910G pendant 5 minutes, permettant d'éliminer l'eau et de compacter la résine en mini-colonnes. Les amplicons marqués étaient déposés au centre de ces minicolonnes et centrifugés 5 minutes à 910G. Ils étaient récupérés dans une plaque 96 puits. La dernière étape avant le dépôt sur le séquenceur était l'ajout de 10µL de Formamide Hi-Di™ -ThermoFisher Scientific dans chaque puits.

#### 4.6. Analyse des séquences obtenues et phylogénie

Les chromatogrammes obtenus par séquençage ont été vérifiés un par un et les éventuels artéfacts corrigés. Un seul contig par échantillon a été obtenu par assemblage des 2 fragments se superposant sur une centaine de paire de bases, avec le logiciel Sequencher 5.4.6 –Gene Codes Corporation. La séquence nucléotidique a été confirmée par 2 chromatogrammes (sens et antisens) pour chacun des 2 fragments amplifiés.

Dans l'analyse ont été incluses des séquences de référence publiées dans GenBank, représentant 9 des 13 génotypes connus. Les séquences du gène G complet des génotypes GA3, GA4, GA6 et SAA1 n'étaient pas disponibles dans GenBank. Au total, pour l'analyse, 50 séquences de référence ont été utilisées. Les alignements ont été réalisés avec les logiciels BioEdit version 7.6.2., SeaView version 4.6.1 et AliView. Une analyse phylogénétique des séquences de référence a été réalisée afin d'obtenir un arbre de référence et de visualiser les différents clusters.

Les séquences du gène G complet obtenues ont été analysées par saison épidémique. Un alignement global de l'ensemble des séquences obtenues et des séquences de références a également été réalisé.

Les arbres phylogéniques ont été construits avec le logiciel MEGA® 6.0 en utilisant la méthode du *Neighbor-Joining* et en appliquant la correction de distance Kimura 2-parameter. L'analyse a été complétée par un *bootstrapping*, avec un échantillonnage des positions de l'alignement pour relancer la construction phylogénétique et comparaison des résultats obtenus après 1000 répétitions. La valeur de *bootstrap* représente le nombre de fois où cette branche a été retrouvée au fil des répétitions.

Chaque séquence a été nommée avec le numéro d'échantillon attribué par le SIL au moment de l'enregistrement au laboratoire de virologie ainsi que l'année de la saison hivernale pendant laquelle le virus a été isolé. Par exemple pour l'hiver 2003-2004, il est noté 2003 dans le nom de la séquence.

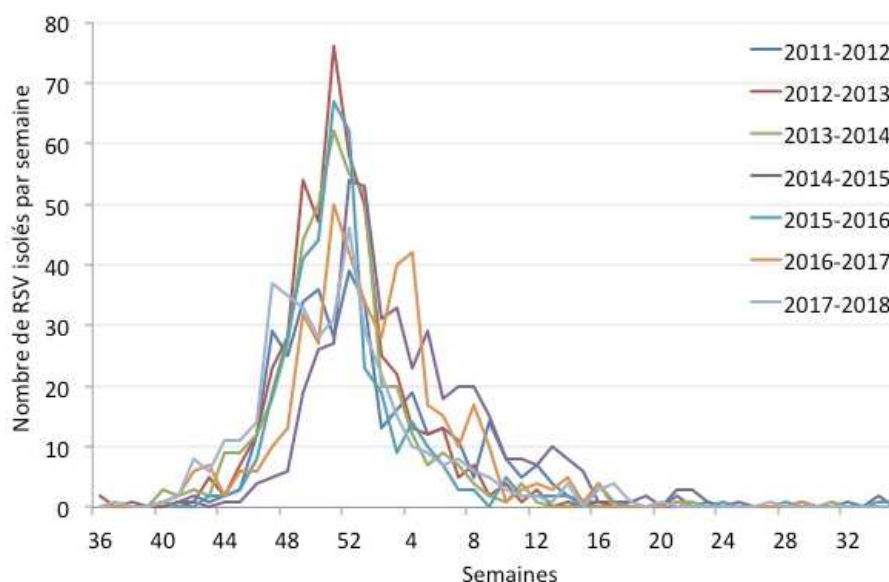
## 5. Résultats et discussion

### 5.1. Epidémiologie des infections à HRSV en Normandie de 2011 à 2018

#### 5.1.1. Résultats

Depuis l'hiver 2011-2012, la recherche de virus respiratoires sur un prélèvement nasopharyngé est réalisée selon la stratégie détaillée dans le paragraphe 4.3.1 « Organisation de prise en charge des échantillons respiratoires au laboratoire » .

Dans l'expérience de notre laboratoire sur la période de notre étude, la majorité des cas sont retrouvés pendant la saison épidémique, de fin octobre au mois d'avril. Les premiers HRSV sont généralement isolés autour de la semaine 43, l'acmé de l'épidémie a lieu entre la semaine 51 et la semaine 2. Le pic épidémique pour chaque saison est superposable. Le nombre de cas diminue jusqu'en avril. De mai à octobre, des HRSV peuvent être isolés de façon sporadique. Ces données sont présentées dans la **Figure 14**.



**Figure 14. Nombre de HRSV isolés chaque semaine, par saison épidémique, de 2011 à 2018.**

Dans ce graphique, est représenté le nombre de HRSV identifiés chaque semaine au laboratoire de virologie pendant 7 saisons épidémiques. Chaque courbe représente une saison épidémique.

La représentation débute semaine 36 (début septembre), jusqu'à la semaine 34 (fin août) de l'année suivante.

En moyenne depuis 2011, un peu plus de 4750 échantillons respiratoires sont analysés chaque année au laboratoire de virologie du CHU de Caen (voir **Tableau 4.**). Du fait de l'épidémiologie des infections à HRSV, les patients ont été classés en 4 groupes d'âges : les nourrissons de moins de 2 ans, les enfants de 2 à 5 ans, les enfants de plus de 5 ans avec les adultes de moins de 65 ans et les personnes âgées de plus de 65 ans.

**Tableau 4. Nombre d'échantillons respiratoires reçus au laboratoire par an (du 01/09 au 31/08) et pourcentage d'échantillons positifs pour le HRSV**

Année	Nombre d'échantillons respiratoires	Nombre d'échantillons positifs pour le HRSV	Pourcentage d'échantillons positifs pour le HRSV, tous les âges confondus
2011-2012	4510 1624 - 491 - 1353 - 1042	383 286 - 40 - 25 - 32	8,5%
2012-2013	4238 1701 - 492 - 1289 - 756	476 371 - 47 - 24 - 34	11,2%
2013-2014	4219 1721 - 502 - 1213 - 783	438 349 - 40 - 18 - 31	10,4%
2014-2015	4745 1694 - 492 - 1407 - 1152	449 355 - 45 - 24 - 25	9,5%
2015-2016	5134 1805 - 569 - 1540 - 1220	430 345 - 35 - 24 - 26	8,4%
2016-2017	5101 1467 - 400 - 1431 - 1803	440 289 - 59 - 24 - 68	8,6%
2017-2018	5418 1256 - 405 - 1685 - 2072	397 270 - 36 - 33 - 58	7,3%
<b>Moyenne</b>	4766,4	430,4	9,1% ± 1,3%

Légende : **Total**, < 2 ans ; 2-5 ans ; 5-65 ans ; > 65 ans

On observe une évolution du nombre d'échantillons respiratoires vers la hausse, du fait d'une augmentation des prélèvements respiratoires réalisés chez les personnes âgées de plus de 65 ans. La proportion d'échantillons respiratoires par catégorie d'âge a également évolué. Jusqu'en 2015-2016, c'est la catégorie des moins de 2 ans qui contenait le plus grand nombre de prélèvements respiratoires. Pendant les 2 dernières années étudiées, la catégorie des plus de 65 ans a le plus grand nombre d'échantillons respiratoires.

En moyenne, 9,1% de l'ensemble des échantillons respiratoires sont positifs pour le HRSV, mais cette proportion varie en fonction de l'âge des patients.

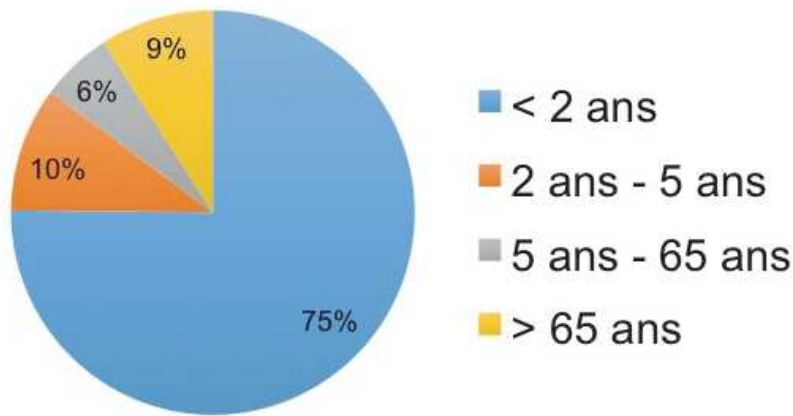
La répartition des échantillons analysés par catégorie d'âge est représentée sur la **Figure 15**. Un prélèvement respiratoire sur trois (34%) est effectué chez un enfant de moins de 2 ans, 26% des échantillons concernent des patients âgés de plus de 65 ans. La catégorie des patients dont l'âge est compris entre 2 et 5 ans représente 10% des échantillons. 30% des échantillons sont prélevés chez des patients de la catégorie 5-65 ans.



**Figure 15. Distribution des échantillons respiratoires par catégorie d'âge**

Un tiers des échantillons respiratoires concernent des enfants de moins de 2 ans. Un échantillon sur quatre est prélevé chez un patient de plus de 65 ans. Au total, 70% des échantillons concernent des enfants de moins de 5 ans ou des personnes âgées.

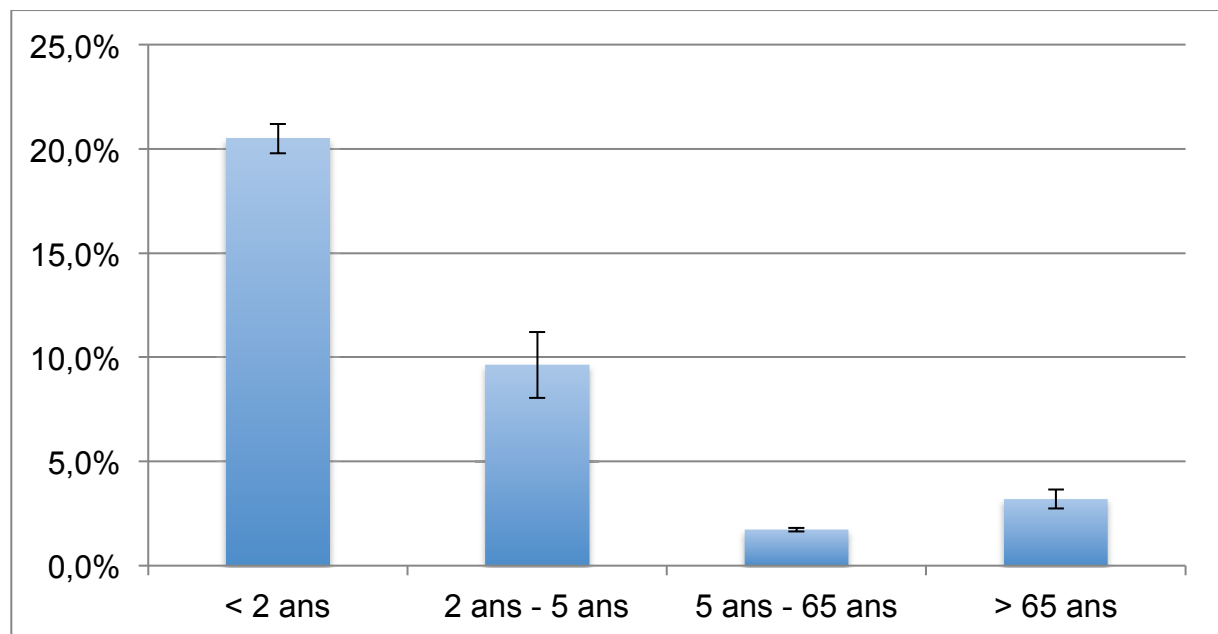
La distribution des virus respiratoires syncytiaux par catégorie d'âge nous montre que 75% des HRSV isolés proviennent d'échantillons prélevés chez des patients de moins de 2 ans (**Figure 16**). Dix pourcents sont isolés chez des patients dont l'âge compris entre 2 et 5 ans, 6% dans la catégorie des 5-65 ans et 9% chez des personnes âgées de plus de 65 ans.



**Figure 16. Représentation sous forme de secteur de la répartition de l'âge des patients chez qui un HRSV a été isolé**

Trois virus respiratoires syncytiaux sur quatre sont isolés chez des patients de moins de 2 ans, 10% chez les 2-5 ans et 6% chez les 5-65 ans et 9% chez des patients de plus de 65 ans.

Par conséquent, le pourcentage d'échantillons positifs pour le HRSV par catégorie d'âge est très variable, il atteint 20% chez les enfants de moins de 2 ans, 10% dans la catégorie des 2-5 ans et 3,2% chez les personnes âgées de plus de 65 ans. Seulement 1,7% des échantillons respiratoires prélevés chez des patients de la catégorie 5-65 ans sont positifs pour le HRSV (voir **Figure 17.**).



**Figure 17. Pourcentage moyen d'échantillons positifs pour le HRSV par catégorie d'âge**

Plus de 20% des échantillons respiratoires prélevés chez des enfants de moins de 2 ans sont positifs pour le HRSV. Ce pourcentage est de moins de 10% chez les enfants de 2 à 5 ans, il est de 1,7% chez les patients de 5 à 65 ans et de 3,2% chez les personnes de plus de 65 ans.

### 5.1.2. Discussion

L'analyse épidémiologie a été réalisée sur les épidémies de 2011-2012 à 2017-2018, depuis la mise en place du SIL permettant de réaliser des extractions de données. Concernant les épidémies des années 2003-2004 à 2010-2011, les données n'étaient pas complètes.

Les données épidémiologiques de notre étude montrent que le virus circule en Normandie tous les ans à la même période, de fin octobre jusqu'en avril de l'année suivante. Le pic épidémique a lieu entre fin décembre et mi-janvier. Ces résultats sont comparables aux données épidémiologiques rapportées en Europe, entre 2010 et 2016<sup>93</sup>.

Le nombre d'échantillons respiratoires reçus au laboratoire est en hausse sur les 2 dernières années de notre étude, principalement du fait de l'augmentation des prélèvements chez les patients âgés de plus de 65 ans. Jusqu'en 2015, le nombre d'échantillons prélevés chez des patients de plus de 65 ans était compris entre 756 et 1220, ce qui représentait entre 18 et 24% des échantillons respiratoires analysés. Ce nombre a significativement augmenté en 2016. Nous avons analysé 1803 échantillons respiratoires prélevés chez des patients de plus de 65 ans en 2016 et 2072 en 2017, ce qui représentait respectivement 35% et 38% des échantillons respiratoires analysés. Cette augmentation correspond à la mise en place dans le laboratoire de la recherche de virus et de bactéries responsables d'infections respiratoires avec l'automate ePlex®-GenMark, permettant la réalisation d'une RT-PCR multiplex sans extraction préalable, en 1h30. Il serait intéressant de voir si cette tendance se confirme pendant les prochaines années. Dans le cadre d'une infection respiratoire aiguë, le rendu rapide de résultats a un impact direct dans la prise en charge des patients, par exemple la mise en isolement si le virus de la grippe est identifié. Aussi, l'identification d'une étiologie virale permet également de limiter la prescription d'antibiotique dans certaines situations.

## 5.2. Sélection des échantillons et séquençage

### 5.2.1. Résultats

Au total, 524 échantillons collectés pendant la période étudiée ont été inclus. La répartition du nombre d'échantillons inclus par saison épidémique ainsi que le nombre d'échantillons séquencés sont détaillés dans le **Tableau 5**. Pour la plupart des épidémies, nous avons pu inclure un peu plus de 30 échantillons dans le but d'obtenir 30 séquences. Nous avons inclus moins de 30 échantillons pendant les épidémies de 2009-2010, 2010-2011 et 2012-2013.

**Tableau 5. Répartition des échantillons inclus, séquencés et nombre d'échecs d'amplification, dont amplification partielle du gène G, par saison épidémique**

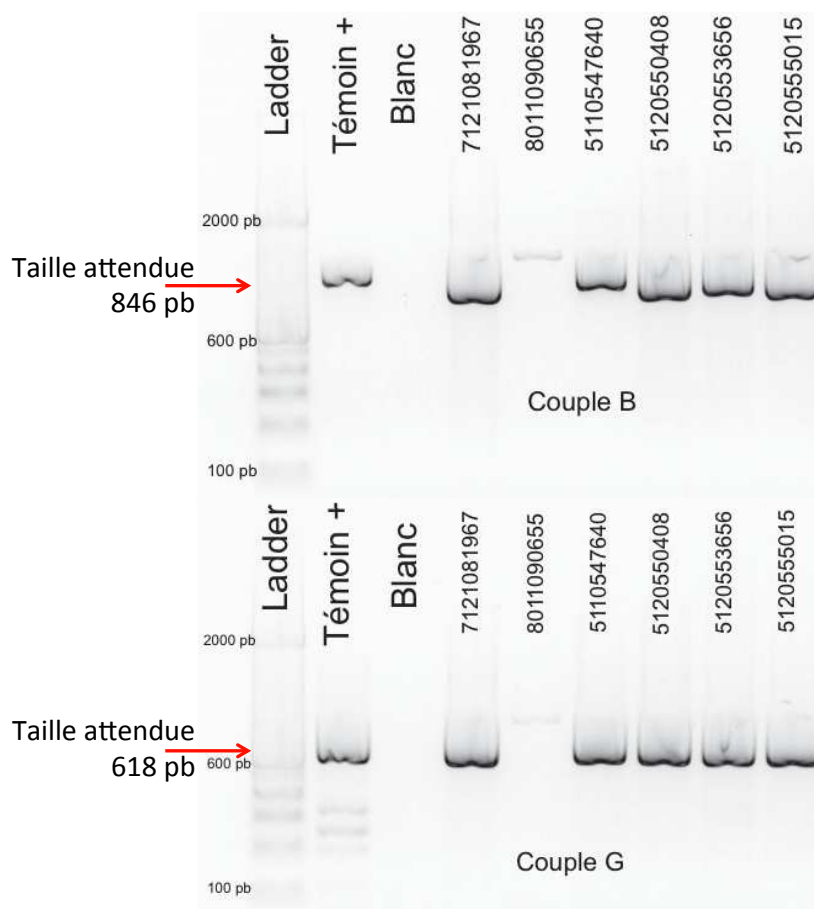
Saison	Nombre d'échantillons inclus	Nombre de séquences du gène G complet obtenues	Échec d'amplification	
			Total Nombre (%)	Dont amplification partielle
2003-2004	36	18	18 (50)	14/18
2004-2005	37	17	20 (54)	10/20
2005-2006	36	9	27 (75)	8/27
2006-2007	36	11	25 (70)	20/25
2007-2008	32	19	13 (41)	5/13
2008-2009	37	10	27 (73)	16/27
2009-2010	23	8	15 (65)	13/15
2010-2011	6	4	2 (33)	2/2
2011-2012	40	26	14 (35)	3/14
2012-2013	23	9	14 (61)	3/14
2013-2014	70	45	25 (36)	12/25
2014-2015	37	30	7 (19)	4/7
2015-2016	36	31	5 (14)	3/5
2016-2017	41	32	9 (22)	7/9
2017-2018	34	28	3 (18)	3/6
Total	<b>524</b>	<b>297</b>	<b>227 (43)</b>	<b>123/227</b>

Pour 43% des échantillons inclus, le séquençage a été un échec, du fait d'une absence d'amplification d'au moins deux des quatre couples d'amorces, ce qui ne permettait pas d'obtenir la séquence complète du gène G. Ce chiffre est fluctuant



d'une saison épidémique à l'autre et varie de 75% d'échec pour l'épidémie de 2005-2006 à 14% d'échec en 2015-2016. On distingue deux types d'échecs : échec d'amplification totale lorsqu'aucune des RT-PCR avec chacun des quatre couples testés n'a fonctionné ; échec d'amplification partielle lorsque l'amplification n'a fonctionné qu'avec un seul couple, ou bien lorsque la superposition des fragments séquencés ne permettait pas d'obtenir un seul contig.

Parmi les 524 échantillons inclus, 313 ont été amplifiés par 2 couples d'amorces. Les résultats d'amplification sont montrés pour 6 échantillons sur la **Figure 18**.



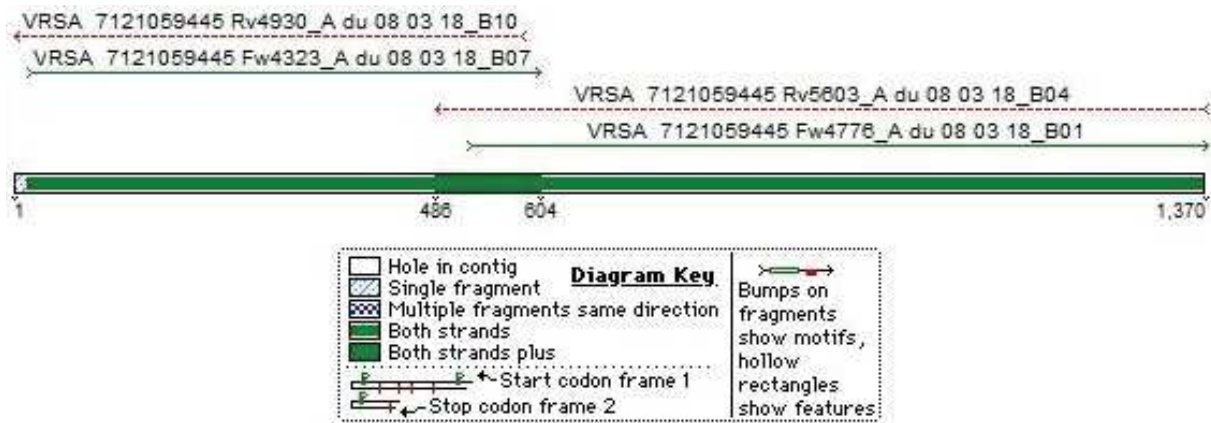
**Figure 18. Exemple d'électrophorèse de produits amplifiés avec le couple B et le couple G**

Cette image correspond à la révélation par UV après migration pendant 45 minutes à 110V des produits d'amplification par RT-PCR avec les couples B et G, permettant de couvrir entièrement le gène G. La taille attendue des amplicons obtenus avec le couple B est de 846 paires de bases (pb). Celle des amplicons obtenus avec le couple G est de 618 pb.

Le marqueur de taille (ladder) utilisé était Invitrogen® DNA Ladder 100pb. Le témoin positif était un HRSV-A2 (souche ATCC VR1302) dilué au 1/100.

Tous les extraits ont été correctement amplifiés, à l'exception du n°8011090655 pour lequel il n'y a pas de bande à la taille attendue.

Les deux fragments de ces 313 échantillons ont ensuite été séquencés par méthode Sanger, puis assemblés avec le logiciel Sequencher afin d'obtenir un seul contig du gène G complet (voir **Figure 19.**). Nous avons obtenu une séquence du gène G complet pour 297 échantillons.



**Figure 19. Situation des séquences obtenues pour l'analyse du gène G avec le logiciel Sequencher.**

Les séquences sens sont représentées par un trait fin vert. Les séquences antisens sont représentées par un trait pointillé. Le premier fragment de 604 paires de bases obtenu avec le couple G et le second fragment de 884 paires de bases obtenu avec le couple B se superposent sur environ 120 paires de bases. Le contig obtenu mesure 1370 paires de bases.

### 5.2.2. Discussion

Le nombre d'échantillons inclus pour les hivers 2009-2010, 2010-2011 et 2012-2013 est inférieur à l'objectif fixé. Très peu d'échantillons de l'année 2010 et de la saison épidémique 2010-2011 avaient été conservés, seulement 6 échantillons ont pu être inclus pour l'hiver 2010-2011. Les échantillons de l'hiver 2009-2010 inclus avaient tous été collectés avant le 31/12/2009. Peu de HRSV-A ont été inclus pour l'épidémie de 2012-2013, car c'est le sous-groupe HRSV-B qui avait majoritairement circulé pendant cette épidémie. En 2013-2014, le nombre d'échantillons inclus est plus élevé car cette épidémie a fait l'objet d'un sujet de Master 1, ce qui a permis une analyse d'un plus grand nombre de séquences.

Le nombre de virus séquencés par hiver (surtout pour les hivers antérieurs à l'année 2013) n'atteint pas l'objectif fixé et ne permet pas d'avoir une représentation significative des génotypes circulants par saison épidémique. Cependant, les résultats obtenus sont similaires à ce qui est décrit dans la littérature et nous informent donc sur la tendance de l'évolution des génotypes de HRSV-A en Normandie.

Le taux d'échec d'amplification est élevé mais variable d'une année sur l'autre. Il est plus faible sur les dernières saisons étudiées, on peut supposer que la durée de conservation a un impact sur la dégradation de l'échantillon. Cependant, dans un peu plus de la moitié des cas, nous avons obtenu une amplification partielle (une seule partie du gène). Se pose donc la question d'un défaut de sensibilité des amorces, qui ne permettraient pas d'amplifier des virus dont la séquence serait différente au niveau du site de fixation des amorces.

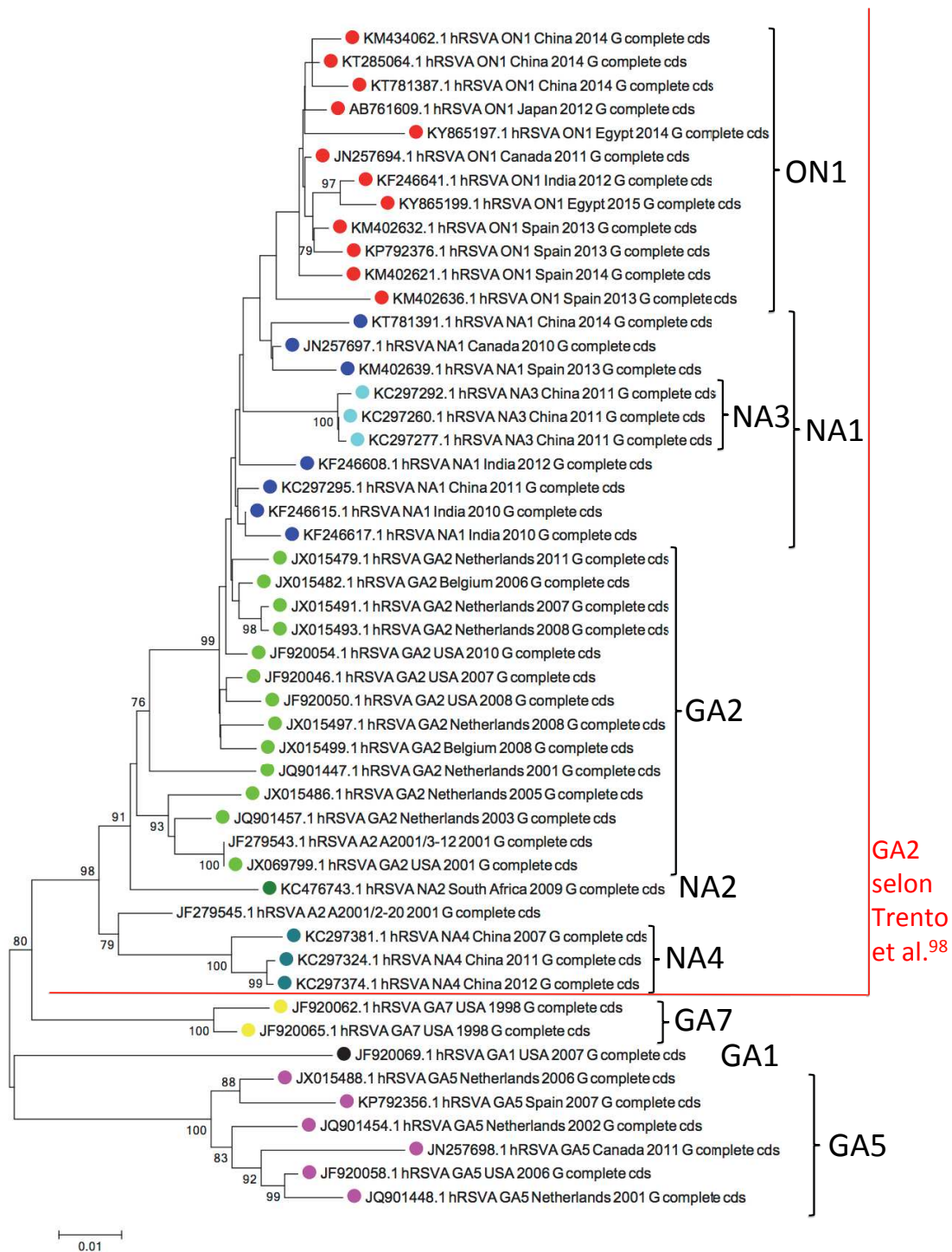
## 5.3. Analyse des séquences obtenues et phylogénie

### 5.3.1. Résultats

L'analyse phylogénétique a été réalisée sur la séquence du gène G complet qui comprend 894 nucléotides pour tous les génotypes à l'exception du génotype ON1. Le gène G du génotype ON1 contient 966 nucléotides suite à une duplication de 72 nucléotides. Cinquante séquences de références publiées dans GenBank<sup>62,63,94-97</sup> ont été incluses dans l'analyse et utilisées pour la construction des différents arbres phylogénétiques.

Une analyse initiale permettant la visualisation des clusters génotypiques a été réalisée par la construction d'un arbre avec les 50 séquences de référence (voir **Figure 20.**)

Sur cet arbre, on observe que les génotypes GA1, GA5 et GA7 appartiennent à des clusters d'identification bien définis. Ce n'est pas le cas des génotypes NA1, NA3, ON1 et GA2 qui semblent appartenir au même cluster. Les génotypes étiquetés NA3 sont inclus avec les génotypes NA1.

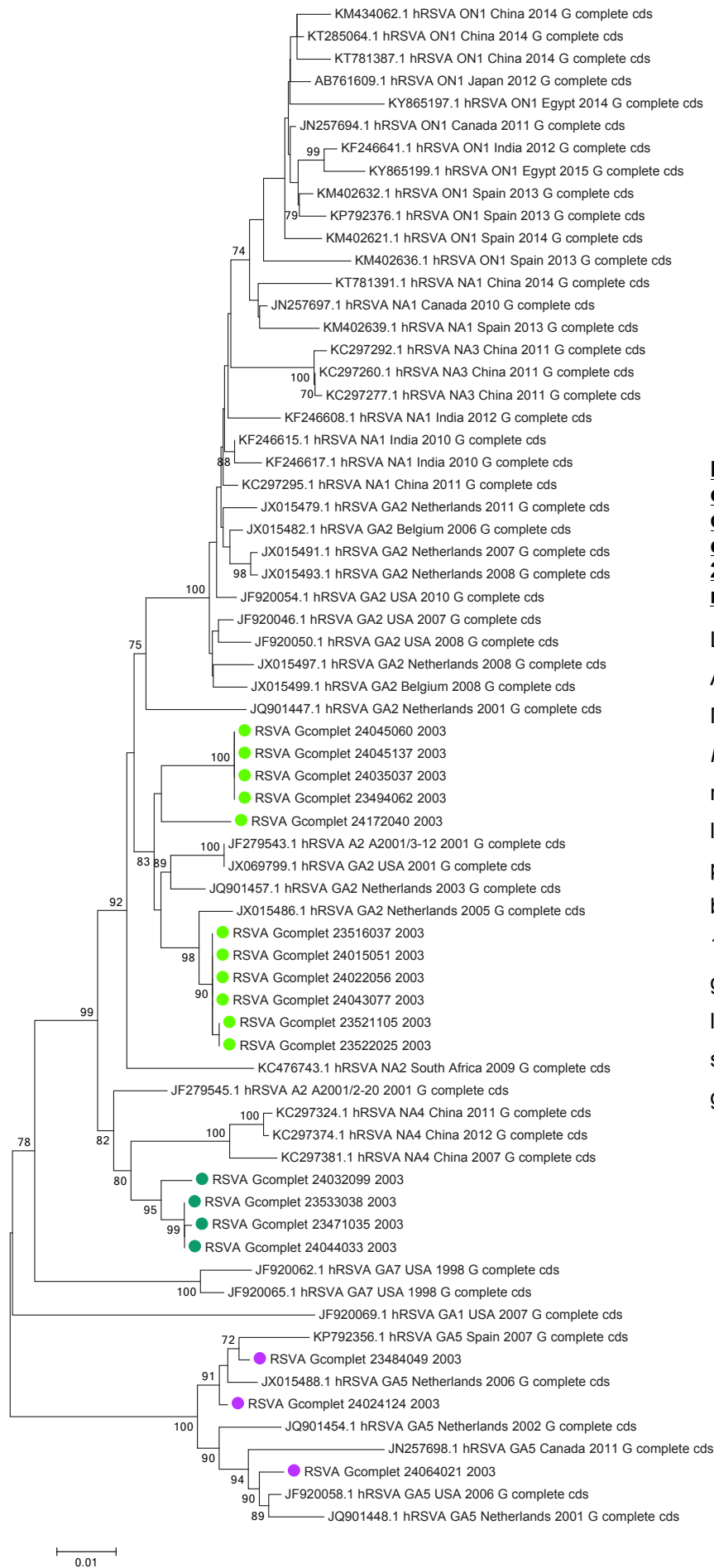


**Figure 20. Arbre phylogénétique construit à partir de 50 séquences de références**

Légende : ● GA1, ● GA2, ● GA5, ● GA7, ● NA1, ● NA2, ● NA3, ● NA4, ● ON1

Arbre construit à l'aide du logiciel MEGA® 6.0 en utilisant la méthode du *Neighbor-Joining* consolidé par 1000 répétitions (*bootstrap*) et en appliquant la correction de distance Kimura 2-parameter. Seules les valeurs de bootstrap >70 sont rapportées. La remise en cause des critères de définition des génotypes par Trento & al.<sup>98</sup> suggère que les génotypes GA2, NA1, NA2, NA3, NA4 et ON1 pourraient constituer un seul cluster, le génotype GA2.





**Figure 22. Arbre phylogénétique construit à partir des 18 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2003-2004 et des 50 séquences de référence**

Légende : ● GA2, ● GA5, ● NA4

Arbre construit à l'aide du logiciel MEGA® 6.0 en utilisant la méthode du *Neighbor-Joining* consolidé par 1000 répétitions (*bootstrap*) et en appliquant la correction de distance Kimura 2-parameter. Seules les valeurs de *bootstrap* >70 sont rapportées.

11 séquences sont dans le cluster du génotype GA2, 4 séquences sont dans le groupe du génotype NA4 et 3 séquences sont dans le cluster du génotype GA5.

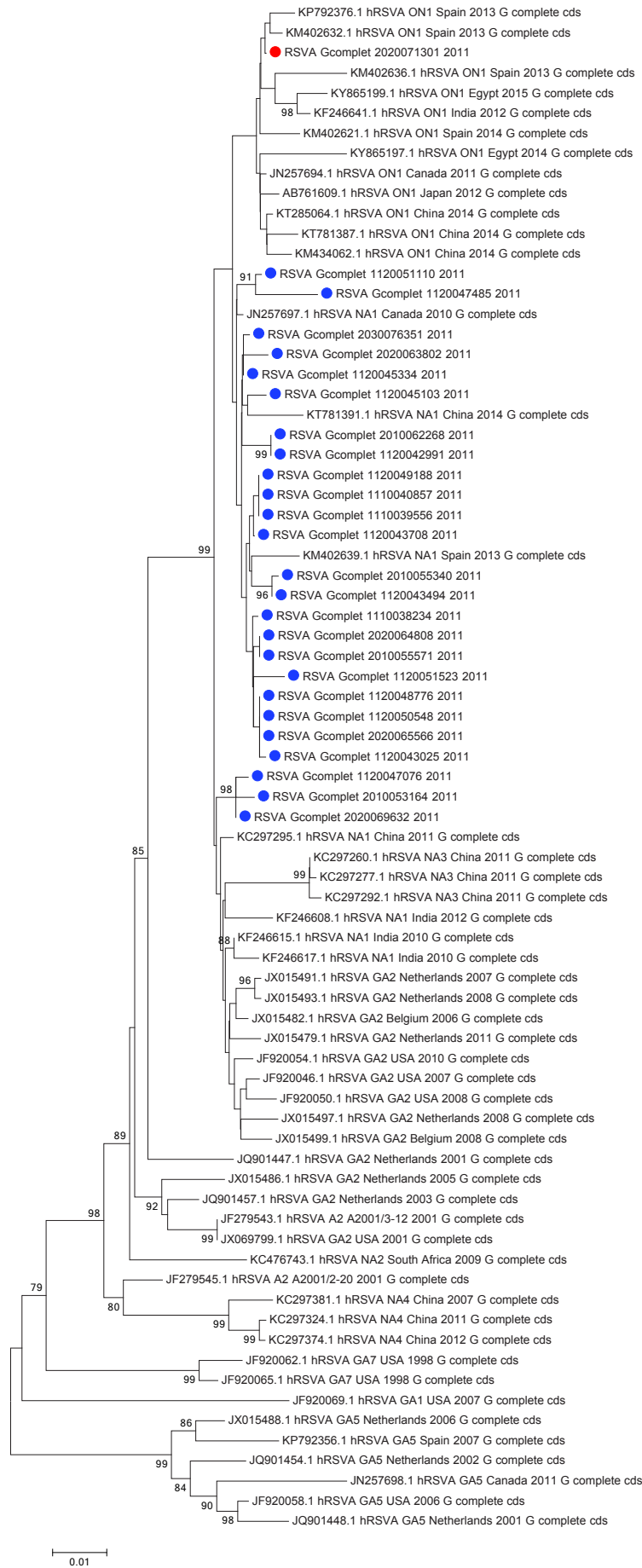
Toutes les souches séquencées se retrouvent dans un cluster de génotype déjà connu. Les génotypes circulants identifiés au cours de ces 15 saisons épidémiques sont GA2, GA5, NA1, NA2, NA3, NA4 et ON1. La distribution des génotypes en fonction des saisons épidémiques est résumée dans le **Tableau 6**.

**Tableau 6. Distribution des génotypes circulant en Normandie de l'hiver 2003 à 2017**

Saison épidémique	Nombre de séquences gène G complet	Génotypes						
		Nombre de GA2 (%)	Nombre de GA5 (%)	Nombre de NA1 (%)	Nombre de NA2 (%)	Nombre de NA3 (%)	Nombre de NA4 (%)	Nombre de ON1 (%)
2003/2004	18	11 (61,1)	3 (16,7)	-	-	-	4 (22,2)	-
2004/2005	17	13 (76,5)	4 (23,5)	-	-	-	-	-
2005/2006	9	2 (22,2)	7 (77,8)	-	-	-	-	-
2006/2007	11	11 (100,0)	-	-	-	-	-	-
2007/2008	19	14 (73,7)	5 (26,3)	-	-	-	-	-
2008/2009	10	4 (40,0)	-	2 (20,0)	1 (10,0)	2 (20,0)	1 (10,0)	-
2009/2010	8	4 (50,0)	1 (12,5)	3 (37,5)	-	-	-	-
2010/2011	4	-	-	4 (100,0)	-	-	-	-
2011/2012	26	-	-	25 (96,2)	-	-	-	1 (3,8)
2012/2013	9	1 (11,1)	-	2 (22,2)	-	-	-	6 (66,7)
2013/2014	45	-	-	3 (6,7)	-	-	-	42 (93,3)
2014/2015	30	-	-	-	-	-	-	30 (100,0)
2015/2016	31	-	-	-	-	-	-	31 (100,0)
2016/2017	32	-	-	-	-	-	-	32 (100,0)
2017/2018	28	-	-	-	-	-	-	28 (100,0)
<b>Total</b>	297	60	20	39	1	2	5	170

Le génotype GA5 a été mis en évidence sur des échantillons prélevés entre 2003 et 2009. Depuis 2009, il n'a plus été retrouvé à partir des échantillons étudiés. Le génotype GA2 était le génotype prédominant entre 2003 et 2007. Il a été isolé pour la dernière fois sur un échantillon de 2012. Le génotype NA1 a été retrouvé entre 2008 et 2013, il était le génotype prédominant pendant l'hiver 2011-2012. Les génotypes NA2, NA3 et NA4, ont été identifiés sur peu d'échantillons et n'ont plus été retrouvés depuis l'hiver 2008-2009. Le génotype ON1, qui contient une duplication de 72 Nt dans la région C-terminale du gène G, a été découvert au Canada pendant l'hiver 2010-2011 par Eshaghi & al.<sup>63</sup> Dans notre étude, il a été mis en évidence pour la première fois sur un échantillon prélevé pendant la saison 2011-2012 (voir **Figure 23**). Il est devenu le génotype prédominant dès la saison épidémique suivante et il représente 100% des génotypes identifiés depuis l'hiver 2014-2015.





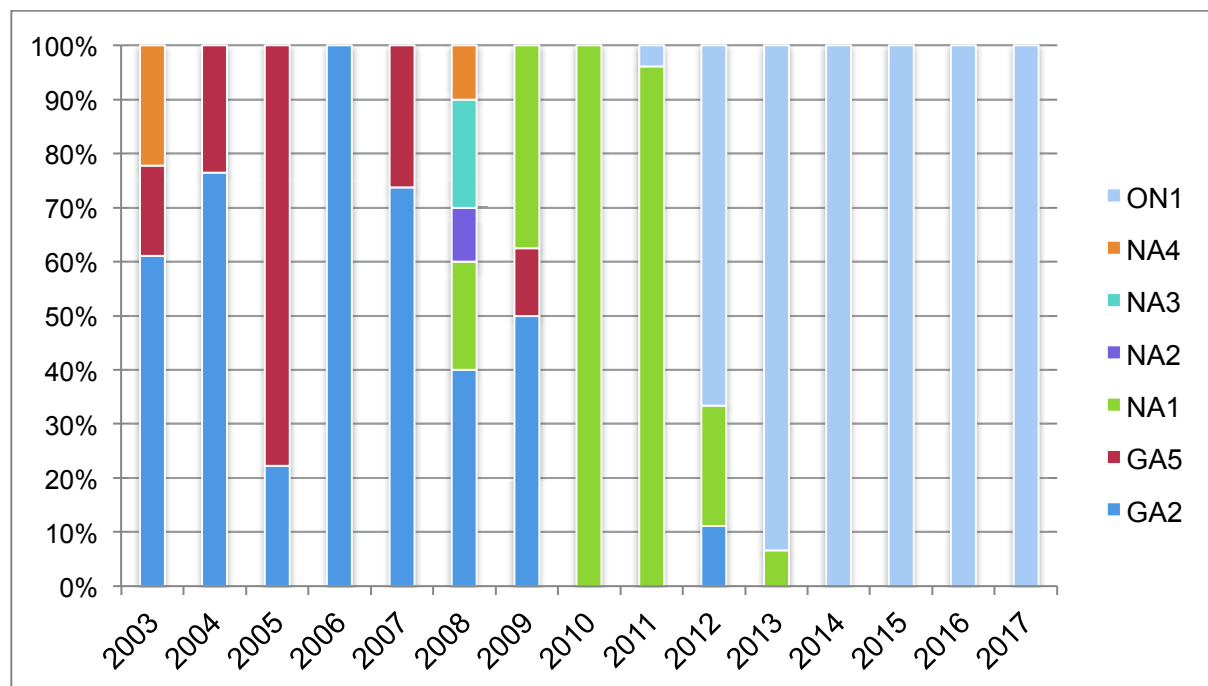
**Figure 23. Arbre phylogénétique construit à partir des 26 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2011-2012 et des 50 séquences de référence**

Légende : ● NA1, ● ON1

Arbre construit à l'aide du logiciel MEGA® 6.0 en utilisant la méthode de *Neighbor-Joining* consolidé par 1000 répétitions (*bootstrap*) et en appliquant la correction de distance Kimura 2-parameter. Seules les valeurs de *bootstrap* >70 sont rapportées.

25 séquences sont dans le cluster du génotype NA1. 1 séquence comportait la duplication de 72 nucléotides et est classée dans le groupe du génotype ON1.

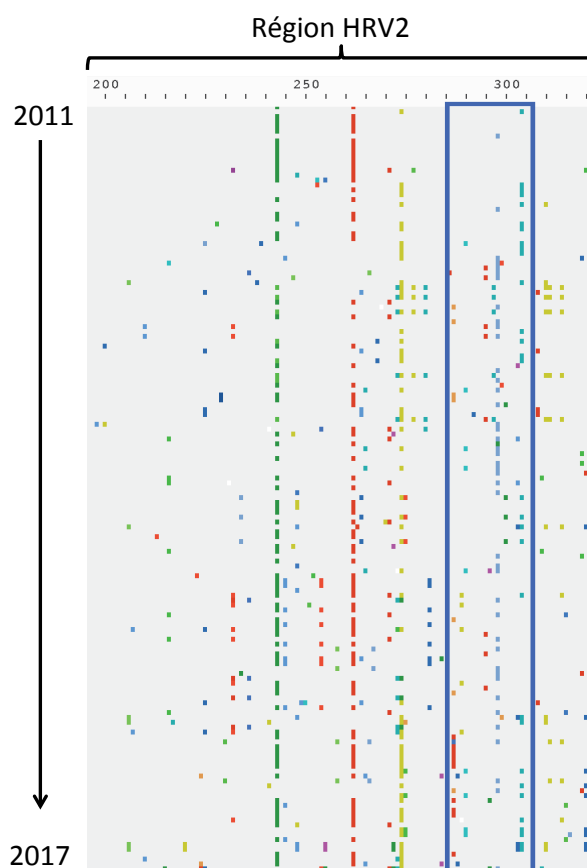
L'évolution des génotypes des HRSV-A circulant en Normandie au cours des 15 saisons épidémiques étudiées est représentée **Figure 24**.



**Figure 24. Evolution des génotypes de HRSV-A circulant en Normandie entre 2003 et 2017**

De 2003 à 2009, le génotype circulant prédominant était GA2, excepté en 2005, où GA5 était majoritaire. Les génotypes NA2, NA3 et NA4 ont été retrouvés de façon sporadique en 2003 et en 2008. Le génotype NA1 était majoritaire pendant les épidémies de 2010-2011 et 2011-2012. Le génotype ON1, identifié pour la première fois en 2011, est rapidement devenu prédominant et représente 100% des génotypes identifiés depuis 2014.

Depuis 2014, toutes les souches séquencées comprennent la duplication de 72 nucléotides, ce qui les classe toutes dans le génotype ON1. Néanmoins, la diversité intragénotypique au sein du génotype ON1 est grande et augmente au cours du temps. Le fragment dupliqué a en effet été soumis à une variabilité importante depuis son émergence, comme visualisé dans la **Figure 25**. Les mutations dans la duplication sont différentes de celles retrouvées dans la région dupliquée.



**Figure 25. Représentation de la variabilité en acides aminés au sein de la région HRV2 des souches ON1 isolées en Normandie de 2011 à 2017. Représentation réalisée avec le logiciel AliView.**

Les changements d'acides aminés par rapport à la souche ON1 identifiée en 2011 au Canada<sup>63</sup> sont représentés par des carrés de couleur. Le fragment correspondant à la duplication est encadré en bleu. On observe une augmentation du nombre de mutations entre 2011 et 2017 dans le fragment dupliqué, ainsi que dans toute la région HRV2.

Une analyse phylogénétique réalisée avec l'ensemble des HRSV-A inclus dans l'étude ainsi que les 50 séquences de références a permis l'identification d'une possible deuxième émergence, en 2014, du HRSV-A comprenant la duplication de 72 nucléotides (**Figure 26.**). Cette 2<sup>ème</sup> émergence doit être confirmée par d'autres analyses et pourrait être expliquée par un avantage apporté par cette duplication. Aucune caractéristique particulière n'a pu être identifiée à partir des renseignements cliniques. Ces 5 souches n'ont pas été isolées dans une période restreinte de temps ou à partir de patients avec un profil clinique semblable.



**Figure 26. Analyse phylogénétique réalisée par une méthode de maximum de vraisemblance « approchée » à l'aide du logiciel FastTree après alignement avec le logiciel AliView incluant les HRSV-A de l'étude et les 50 souches de références.**

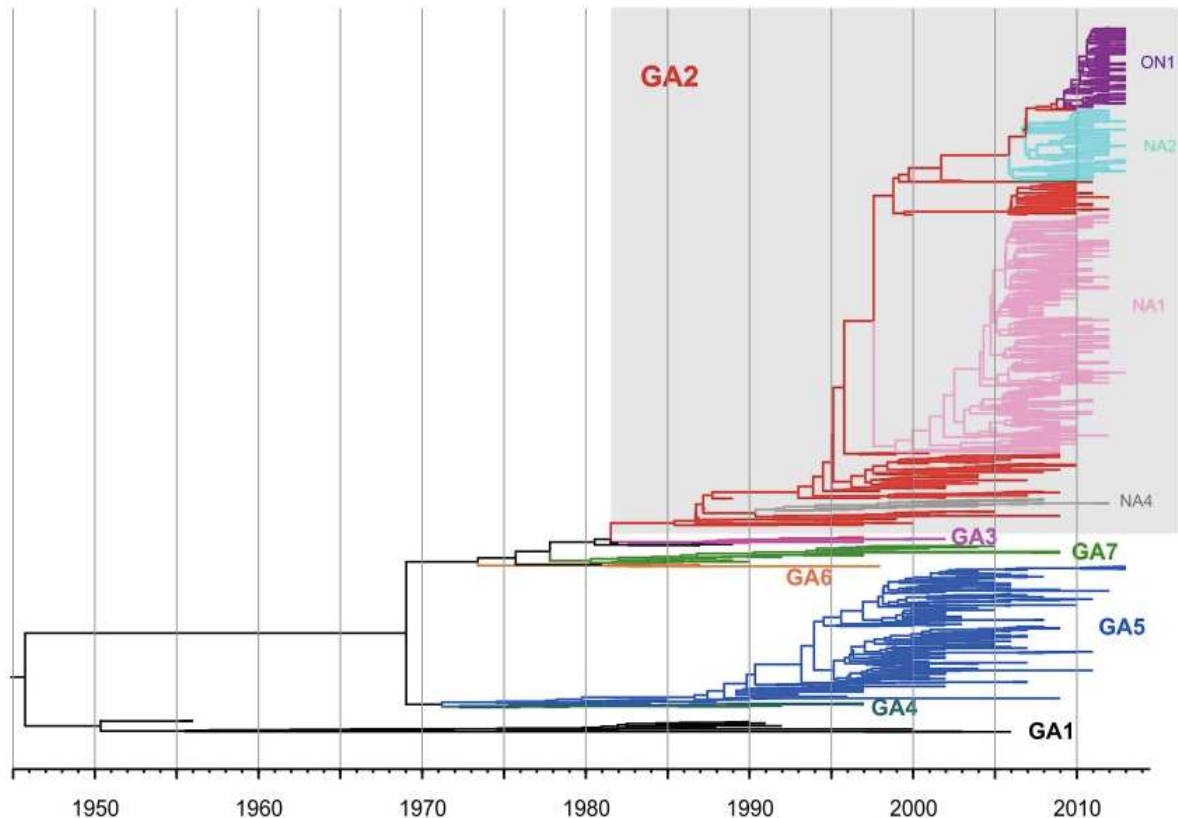
Les HRSV-A en couleurs incluent la duplication de 72 nucléotides. Les HRSV-A en noir n'ont pas de duplication dans la région HRV2. La visualisation de l'arbre a été faite à l'aide du logiciel FigTree. Un détail de la région d'intérêt permet de visualiser les 5 souches ayant probablement émergé en 2014.

### 5.3.2. État des lieux dans la littérature

Les études phylogéniques ayant conduit à la classification des HRSV-A en différents génotypes ont jusqu'à présent été réalisées à partir de la 2<sup>e</sup> région hypervariable (HRV2) du gène G, d'environ 270 nucléotides.

Le sous-groupe A du HRSV a été initialement divisé en 5 génotypes, GA1 à GA5, par Peret & al.<sup>57</sup> en 1998. Deux années plus tard, ce même auteur ajoutait 2 nouveaux génotypes : GA6 et GA7<sup>59</sup>. De nombreux autres génotypes ont été décrits depuis : SAA1 en 2001<sup>60</sup>, NA1 et NA2 en 2009<sup>61</sup>, ON1 en 2012<sup>63</sup>, NA3 et NA4 en 2013<sup>62</sup>. Les critères utilisés par ces auteurs pour définir un nouveau génotype étaient ceux proposés par Venter & al.<sup>60</sup> en 2001 : « lorsque des séquences sont classées dans le même cluster avec une valeur de bootstrap comprise entre 70 et 100% et une p-distance inférieure à 0,07 par rapport aux autres membres du même cluster phylogénétique ».

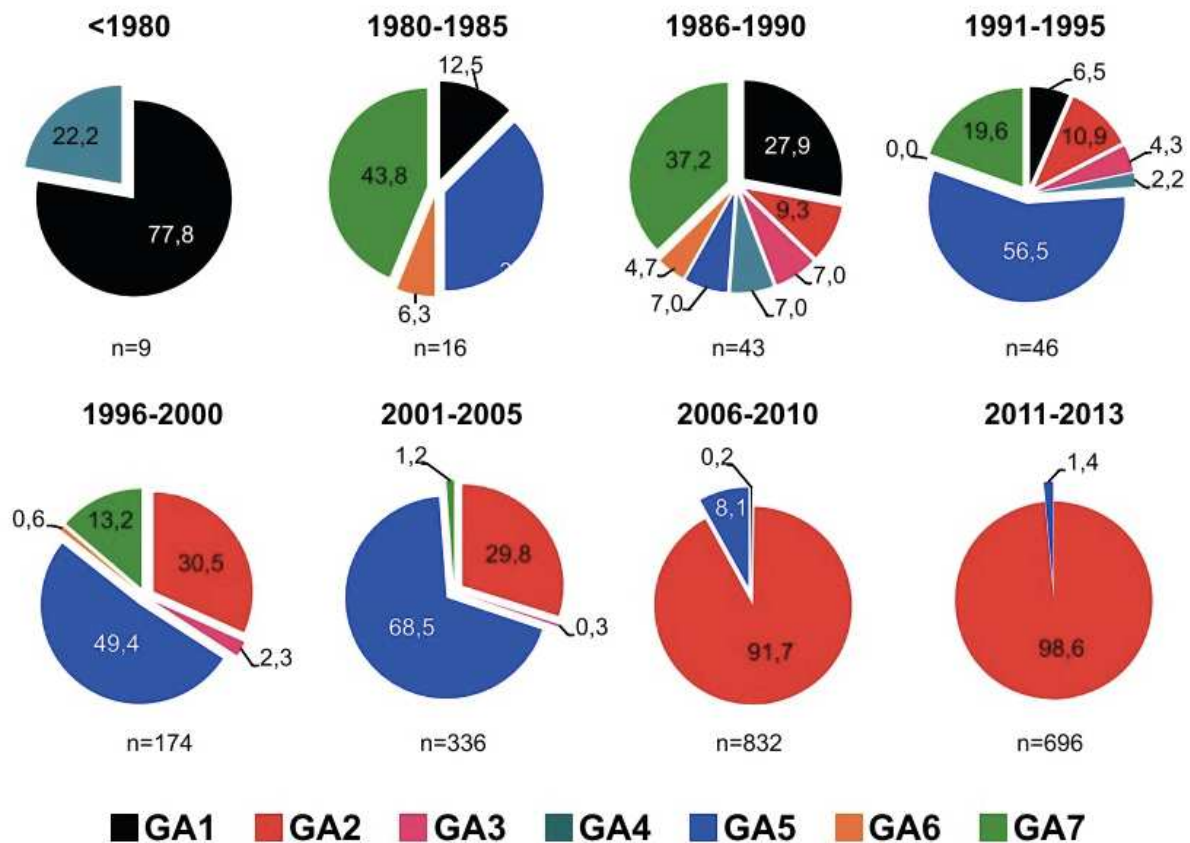
Cette méthode de classification est remise en cause par Trento & al.<sup>98</sup> dans une publication de 2015. Cet auteur propose une autre méthode basée sur la p-distance. La p-distance est la proportion d'acides aminés différents entre deux souches. Elle est calculée en divisant le nombre d'acides aminés qui diffèrent par rapport au nombre de sites comparés. L'auteur a défini la plus grande p-distance intragénotypique connue au sein du génotype GA1 qu'il considère comme une valeur seuil et qui est de 0,049. Lorsque la p-distance entre deux souches est inférieure à cette valeur seuil, il considère qu'elles appartiennent au même génotype. Ainsi, il conclut qu'il n'existe que 7 génotypes de HRSV-A, de GA1 à GA7 et que les autres génotypes décrits dans la littérature sont en fait des sous-types du génotype GA2. L'émergence des génotypes au cours du temps est illustré par la **Figure 27**. Il est estimé que l'ancêtre commun le plus récent des HRSV-A date des années 1940. Le génotype GA1 est inclus dans une des branches issues de la première séparation. Une deuxième séparation a eu lieu dans la fin des années 1960, donnant naissance aux génotypes GA4 et GA5. L'autre branche s'est séparée au cours du temps, en différents génotypes (GA2, GA3, GA6, GA7). La diversité intra-génotypique est très importante.



**Figure 27. Phylogénie des HRSV-A de 1940 à 2013, d'après Trento & al<sup>98</sup>**

On observe sur cet arbre les différents évènements ayant conduit à la création de nouveaux génotypes. Le plus ancien ancêtre commun des HRSV-A daterait des années 1940. On peut observer sur cette représentation que la diversité intra-génotypique est très élevée.

Dans cette même étude, l'auteur rapporte la proportion des différents génotypes de HRSV-A circulant des années 1950 à 2013. Les génotypes GA1 et GA4 sont les plus anciens génotypes rapportés et n'ont plus été mis en évidence depuis 1995. Les génotypes GA3, GA6 et GA7 ont été mis en évidence sur des échantillons collectés des années 1980 à 2005. Les génotypes circulants durant la période de notre étude sont GA5 et GA2 majoritairement. (voir **Figure 28.**)



**Figure 28. Distribution des génotypes circulants entre 1956 et 2013 d'après Trento & al.<sup>98</sup>**

Le nombre de séquences incluses dans chaque période est indiquée sous chaque secteur. Les génotypes GA1 et GA4 ont été mis en évidence sur des souches isolées avant les années 1980. Les autres génotypes sont apparus dans les années suivantes. Du début des années 1990 jusqu'en 2005, le génotype GA5 était majoritaire. Depuis 2011, on ne retrouve plus que les génotypes GA5 et GA2, ce dernier étant largement majoritaire.

### 5.3.3. Discussion

Les analyses phylogénétiques dans notre étude ont été réalisées par la construction d'arbres à partir de la séquence complète du gène G. Cette méthode de comparaison a été décrite comme étant plus discriminante que lors de l'utilisation de la séquence HRV2 uniquement<sup>90</sup>. Avec cette méthode, on peut observer sur l'arbre phylogénique construit à partir des séquences de référence que les génotypes NA1, NA2, NA3 et NA4 ne constituent pas des clusters et qu'ils s'intègrent dans le groupe du génotype GA2. (Figure 20.)

Les résultats obtenus dans notre étude sont similaires à ceux décrits dans la littérature<sup>62,94,96,99-101</sup>. Le génotype GA5 a circulé dans la région jusqu'en 2009, et n'a

plus été identifié depuis. Le génotype GA2 est le génotype majoritaire circulant en Normandie depuis 2003, si on considère que les groupes NA1, NA2, NA3, NA4 et ON1 sont des sous-types de GA2, comme suggéré par Trento & al<sup>98</sup>. Le sous-type ON1 qui comporte une insertion de 72 nucléotides en région C-terminale est aujourd'hui le virus circulant en Normandie. Il constitue 100% des souches séquencées dans notre étude depuis 2014. C'est également le cas dans de nombreuses régions du monde entier<sup>64,95,102</sup>. Ce nouveau sous-type a été décrit comme étant issu du sous-type NA1<sup>103</sup> ou du génotype GA2<sup>98</sup> selon les auteurs. Depuis son émergence, il a déjà évolué en différents sous-groupes par l'accumulation de nouvelles mutations, y compris dans le fragment dupliqué. Certains auteurs parlent même d'un nouveau génotype ON2, dérivé d'ON1<sup>104</sup>, sur la base d'une étude phylogénique réalisée à partir de la région hypervariable C-terminale du gène G.

Le génotype ON1 est devenu le génotype prédominant dans une très courte période de temps. L'insertion de 72 nucléotides a permis l'émergence et le remplacement de tous les autres génotypes. Un événement similaire a eu lieu dans le sous-groupe des HRSV-B au début des années 2000 : un nouveau génotype BA avait émergé avec une insertion de 60 Nt. D'après Hotard & al<sup>105</sup>, les souches contenant l'insertion de 60 Nt auraient une plus forte capacité d'attachement à la cellule hôte augmentée, de part la présence de sites de O-glycosylation supplémentaires. De nombreux génotypes en ont dérivé (BA1 à BA13) et sont aujourd'hui prédominants parmi les HRSV-B. On peut penser que l'évolution sera semblable dans le groupe des HRSV-A.



## **6. Conclusion**

Le virus respiratoire syncytial est un agent responsable d'infections respiratoires basses aiguës entraînant des millions d'hospitalisations chaque année dans le monde entier. Le développement de traitements curatifs et préventifs est donc très attendu et important pour diminuer le nombre d'infections et améliorer la prise en charge des patients atteints.

Les études d'épidémiologie moléculaires sont indispensables pour comprendre l'évolution génétique des HRSV et définir les stratégies de développement de traitements.

La variabilité de ces virus est importante. Basé essentiellement sur l'analyse d'un fragment de 270 nucléotides, HRV2, plusieurs génotypes sont décrits. Néanmoins, cette classification est controversée.

Notre étude est la première en France basée sur la séquence du gène G complet. Elle a été réalisée sur 15 saisons épidémiques, ce qui nous a permis d'observer l'évolution des différents génotypes au cours du temps avec la disparition du génotype GA5 et l'évolution du génotype GA2 vers le sous-type ON1 comprenant l'insertion de 72 nucléotides.

Ce travail montre aussi la disparité des analyses phylogénétiques dans la littérature et met en évidence la nécessité d'avoir des recommandations plus strictes pour la définition de nouveaux génotypes et la classification des HRSV.

Les séquences obtenues sont soumises à la base de données GenBank. Ces données épidémiologiques moléculaires permettront une meilleure compréhension de l'évolution des génotypes et de la circulation globale des HRSV.

## Bibliographie

- 1 Shi T, McAllister DA, O'Brien KL, *et al.* Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet* 2017; **390**: 946–58.
- 2 Ann R. Falsey, M.D., Patricia A. Hennessey, R.N., Maria A. Formica, M.S., Christopher Cox, Ph.D., and Edward E. Walsh MD. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. 2005 <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa043951> (accessed Aug 31, 2018).
- 3 Griffiths C, Drews SJ, Marchant DJ. Respiratory syncytial virus: Infection, detection, and new options for prevention and treatment. *Clin Microbiol Rev* 2017; **30**: 277–319.
- 4 Morris JA, Blount RE, Savage RE. Recovery of Cytopathogenic Agent from Chimpanzees with Coryza. *Exp Biol Med* 1956; **92**: 544–9.
- 5 Chanock R, Roizman B, Myers R. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA): Isolation, properties and characterization. *Am J Epidemiol* 1957; **66**: 281–90.
- 6 Freymuth F. Virus syncytial respiratoire et virus para-influenza humains: Épidémiologie. *EMC - Pédiatr.* 2004; **1**: 2–11.
- 7 Freymuth F. Virus respiratoire syncytial et virus para-influenza : diagnostic virologique. *J Med Virol* 2004; **1**: 12–7.
- 8 GBD 2015 LRI Collaborators C, Forouzanfar M, Rao PC, *et al.* Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory tract infections in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Infect Dis* 2017; **17**: 1133–61.
- 9 Payne S. Introduction to RNA Viruses. *Viruses.* 2017; : 97–105.
- 10 Rima B, Collins P, Easton A, *et al.* ICTV virus taxonomy profile: Pneumoviridae. *J Gen Virol* 2017; **98**: 2912–3.
- 11 Payne S. Families Paramyxoviridae and Pneumoviridae. *Viruses.* 2017; : 173–81.
- 12 Collins PL, Karron RA. Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus. In: *Fields Virology.* 2013: 1086–123.
- 13 Liljeroos L, Krzyzaniak MA, Helenius A, Butcher SJ. Architecture of respiratory

- syncytial virus revealed by electron cryotomography. *PNAS* 2013; **110**: 11133–8.
- 14 Pangesti KNA, Abd El Ghany M, Walsh MG, Kesson AM, Hill-Cawthorne GA. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol* 2018; : e1968.
- 15 Collins PL, Graham BS. Viral and Host Factors in Human Respiratory Syncytial Virus Pathogenesis. *J Virol* 2008; **82**: 2040–55.
- 16 Bakker SE, Duquerroy S, Galloux M, *et al.* The respiratory syncytial virus nucleoprotein-RNA complex forms a left-handed helical nucleocapsid. *J Gen Virol* 2013; **94**: 1734–8.
- 17 McLellan JS, Ray WC, Peeples ME. Structure and function of respiratory syncytial virus surface glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013; **372**: 83–104.
- 18 Melero JA, Mas V, Mclellan JS. Structural, antigenic and immunogenic features of respiratory syncytial virus glycoproteins relevant for vaccine development. *Vaccine* 2017; **35**: 461–8.
- 19 Collins PL, Melero JA. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: Still crazy after all these years. *Virus Res.* 2011; **162**: 80–99.
- 20 Respiratory syncytial virus (ID 5145) - Genome - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=respiratory+syncytial+virus> (accessed Oct 3, 2018).
- 21 Escribano-Romero E, Rawling J, García-Barreno B, Melero JA. The soluble form of human respiratory syncytial virus attachment protein differs from the membrane-bound form in its oligomeric state but is still capable of binding to cell surface proteoglycans. *J Virol* 2004; **78**: 3524–32.
- 22 Hendricks DA, McIntosh K, Patterson JL. Further characterization of the soluble form of the G glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J Virol* 1988; **62**: 2228–33.
- 23 Bukreyev A, Yang L, Collins PL. The Secreted G Protein of Human Respiratory Syncytial Virus Antagonizes Antibody-Mediated Restriction of Replication Involving Macrophages and Complement. *J Virol* 2012; **86**: 10880–4.
- 24 Bukreyev A, Yang L, Fricke J, *et al.* The Secreted Form of Respiratory Syncytial Virus G Glycoprotein Helps the Virus Evade Antibody-Mediated Restriction of Replication by Acting as an Antigen Decoy and through Effects

- on Fc Receptor-Bearing Leukocytes. *J Virol* 2008; **82**: 12191–204.
- 25 Hallak LK, Kwilas SA, Peeples ME. Interaction between respiratory syncytial virus and glycosaminoglycans, including heparan sulfate. *Methods Mol Biol* 2007; **379**: 15–34.
- 26 Collins PL, Fearn R, Graham BS. Respiratory syncytial virus: Virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013; **372**: 3–38.
- 27 Tripp RA, Jones LP, Haynes LM, Zheng HQ, Murphy PM, Anderson LJ. CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Nat Immunol* 2001; **2**: 732–8.
- 28 Collins PL, Mottet G. Membrane orientation and oligomerization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 1993; **74**: 1445–50.
- 29 Gan S-W, Tan E, Lin X, *et al.* The small hydrophobic protein of the human respiratory syncytial virus forms pentameric ion channels. *J Biol Chem* 2012; **287**: 24671–89.
- 30 Carter SD, Dent KC, Atkins E, *et al.* Direct visualization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus reveals the structural basis for membrane permeability. *FEBS Lett* 2010; **584**: 2786–90.
- 31 Teng MN, Collins PL. Identification of the respiratory syncytial virus proteins required for formation and passage of helper-dependent infectious particles. *J Virol* 1998; **72**: 5707–16.
- 32 Henderson G, Murray J, Yeo RP. Sorting of the Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein into Detergent-Resistant Structures Is Dependent on Cell-Surface Expression of the Glycoproteins. *Virology* 2002; **300**: 244–54.
- 33 Ghildyal R, Mills J, Murray M, Vardaxis N, Meanger J. Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells. *J Gen Virol* 2002; **83**: 753–7.
- 34 Evans JE, Cane PA, Pringle CR. Expression and characterisation of the NS1 and NS2 proteins of respiratory syncytial virus. *Virus Res* 1996; **43**: 155–61.
- 35 Swedan S, Andrews J, Majumdar T, Musiyenko A, Barik S. Multiple functional domains and complexes of the two nonstructural proteins of human respiratory syncytial virus contribute to interferon suppression and cellular location. *J Virol* 2011; **85**: 10090–100.

- 36 Spann KM, Tran K-C, Chi B, Rabin RL, Collins PL. Suppression of the Induction of Alpha, Beta, and Gamma Interferons by the NS1 and NS2 Proteins of Human Respiratory Syncytial Virus in Human Epithelial Cells and Macrophages. *J Virol* 2004; **78**: 4363–9.
- 37 Ramaswamy M, Shi L, Monick MM, Hunninghake GW, Look DC. Specific inhibition of type I interferon signal transduction by respiratory syncytial virus. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; **30**: 893–900.
- 38 Bitko V, Shulyayeva O, Mazumder B, *et al.* Nonstructural Proteins of Respiratory Syncytial Virus Suppress Premature Apoptosis by an NF- $\kappa$ B-Dependent, Interferon-Independent Mechanism and Facilitate Virus Growth. *J Virol* 2006; **81**: 1786–95.
- 39 Tawar RG, Duquerroy S, Vonrhein C, *et al.* Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. *Science* 2009; **326**: 1279–83.
- 40 Galloux M, Tarus B, Blazevic I, Fix J, Duquerroy S, Eléouët J-F. Characterization of a viral phosphoprotein binding site on the surface of the respiratory syncytial nucleoprotein. *J Virol* 2012; **86**: 8375–87.
- 41 Liuzzi M, Mason SW, Cartier M, *et al.* Inhibitors of Respiratory Syncytial Virus Replication Target Cotranscriptional mRNA Guanylylation by Viral RNA-Dependent RNA Polymerase. *J Virol* 2005; **79**: 13105–15.
- 42 Asenjo A, Villanueva N. Regulated but not constitutive human respiratory syncytial virus (HRSV) P protein phosphorylation is essential for oligomerization. *FEBS Lett* 2000; **467**: 279–84.
- 43 Llorente MT, García-Barreno B, Calero M, *et al.* Structural analysis of the human respiratory syncytial virus phosphoprotein: characterization of an  $\alpha$ -helical domain involved in oligomerization. *J Gen Virol* 2006; **87**: 159–69.
- 44 Sourimant J, Rameix-Welti M-A, Gaillard A-L, *et al.* Fine mapping and characterization of the L-polymerase-binding domain of the respiratory syncytial virus phosphoprotein. *J Virol* 2015; **89**: 4421–33.
- 45 Castagne N, Barbier A, Bernard J, *et al.* Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus P-P and P-N protein complexes and localization of the P protein oligomerization domain. *J Gen Virol* 2004; **85**: 1643–53.
- 46 Hardy RW, Wertz GW. The Cys(3)-His(1) motif of the respiratory syncytial virus M2-1 protein is essential for protein function. *J Virol* 2000; **74**: 5880–5.

- 47 Buchholz UJ, Finke S, Conzelmann KK, *et al.* Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol* 1999; **73**: 251–9.
- 48 Collins PL, Hill MG, Cristina J, Grosfeld H. Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 81–5.
- 49 Collins PL, Hill MG, Camargo E, Grosfeld H, Chanock RM, Murphy BR. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 11563–7.
- 50 Bermingham A, Collins PL. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 11259–64.
- 51 Schildgen V, van den Hoogen B, Fouchier R, *et al.* Human metapneumovirus: Lessons learned over the first decade. *Clin. Microbiol. Rev.* 2011; **24**: 734–54.
- 52 Ghildyal R, Ho A, Jans DA. Central role of the respiratory syncytial virus matrix protein in infection. *FEMS Microbiol. Rev.* 2006; **30**: 692–705.
- 53 Brock SC, Goldenring JR, Crowe JE. Apical recycling systems regulate directional budding of respiratory syncytial virus from polarized epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**: 15143–8.
- 54 Coates HV, Alling DW, Chanock RM. An Antigenic Analysis of Respiratory Syncytial Virus Isolates by a Plaque Reduction Neutralization Test. *Am J Epidemiol* 1966; **83**: 299–313.
- 55 Anderson LJ, Hierholzer JC, Tsou C, *et al.* Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 1985; **151**: 626–33.
- 56 Zlateva KT, Lemey P, Moës E, Vandamme A-M, Ranst M Van. Genetic Variability and Molecular Evolution of the Human Respiratory Syncytial Virus Subgroup B Attachment G Protein. *J Virol* 2005; **79**: 9157–67.
- 57 Peret TCT, Hall CB, Schnabel KC, Golub JA, Anderson LJ. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus

- in a community. *J Gen Virol* 1998; **79**: 2221–9.
- 58 Zlateva KT, Lemey P, Vandamme A-M, Ranst M Van. Molecular Evolution and Circulation Patterns of Human Respiratory Syncytial Virus Subgroup A: Positively Selected Sites in the Attachment G Glycoprotein. *J Virol* 2004; **78**: 4675–83.
- 59 Peret TCT, Hall CB, Hammond GW, *et al.* Circulation Patterns of Group A and B Human Respiratory Syncytial Virus Genotypes in 5 Communities in North America. *J Infect Dis* 2000; **181**: 1891–6.
- 60 Venter M, Madhi SA, Tiemessen CT, Schoub BD. Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: Identification of new subgroup A and B genotypes. *J Gen Virol* 2001; **82**: 2117–24.
- 61 Shobugawa Y, Saito R, Sano Y, *et al.* Emerging genotypes of human respiratory syncytial virus subgroup A among patients in Japan. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 2475–82.
- 62 Cui G, Zhu R, Qian Y, *et al.* Genetic variation in attachment glycoprotein genes of human respiratory syncytial virus subgroups a and B in children in recent five consecutive years. *PLoS One* 2013; **8**: e75020.
- 63 Eshaghi AR, Duvvuri VR, Lai R, *et al.* Genetic variability of human respiratory syncytial virus a strains circulating in Ontario: A novel genotype with a 72 nucleotide G gene duplication. *PLoS One* 2012; **7**: e32807.
- 64 Bayrakdar F, Kocabas CN, Altas AB, *et al.* Genetic variability human respiratory syncytial virus subgroups A and B in Turkey during six successive epidemic seasons, 2009-2015. *J Med Virol* 2018; **90**: 456–63.
- 65 Meissner HC. Respiratory Syncytial Virus, Fifth Edit. Elsevier Inc., 2018 DOI:10.1016/B978-0-323-40181-4.00225-5.
- 66 Freymuth F. Virus respiratoire syncytial et virus para-influenza humains : clinique Human Respiratory Syncytial Virus and Parainfluenza Virus : clinical aspects. 2004; **1**: 18–27.
- 67 Florin TA, Plint AC, Zorc JJ. Viral bronchiolitis. *Lancet*. 2017; **389**: 211–24.
- 68 Openshaw PJ, Tregoning JS. Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection. *Clin Microbiol Rev* 2005; **18**: 541–55.
- 69 Thompson TM, Roddam PL, Harrison LM, Aitken JA, DeVincenzo JP. Viral

- Specific Factors Contribute to Clinical Respiratory Syncytial Virus Disease Severity Differences in Infants. *Clin Microbiol (Los Angeles, Calif)* 2015; **4**. DOI:10.4172/2327-5073.1000206.
- 70 M.-A. RAMEIX-WELTI EG. Le virus respiratoire syncytial (VRS): état actuel des connaissances. *Feuill Biol* 2017; **N° 335**. <https://www.laboratoires-maymat.fr/contenu/fck/VRS.pdf>.
- 71 Bont L, Checchia PA, Fauroux B, *et al.* Defining the Epidemiology and Burden of Severe Respiratory Syncytial Virus Infection Among Infants and Children in Western Countries. *Infect. Dis. Ther.* 2016; **5**: 271–98.
- 72 Thorburn K, Harigopal S, Reddy V, Taylor N, Van Saene HKF. High incidence of pulmonary bacterial co-infection in children with severe respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis. *Thorax* 2006; **61**: 611–5.
- 73 Dutau G. Complications de la bronchiolite LA BRONCHIOLITE : VIROSE ET MALADIE INFLAMMATOIRE ? 2001 DOI:[https://doi.org/10.1016/S0929-693X\(01\)80158-5](https://doi.org/10.1016/S0929-693X(01)80158-5).
- 74 Troeger C, Blacker B, Khalil IA, *et al.* Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis* 2018; published online Sept. DOI:10.1016/S1473-3099(18)30310-4.
- 75 Simoes EAF, DeVincenzo JP, Boeckh M, *et al.* Challenges and Opportunities in Developing Respiratory Syncytial Virus Therapeutics. *J Infect Dis* 2015; **211**: S1–20.
- 76 Kestler M, Muñoz P, Mateos M, Adrados D, Bouza E. Respiratory syncytial virus burden among adults during flu season: an underestimated pathology. *J. Hosp. Infect.* 2018; published online March 31. DOI:10.1016/j.jhin.2018.03.034.
- 77 Cane PA. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol* 2001; **11**: 103–16.
- 78 Junge S, Nokes DJ, Simões EAF, Weber MW. Respiratory Syncytial Virus. *Int Encycl Public Heal* 2016; **6**: 337–46.
- 79 Mazur NI, Martinon-Torres F, Baraldi E, *et al.* Lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus: Current management and new therapeutics. *Lancet Respir. Med.* 2015; **3**: 888–900.
- 80 Simões EAF, Bont L, Manzoni P, *et al.* Past, Present and Future Approaches

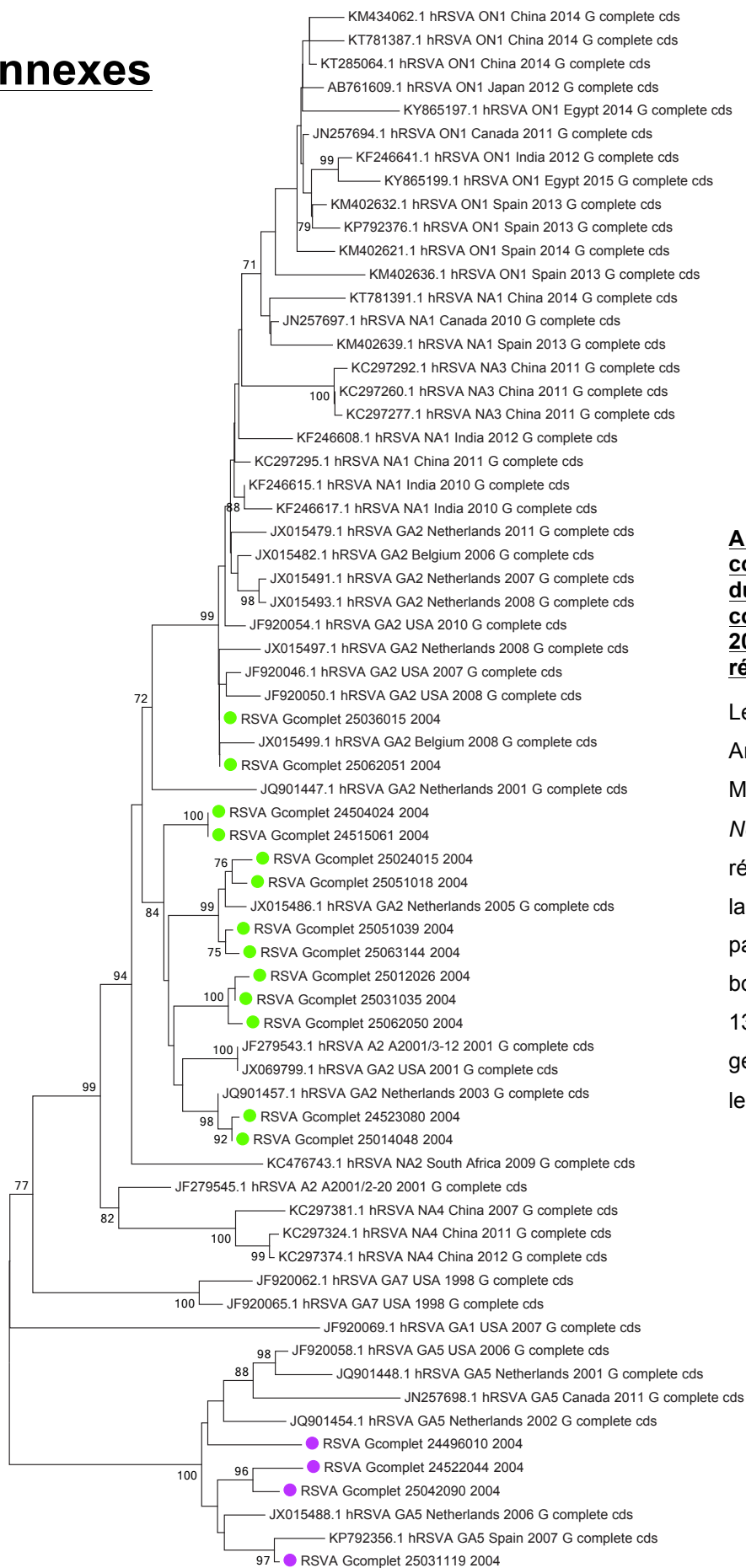


- to the Prevention and Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection in Children. *Infect Dis Ther* 2018; **7**: 87–120.
- 81 Douglas JL, Panis ML, Ho E, *et al.* Small molecules VP-14637 and JNJ-2408068 inhibit respiratory syncytial virus fusion by similar mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 2460–6.
- 82 Heylen E, Neyts J, Jochmans D. Drug candidates and model systems in respiratory syncytial virus antiviral drug discovery. *Biochem. Pharmacol.* 2017; **127**: 1–12.
- 83 Noton SL, Nagendra K, Dunn EF, Mawhorter ME, Yu Q, Fearn R. Respiratory Syncytial Virus Inhibitor AZ-27 Differentially Inhibits Different Polymerase Activities at the Promoter. *J Virol* 2015; **89**: 7786–98.
- 84 Anderson LJ. Respiratory syncytial virus vaccine development. *Semin. Immunol.* 2013; **25**: 160–71.
- 85 Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, *et al.* Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol* 1969; **89**: 422–34.
- 86 Delgado MF, Coviello S, Monsalvo AC, *et al.* Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease. *Nat Med* 2009; **15**: 34–41.
- 87 Freymuth F. Infections à virus respiratoire syncytial et virus para-influenza: Prévention et traitement. *EMC - Pédiatr.* 2004; **1**: 28–32.
- 88 Collins PL. New Generation Live Vaccines against Human Respiratory Syncytial Virus Designed by Reverse Genetics. *Proc Am Thorac Soc* 2005; **2**: 166–73.
- 89 Glenn GM, Smith G, Fries L, *et al.* Safety and immunogenicity of a Sf9 insect cell-derived respiratory syncytial virus fusion protein nanoparticle vaccine. *Vaccine* 2013; **31**: 524–32.
- 90 Bose ME, He J, Shrivastava S, *et al.* Sequencing and Analysis of Globally Obtained Human Respiratory Syncytial Virus A and B Genomes. *PLoS One* 2015; **10**: e0120098.
- 91 Human respiratory syncytial virus isolate RSV607, complete genome - Nucleotide - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JX015491.1> (accessed Oct 19, 2018).
- 92 Östlund MR, Lindell AT, Stenler S, Riedel HM, Wirgart BZ, Grillner L. Molecular

- epidemiology and genetic variability of respiratory syncytial virus (RSV) in Stockholm, 2002–2003. *J Med Virol* 2008; **80**: 159–67.
- 93 Broberg EK, Waris M, Johansen K, Snacken R, Penttinen P, European Influenza Surveillance Network EIS. Seasonality and geographical spread of respiratory syncytial virus epidemics in 15 European countries, 2010 to 2016. *Euro Surveill* 2018; **23**. DOI:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.5.17-00284.
- 94 Rebuffo-Scheer C, Bose M, He J, *et al.* Whole genome sequencing and evolutionary analysis of human respiratory syncytial virus A and B from Milwaukee, WI 1998-2010. *PLoS One* 2011; **6**: e25468.
- 95 Gimferrer L, Campins M, Codina MG, *et al.* Molecular epidemiology and molecular characterization of respiratory syncytial viruses at a tertiary care university hospital in Catalonia (Spain) during the 2013-2014 season. *J Clin Virol* 2015; **66**: 27–32.
- 96 Choudhary ML, Anand SP, Wadhwa BS, Chadha MS. Genetic variability of human respiratory syncytial virus in Pune, Western India. *Infect Genet Evol* 2013; **20**: 369–77.
- 97 Tan L, Lemey P, Houspie L, Viveen MC, Jansen NJG. Genetic Variability among Complete Human Respiratory Syncytial Virus Subgroup A Genomes: Bridging Molecular Evolutionary Dynamics and Epidemiology. *PLoS One* 2012; **7**: 51439.
- 98 Trento A, Ábrego L, Rodriguez-Fernandez R, *et al.* Conservation of G-Protein Epitopes in Respiratory Syncytial Virus (Group A) Despite Broad Genetic Diversity: Is Antibody Selection Involved in Virus Evolution? *J Virol* 2015; **89**: 7776–85.
- 99 Pretorius MA, van Niekerk S, Tempia S, *et al.* Replacement and Positive Evolution of Subtype A and B Respiratory Syncytial Virus G-Protein Genotypes From 1997–2012 in South Africa. *J Infect Dis* 2013; **208**: S227–37.
- 100 Houspie L, Lemey P, Keyaerts E, *et al.* Circulation of HRSV in Belgium: From Multiple Genotype Circulation to Prolonged Circulation of Predominant Genotypes. *PLoS One* 2013; **8**. DOI:10.1371/journal.pone.0060416.
- 101 Viegas M, Goya S, Mistchenko AS. Sixteen years of evolution of human respiratory syncytial virus subgroup A in Buenos Aires, Argentina: GA2 the prevalent genotype through the years. *Infect Genet Evol* 2016; **43**: 213–21.
- 102 Tsukagoshi H, Yokoi H, Kobayashi M, *et al.* Genetic analysis of attachment

- glycoprotein ( G ) gene in new genotype ON1 of human respiratory syncytial virus detected in Japan. *Microbiol Immunol* 2013; **57**: n/a-n/a.
- 103 Yoshihara K, Le MN, Nagasawa K, *et al.* Molecular evolution of respiratory syncytial virus subgroup A genotype NA1 and ON1 attachment glycoprotein (G) gene in central Vietnam. *Infect Genet Evol* 2016; **45**: 437–46.
- 104 Hirano E, Kobayashi M, Tsukagoshi H, *et al.* Molecular evolution of human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein (G) gene of new genotype ON1 and ancestor NA1. *Infect Genet Evol* 2014; **28**: 183–91.
- 105 Hotard AL, Laikhter E, Brooks K, Hartert T V, Moore ML. Functional Analysis of the 60-Nucleotide Duplication in the Respiratory Syncytial Virus Buenos Aires Strain Attachment Glycoprotein. *J Virol* 2015; **89**: 8258–66.

# Annexes

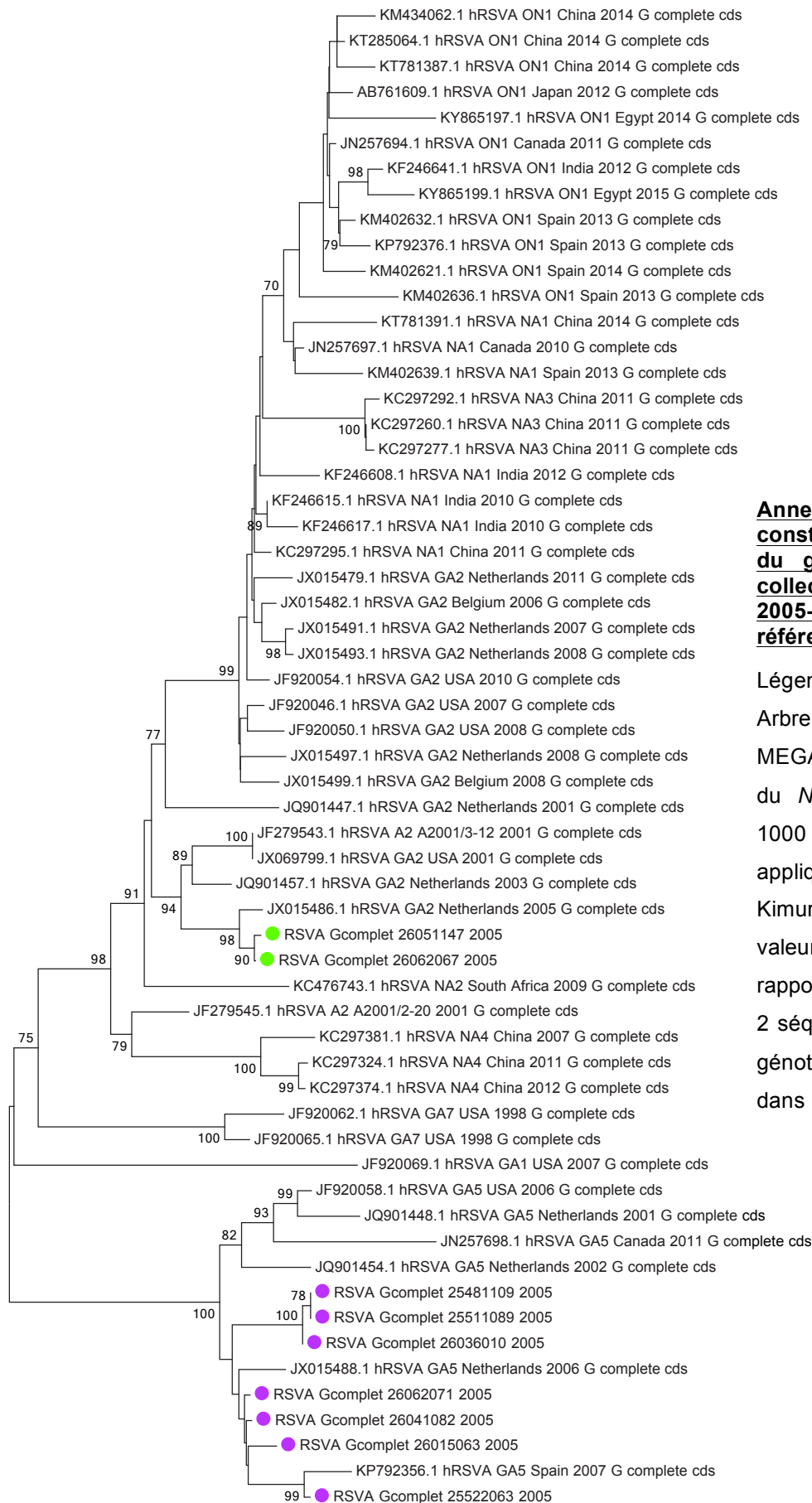


**Annexe 1. Arbre phylogénétique construit à partir des 17 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2004-2005 et des 50 séquences de référence**

Légende : ● GA2, ● GA5

Arbre construit à l'aide du logiciel MEGA® 6.0 en utilisant la méthode du *Neighbor-Joining* consolidé par 100 répétitions (*bootstrap*) et en appliquant la correction de distance Kimura 2-parameter. Seules les valeurs de *bootstrap* >70 sont rapportées.

13 séquences sont dans le cluster du génotype GA2, 4 séquences sont dans le groupe du génotypes GA5.

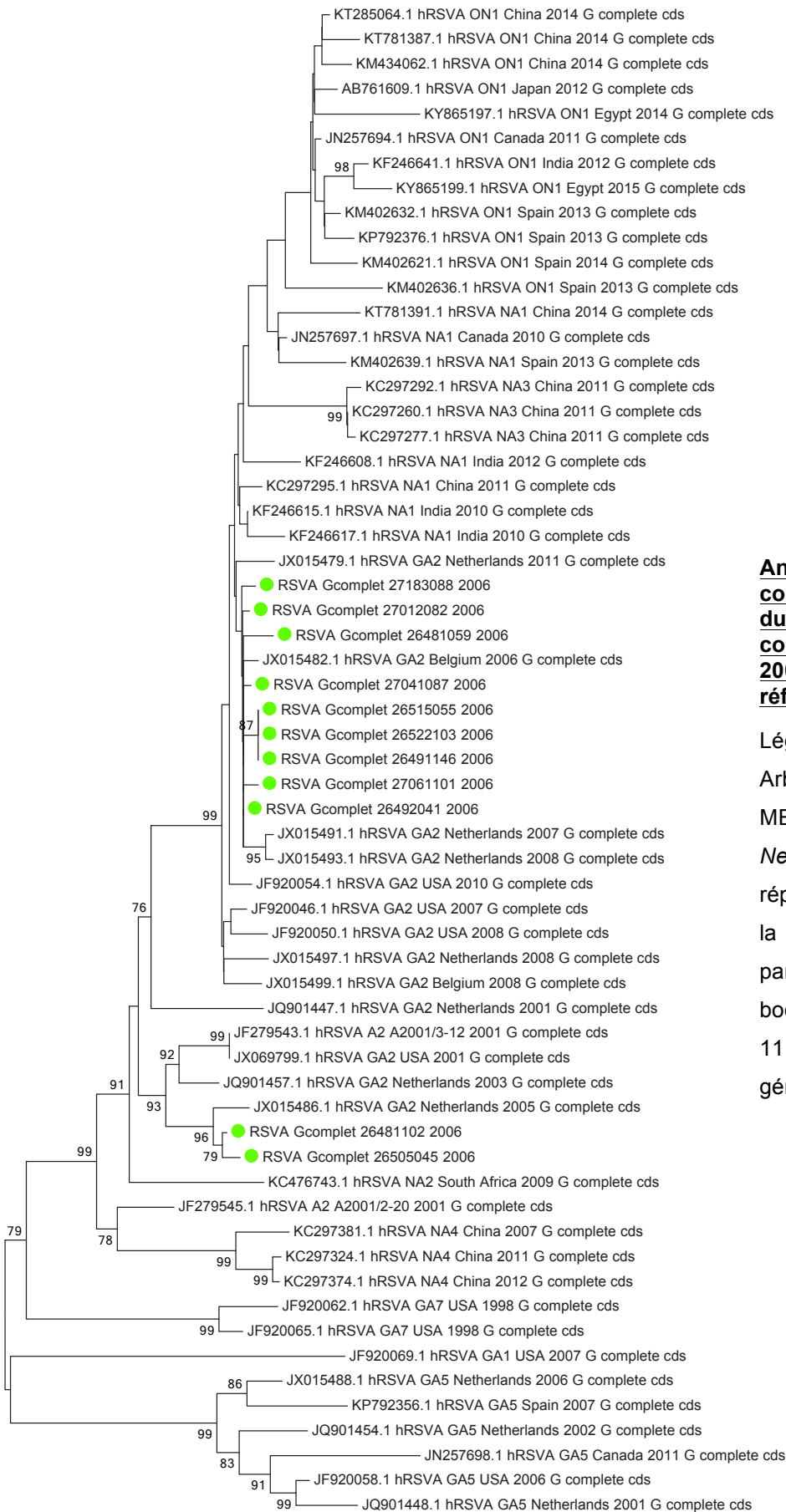


**Annexe 2. Arbre phylogénétique construit à partir des 9 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2005-2006 et des 50 séquences de référence**

Légende : ● GA2, ● GA5

Arbre construit à l'aide du logiciel MEGA® 6.0 en utilisant la méthode du *Neighbor-Joining* consolidé par 1000 répétitions (*bootstrap*) et en appliquant la correction de distance Kimura 2-parameter. Seules les valeurs de *bootstrap* >70 sont rapportées.

2 séquences sont dans le cluster du génotype GA2, 7 séquences sont dans le groupe du génotype GA5.



**Annexe 3. Arbre phylogénétique construit à partir des 11 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2006-2007 et des 50 séquences de référence**

Légende : ● GA2

Arbre construit à l'aide du logiciel MEGA® 6.0 en utilisant la méthode du *Neighbor-Joining* consolidé par 1000 répétitions (*bootstrap*) et en appliquant la correction de distance Kimura 2-parameter. Seules les valeurs de *bootstrap* >70 sont rapportées.

11 séquences sont dans le cluster du génotype GA2.

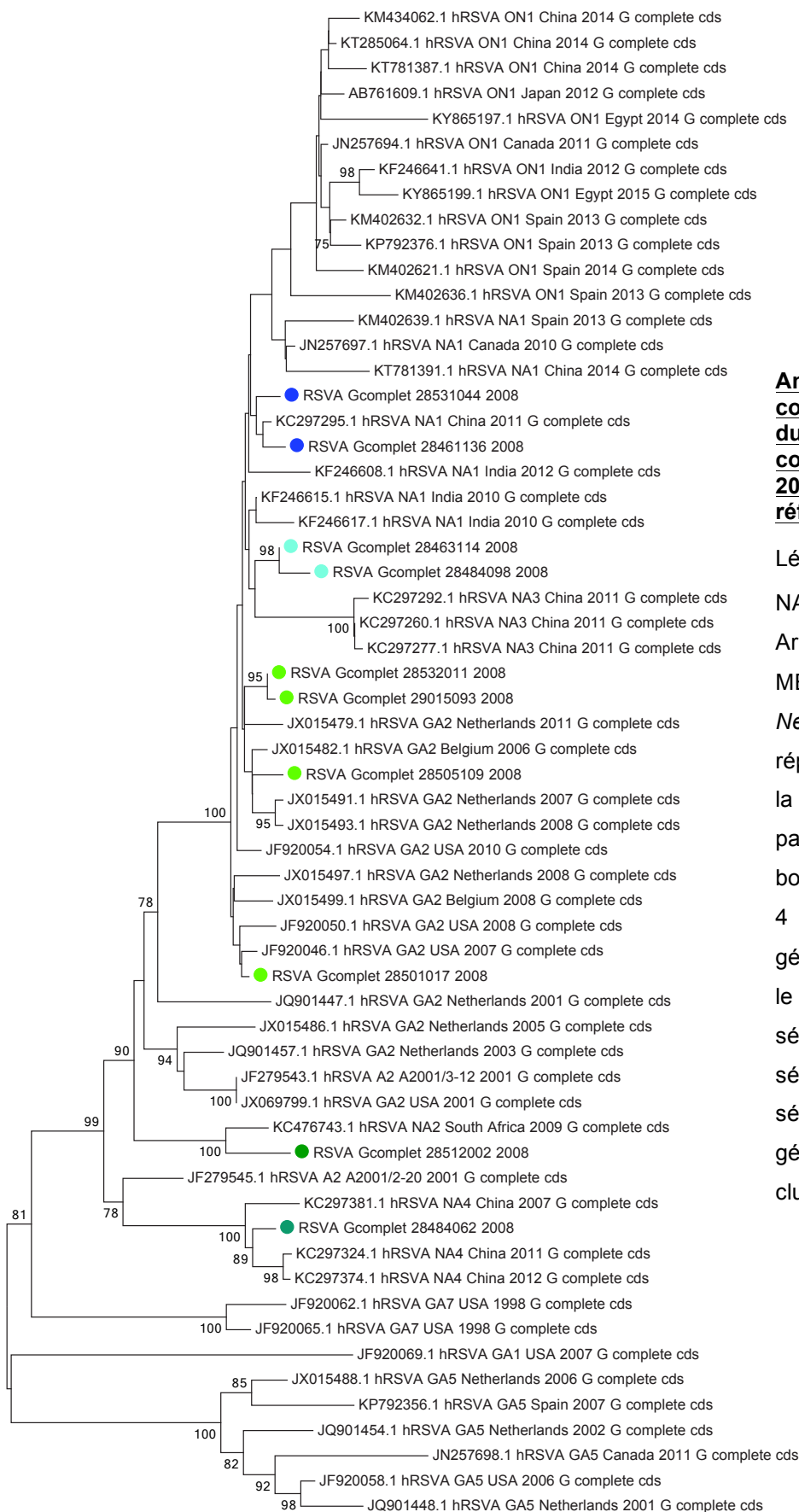


**Annexe 4. Arbre phylogénétique construit à partir des 19 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2007-2008 et des 50 séquences de référence**

Légende : ● GA2, ● GA5

Arbre construit à l'aide du logiciel MEGA® 6.0 en utilisant la méthode du *Neighbor-Joining* consolidé par 100 répétitions (*bootstrap*) et en appliquant la correction de distance Kimura 2-parameter. Seules les valeurs de bootstrap >70 sont rapportées.

14 séquences sont dans le cluster du génotype GA2, 5 séquences sont dans le groupe du génotype GA5



**Annexe 5. Arbre phylogénétique construit à partir des 10 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2008-2009 et des 50 séquences de référence**

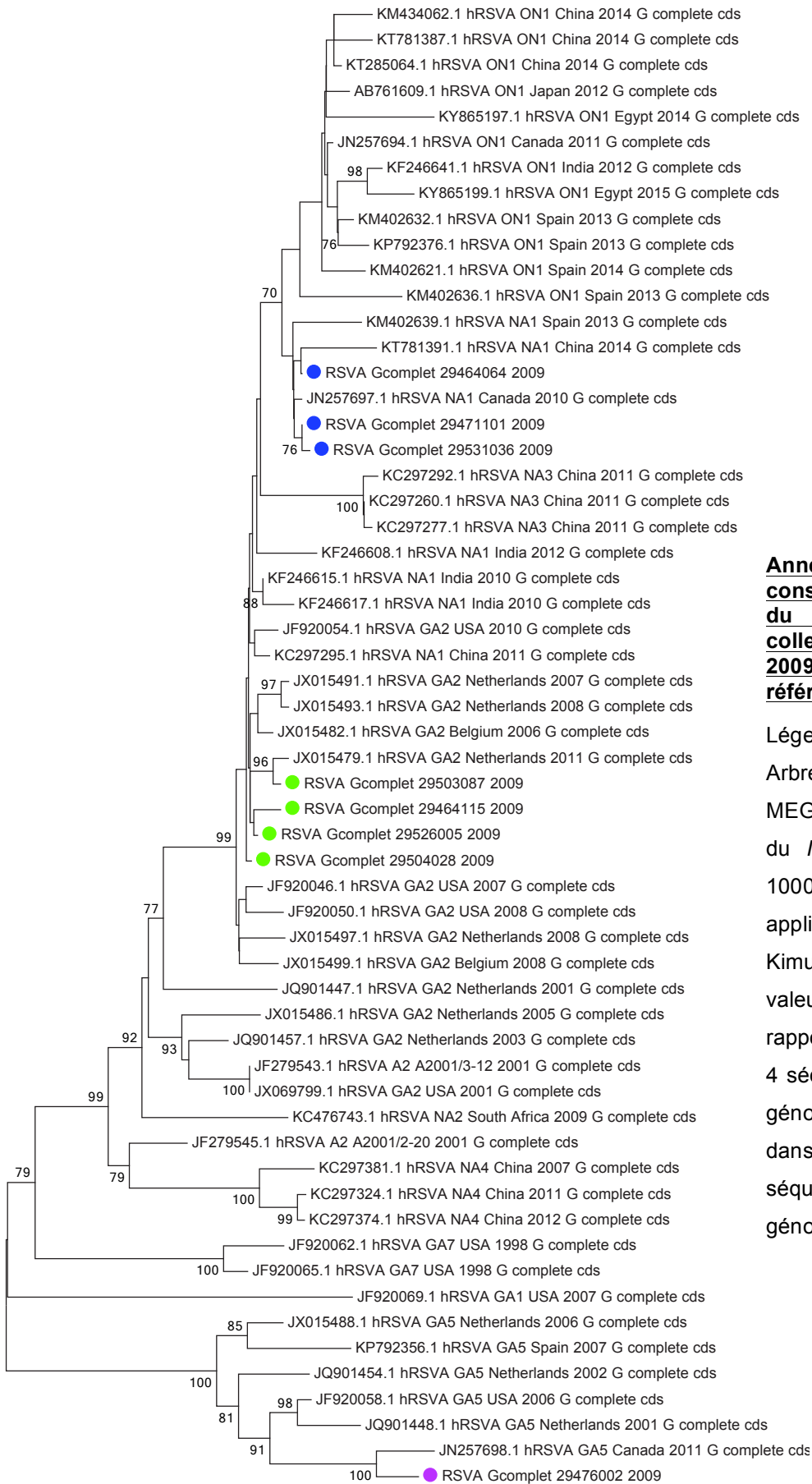
Légende : ● GA2, ● NA1, ● NA2, ● NA3, ● NA4

Arbre construit à l'aide du logiciel MEGA® 6.0 en utilisant la méthode du *Neighbor-Joining* consolidé par 1000 répétitions (*bootstrap*) et en appliquant la correction de distance Kimura 2-parameter. Seules les valeurs de bootstrap >70 sont rapportées.

4 séquences sont dans le cluster du génotype GA2, 2 séquences sont dans le groupe du génotype NA1, 1 séquence forme un groupe avec la séquence de référence NA2, 2 séquences sont dans le groupe du génotype NA3, 1 séquence est dans le cluster du génotype NA4.

0.01





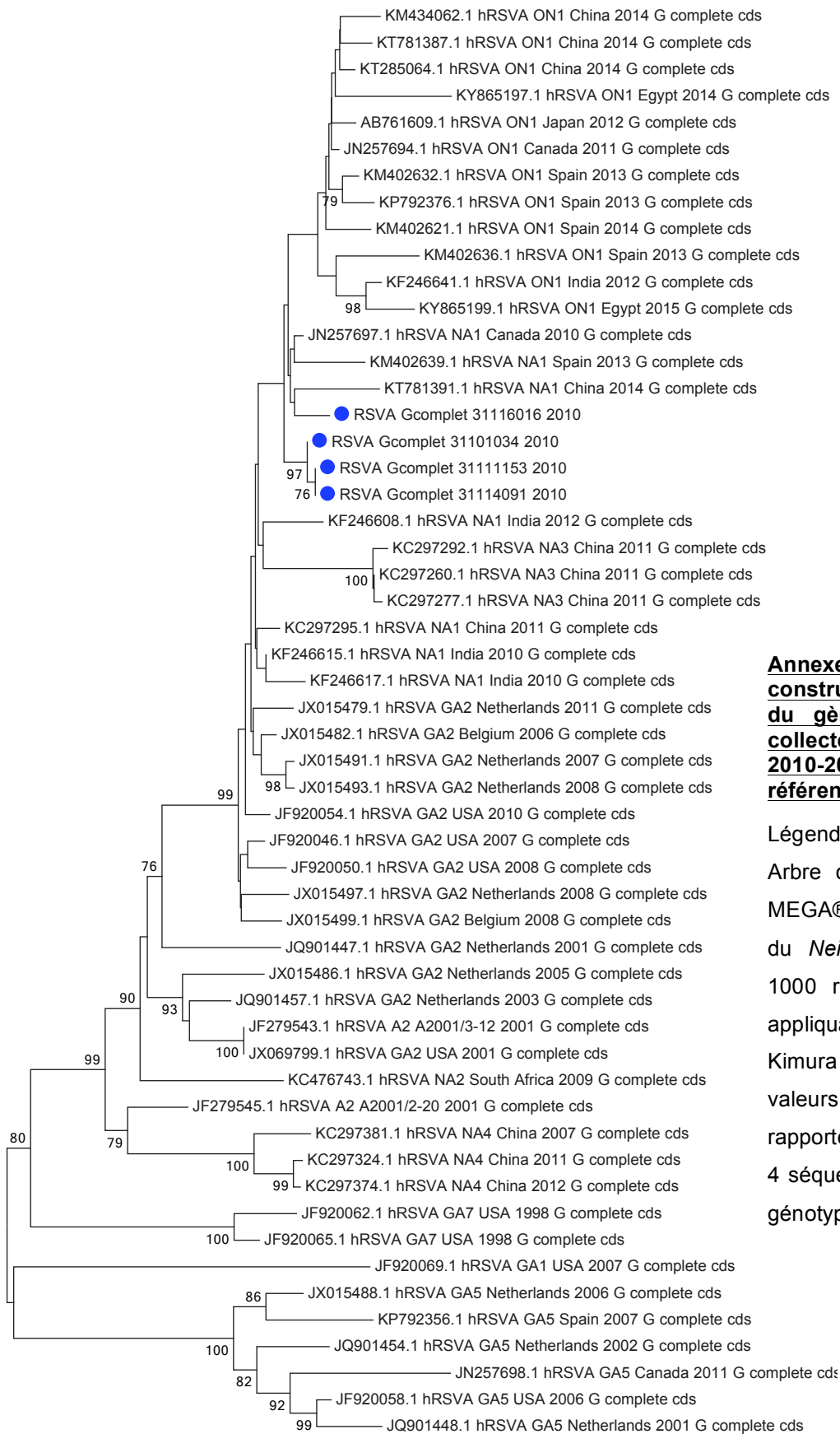
**Annexe 6. Arbre phylogénétique construit à partir des 8 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2009-2010 et des 50 séquences de référence**

Légende : ● GA2, ● NA1, ● GA5

Arbre construit à l'aide du logiciel MEGA® 6.0 en utilisant la méthode du *Neighbor-Joining* consolidé par 1000 répétitions (*bootstrap*) et en appliquant la correction de distance Kimura 2-parameter. Seules les valeurs de *bootstrap* >70 sont rapportées.

4 séquences sont dans le cluster du génotype GA2, 3 séquences sont dans le groupe du génotype NA1, 1 séquence est dans le cluster du génotype GA5.

0.01

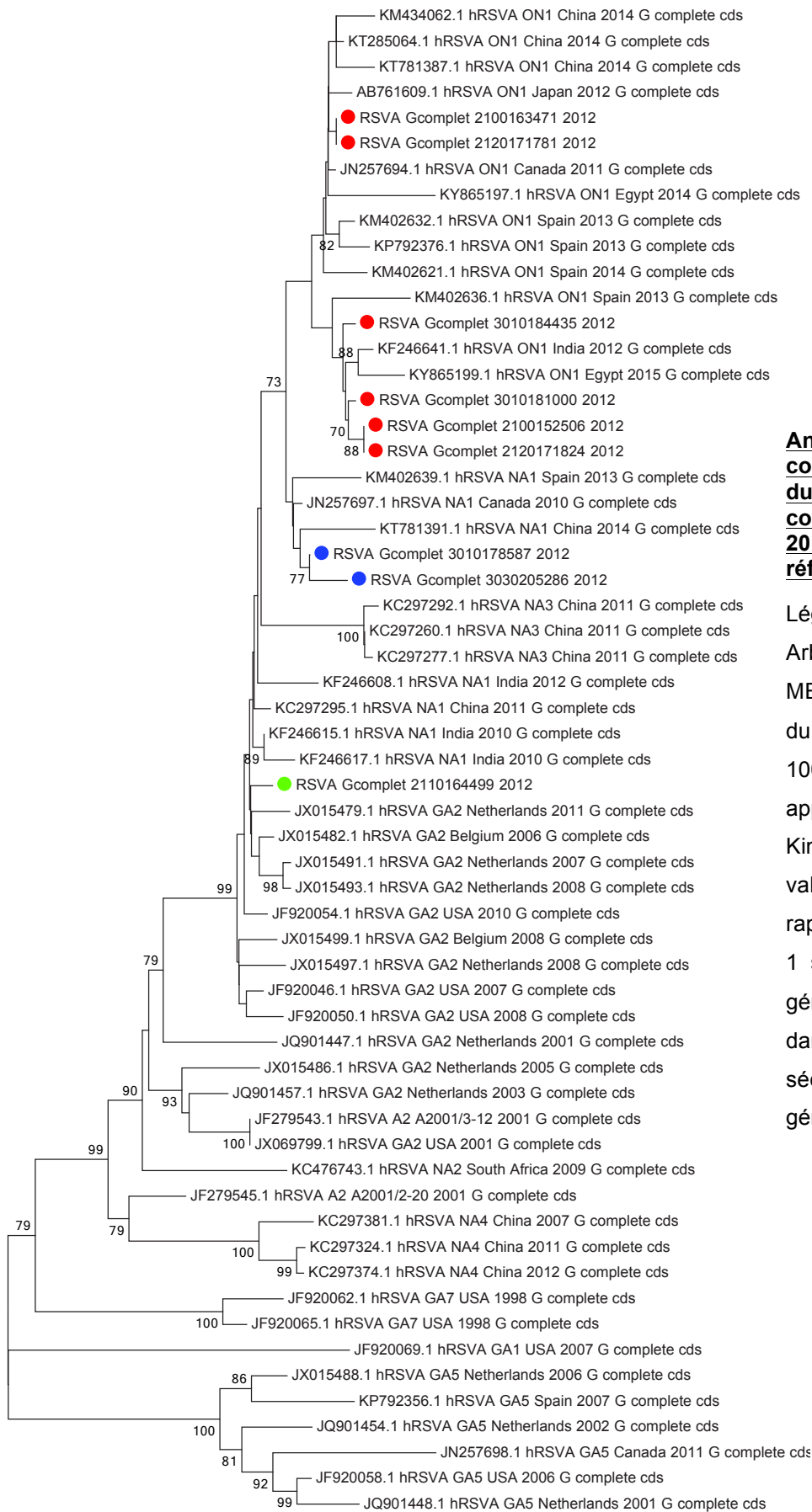


**Annexe 7. Arbre phylogénétique construit à partir des 4 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2010-2011 et des 50 séquences de référence**

Légende : ● NA1

Arbre construit à l'aide du logiciel MEGA® 6.0 en utilisant la méthode du *Neighbor-Joining* consolidé par 1000 répétitions (*bootstrap*) et en appliquant la correction de distance Kimura 2-parameter. Seules les valeurs de *bootstrap* >70 sont rapportées.

4 séquences sont dans le cluster du génotype NA1.

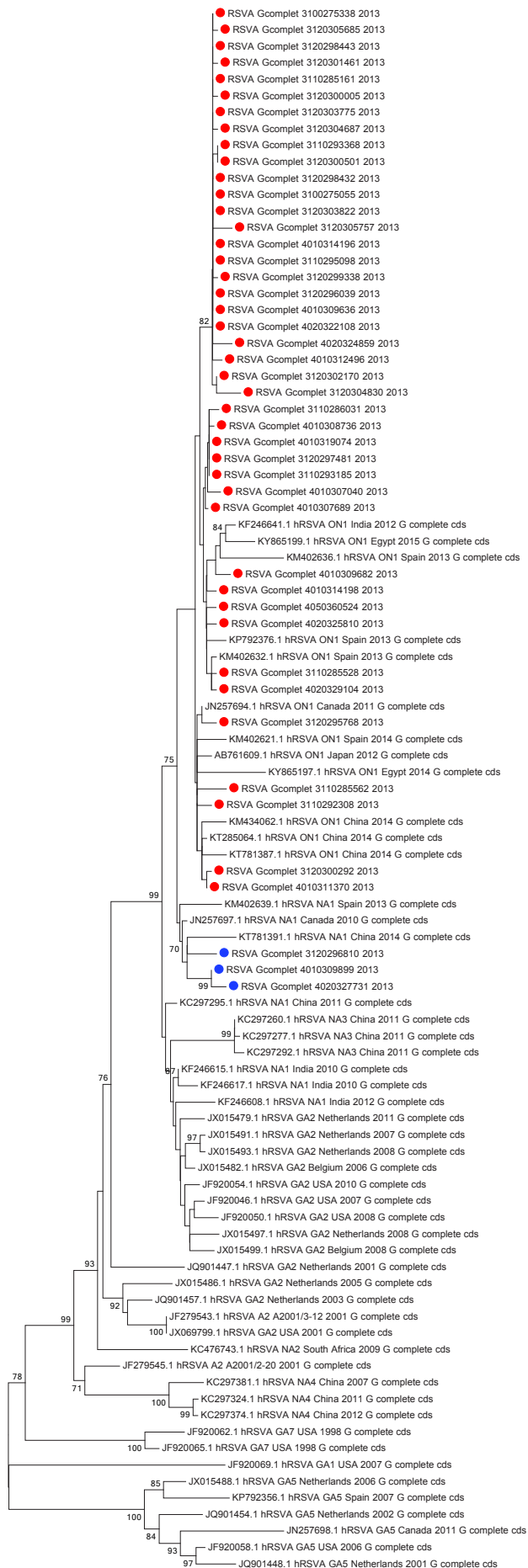


**Annexe 8. Arbre phylogénétique construit à partir des 9 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2012-2013 et des 50 séquences de référence**

Légende : ● GA2, ● NA1, ● ON1

Arbre construit à l'aide du logiciel MEGA® 6.0 en utilisant la méthode du *Neighbor-Joining* consolidé par 1000 répétitions (*bootstrap*) et en appliquant la correction de distance Kimura 2-parameter. Seules les valeurs de *bootstrap* >70 sont rapportées.

1 séquence est dans le cluster du génotype GA2, 2 séquences sont dans le groupe du génotype NA1, 6 séquences sont dans le cluster du génotype ON1.

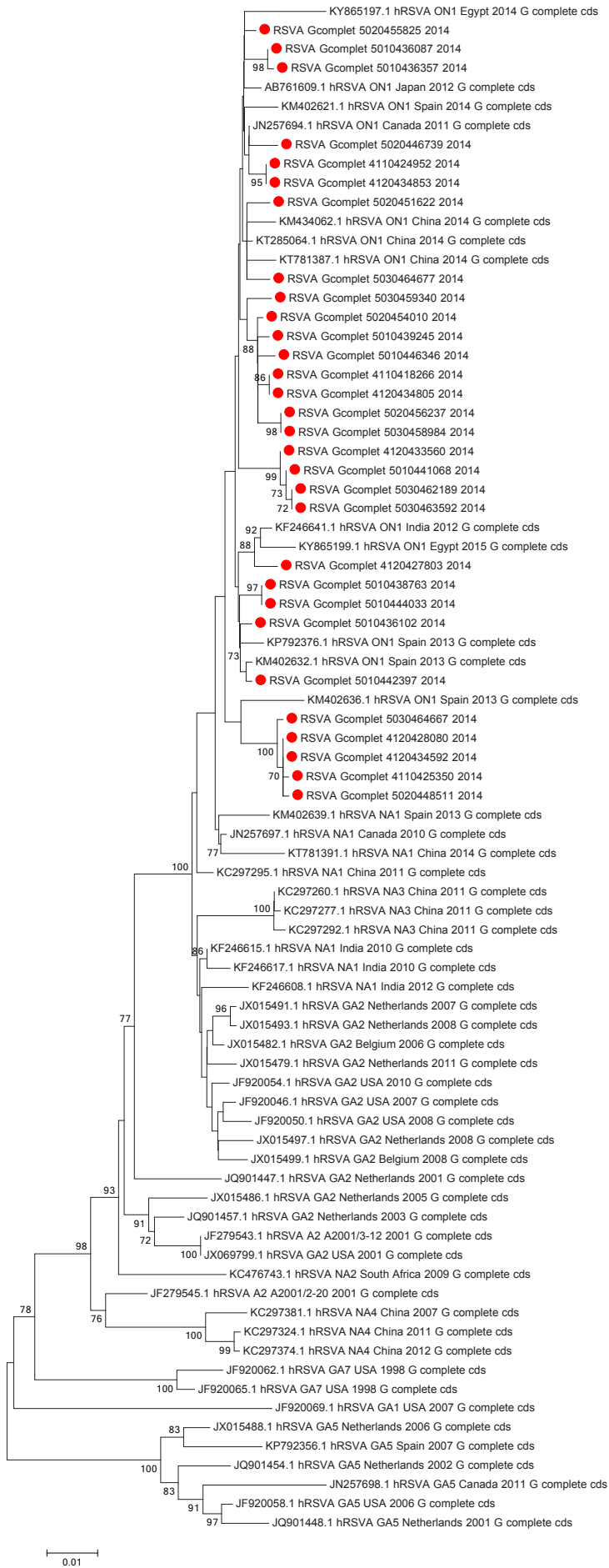


**Annexe 9. Arbre phylogénétique construit à partir des 45 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2013-2014 et des 50 séquences de référence**

Légende : ● NA1, ● ON1

Arbre construit à l'aide du logiciel MEGA® 6.0 en utilisant la méthode du *Neighbor-Joining* consolidé par 1000 répétitions (*bootstrap*) et en appliquant la correction de distance Kimura 2-parameter. Seules les valeurs de bootstrap >70 sont rapportées.

3 séquences sont dans le cluster du génotype NA1, 42 séquences sont dans le groupe du génotype ON1.

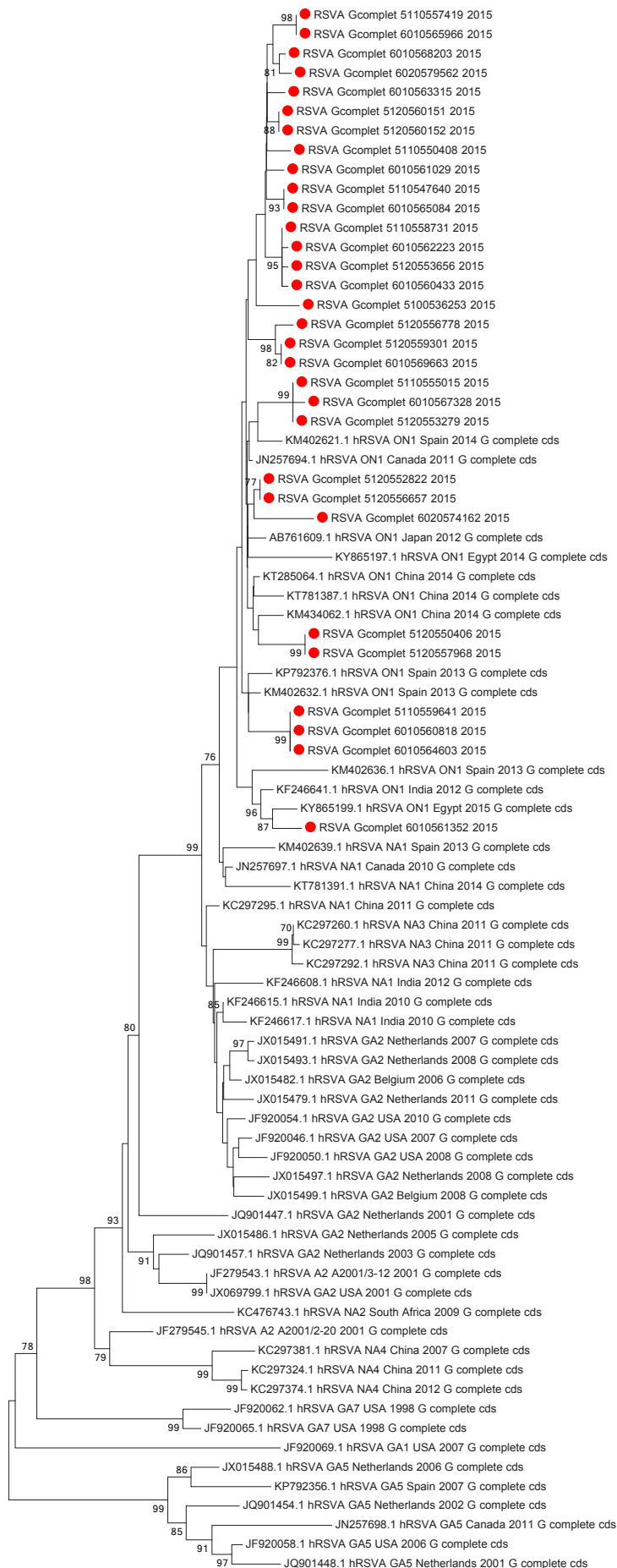


**Annexe 10. Arbre phylogénétique construit à partir des 30 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2014-2015 et des 50 séquences de référence**

Légende : ● ON1

Arbre construit à l'aide du logiciel MEGA® 6.0 en utilisant la méthode du *Neighbor-Joining* consolidé par 1000 répétitions (*bootstrap*) et en appliquant la correction de distance Kimura 2-parameter. Seules les valeurs de *bootstrap* >70 sont rapportées.

30 séquences sont dans le cluster du génotype ON1.



**Annexe 11. Arbre phylogénétique construit à partir des 31 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2015-2016 et des 50 séquences de référence**

Légende : ● ON1

Arbre construit à l'aide du logiciel MEGA® 6.0 en utilisant la méthode du *Neighbor-Joining* consolidé par 1000 répétitions (*bootstrap*) et en appliquant la correction de distance Kimura 2-parameter. Seules les valeurs de *bootstrap* >70 sont rapportées.

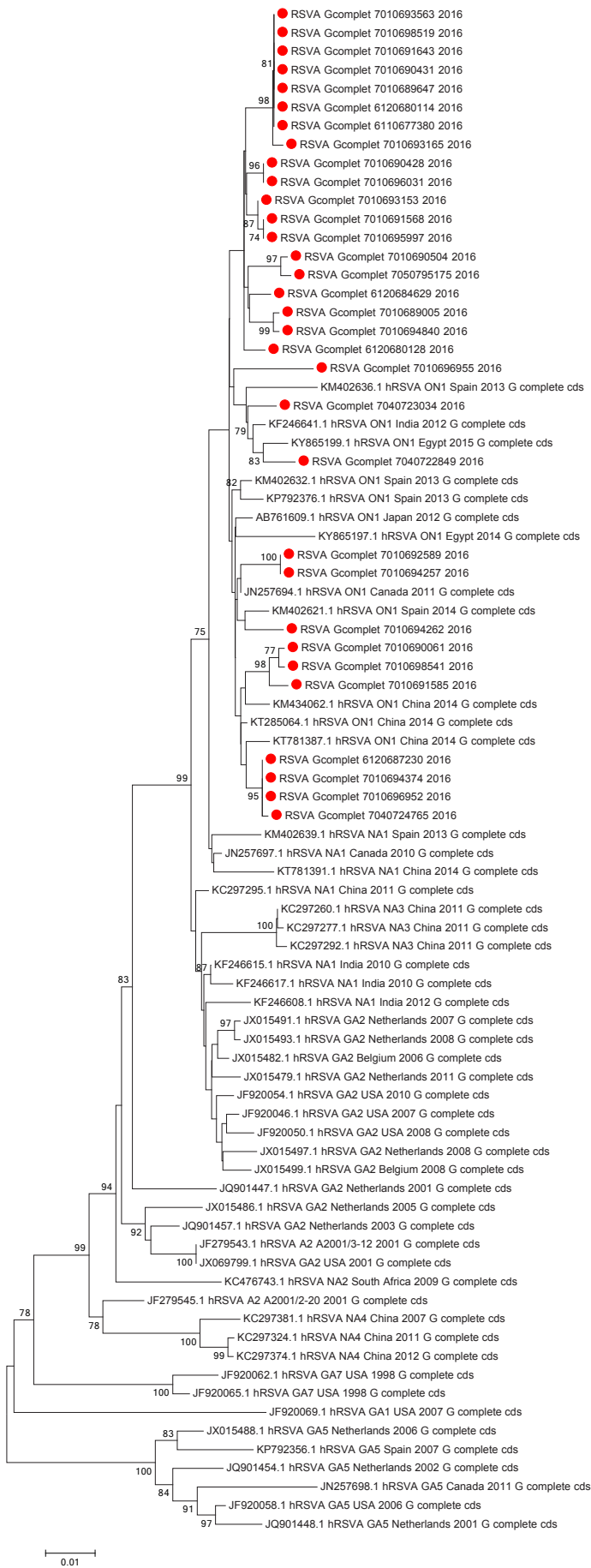
31 séquences sont dans le cluster du génotype ON1.

**Annexe 12. Arbre phylogénétique construit à partir des 32 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2016-2017 et des 50 séquences de référence**

Légende : ● ON1

Arbre construit à l'aide du logiciel MEGA® 6.0 en utilisant la méthode du *Neighbor-Joining* consolidé par 1000 répétitions (*bootstrap*) et en appliquant la correction de distance Kimura 2-parameter. Seules les valeurs de bootstrap >70 sont rapportées.

32 séquences sont dans le cluster du génotype ON1.

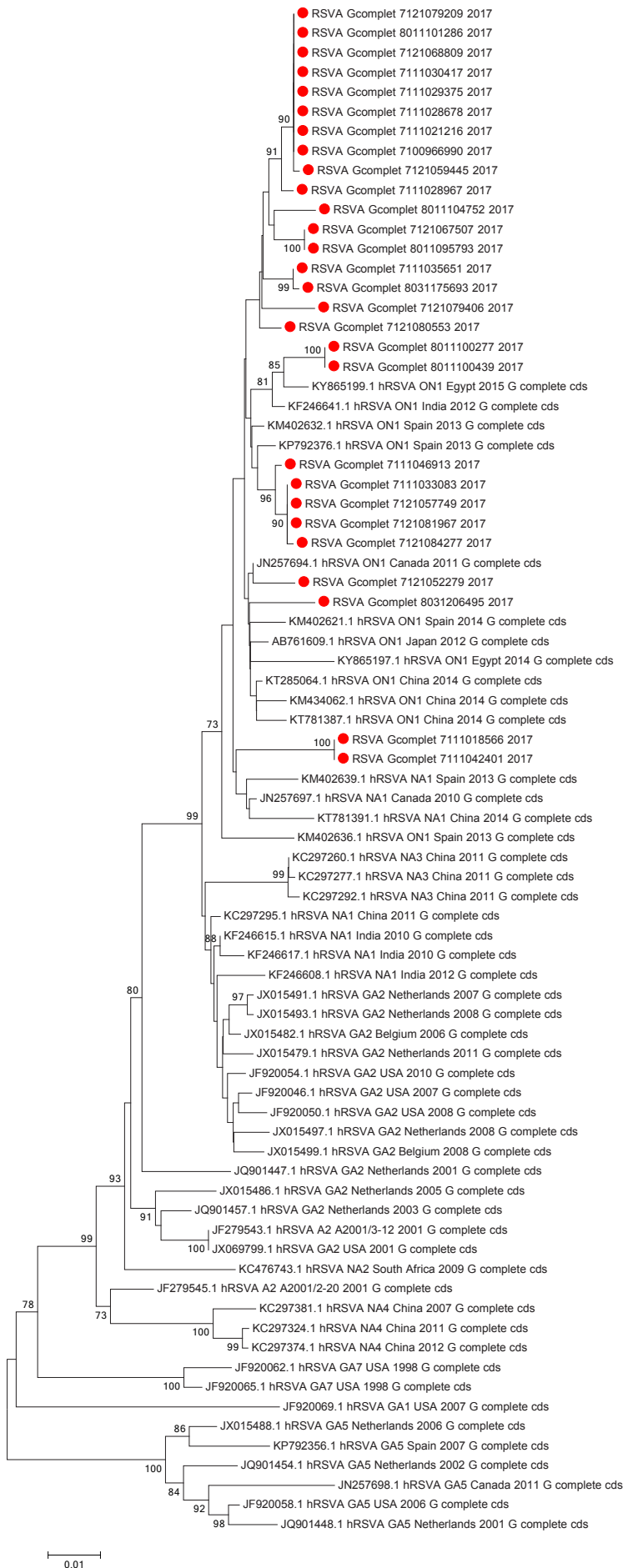


**Annexe 13. Arbre phylogénétique construit à partir des 28 séquences du gène G complet des virus collectés pendant l'épidémie de 2017-2018 et des 50 séquences de référence**

Légende : ● ON1

Arbre construit à l'aide du logiciel MEGA® 6.0 en utilisant la méthode du *Neighbor-Joining* consolidé par 1000 répétitions (*bootstrap*) et en appliquant la correction de distance Kimura 2-parameter. Seules les valeurs de bootstrap >70 sont rapportées.

28 séquences sont dans le cluster du génotype ON1









UNIVERSITÉ  
CAEN  
NORMANDIE

**U.F.R. Santé**

**Faculté des Sciences Pharmaceutiques**

VU, LE PRESIDENT DU JURY

CAEN, LE

VU, LE DIRECTEUR DE LA FACULTE  
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

CAEN, LE

L'université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses et mémoires. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

